

А. А. КРАСНОВСКИЙ и К. К. ВОЙНОВСКАЯ

## ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОТОХЛОРОФИЛЛА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 5 IV 1949)

Протохлорофилл, обнаруженный Н. А. Монтеверде и В. Н. Люби-менко<sup>(1,5)</sup> во внутренних оболочках семян тыквенных, образуется в этиолированных проростках высших растений, зеленеющих при освещении вследствие накопления в них хлорофилла.

Существует два основных предположения о физиологической роли протохлорофилла: этот пигмент является 1) непосредственным предшественником хлорофилла; или 2) побочным продуктом синтеза хлорофилла<sup>(2)</sup>. Измерение количества образованного хлорофилла в этиолированных проростках при освещении светом различной длины волны показало, что „спектр действия“ реакции зеленения весьма близок к спектру поглощения протохлорофилла<sup>(3)</sup>, что свидетельствует о большей вероятности первого предположения.

В нашей работе исследованы свойства выделенного из клетки протохлорофилла с целью получения данных о возможных его превращениях при действии света.

Спектр поглощения протохлорофилла в растворе. Пигменты внутренних оболочек семян тыквы извлекали (при растирании) 80% ацетоном. К экстракту добавляли петролейный эфир (т. кип. 60—80°) и ацетон отмывали водой. Раствор пигментов в петролейном эфире сушили над прокаленным сульфатом натрия и подвергали хроматографическому разделению на сахаре в колонке Цвета. Адсорбированные пигменты проявлялись петролейным эфиром, содержащим серный эфир в отношении 1 : 10. В другом варианте разделение пигментов велось из смеси петролейного и серного эфира в отношении 5 : 1. Полученная зеленая зона разделялась на три части, пигмент извлекали серным эфиром. Спектры поглощения пигмента различных участков зеленой зоны, измеренные с помощью спектрофотометра Бекмана (модель DU), не отличались друг от друга. Таким образом, у нас не подтвердились результаты Зейбольда и Эгле<sup>(4)</sup>, нашедших в протохлорофилле два компонента *a* и *b*. Как видно из рис. 1, поглощение пиридиновой вытяжки из внутренних оболочек семян тыквы в коротковолновой области мало отличается от поглощения чистого пигмента, что свидетельствует о незначительном количестве извлекаемых каротиноидов.

Положение главных максимумов поглощения протохлорофилла (в м $\mu$ ): в эфире 623, 571, 533, 433; в пиридине 633, 588, 550, 453. Красный максимум поглощения внутренних оболочек семян тыквы по нашим измерениям (зимой) лежит при 645—650 м $\mu$ , т. е. сдвинут в красную сторону по сравнению с раствором, что, как и в случае хлорофилла, является доводом в пользу предположения о связи протохлорофилла с белком в ткани растения<sup>(5)</sup>.

Фотохимическое восстановление протохлорофилла. Т. Н. Годнев и С. В. Калишевич<sup>(6)</sup> показали возможность восстанов-

ления протохлорофилла цинком (по методу К. А. Тимирязева) и обратного окисления образованного лейкосоединения на воздухе. Один из нас обнаружил и исследовал реакцию обратимого фотохимического восстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой и некоторыми другими соединениями, идущую „против“ термодинамически равновесных условий (?). Было также найдено, что образующаяся при реакции активная восстановленная форма хлорофилла способна передавать водород ряду окислительно-восстановительных систем, в том числе окисленным формам протетических групп дегидраз (?).

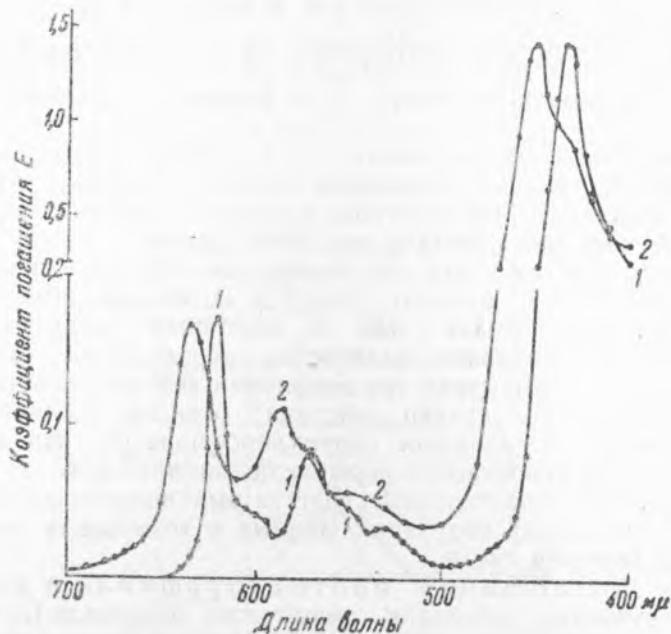


Рис. 1. Спектр поглощения раствора протохлорофилла из внутренних оболочек семян тыквы. 1 — в эфире, 2 — в пиридине

Мы исследовали возможность обратимого фотовосстановления протохлорофилла, подобного восстановлению хлорофилла. Реакция проводилась с чистым (изолированным хроматографически) протохлорофиллом и с пиридиновыми экстрактами оболочек семян; в обоих случаях реакция шла подобно. В вакуумную трубку Тунберга специальной формы (допускающей ее установку в кюветодержателе спектрофотометра Бекмана) вводили 20 мг кристаллической аскорбиновой кислоты, 6 мл пиридинового раствора пигмента с величиной коэффициента погашения  $E$  при 635 м $\mu$  0,2—0,6, эвакуировали масляным насосом в течение 3 мин. и освещали кинолампой 500 вт через конденсор и систему светофильтров, выделяющих участок 640—550 м $\mu$  — область двух первых максимумов поглощения протохлорофилла. Освещение производилось при 8° в специальном термостатирующем устройстве в течение 3 мин. Фотореакция происходила весьма быстро, зеленый раствор при освещении приобретал коричневую окраску; при стоянии в темноте (быстрее в присутствии воздуха) восстанавливалась зеленая окраска раствора (рис. 2). Таким образом, протохлорофилл реагирует подобно хлорофиллу, образуя промежуточный продукт с максимумом поглощения, лежащим при 470 м $\mu$  (в случае хлорофилла *a* максимум поглощения продукта восстановления лежит при 525 м $\mu$ ).

Исчезновение поглощения в красной области свидетельствует о том, что восстановление сопровождается нарушением системы

конъюгированных по кругу двойных связей. Пока неясно, так же как и в случае хлорофилла, является ли промежуточный продукт валентно-насыщенным лейкосоединением или устойчивым свободным радикалом типа семихинона.

При достаточно длительном освещении, без светофильтра (30 мин.), после обратной регенерации продуктов восстановления удается заметить появление в растворе максимума поглощения при 675 м $\mu$ , характерного для системы полос хлорина (максимум поглощения хлорофилла

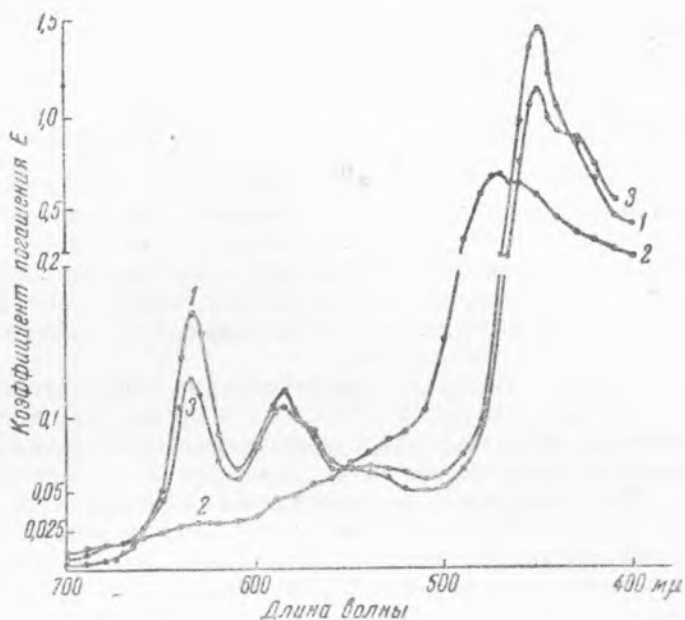


Рис. 2. Обратимое фотохимическое восстановление протохлорофилла аскорбиновой кислотой в пиридиновом растворе. 1 — спектр поглощения раствора до реакции; 2 — раствор после 3 мин. освещения; измерение производилось 6 мин., начиная от 400 м $\mu$ ; 3 — раствор после стояния 16 час. при доступе воздуха (в темноте)

а в пиридине лежит при 668—669 м $\mu$ ). Это свидетельствует о возможности фотовосстановления одной из двух изолированных двойных связей протохлорофилла.

Нужно отметить, что при осуществлении подобной реакции с хлорофиллом нам не удалось наблюдать восстановления второй изолированной двойной связи с образованием бактериохлорофилла, обладающего максимумом поглощения в инфракрасной области при 780 м $\mu$ .

Сенсибилизированный протохлорофиллом перенос водорода. В описанных ниже опытах показано, что протохлорофилл, подобно хлорофиллу, способен фотосенсибилизировать окислительно-восстановительные процессы; нами была осуществлена реакция переноса водорода от аскорбиновой кислоты ( $E_0 = +0,05$  в) к сафранину Т ( $E_0 = -0,29$  в), т. е. „против“ равновесных условий; методика постановки опытов была подобна описанной нами для хлорофилла (8).

В вакуумную трубку помещали 6 мл раствора протохлорофилла с коэффициентом погашения  $E$  при 635 м $\mu$  0,3, сафранина Т ( $E$  при 540 м $\mu$  0,50) и 20 мг аскорбиновой кислоты и освещали кинолампой 500 вт через конденсор и светофильтр RG-1 в области первого красного максимума поглощения протохлорофилла; сафранин не поглощает света в красной области спектра. За ходом сенсибилизированной реакции следили по изменению величины коэффициента погашения сафранина Т в его максимуме (при 540 м $\mu$ ).

Таблица 1  
Фотосенсибилизированное протохлорофиллом восстановление  
ие сафранина Т (растворы в пиридине, освещение в течение 6 мин.,  $\Delta E$  —  
изменение коэффициента погашения после освещения)

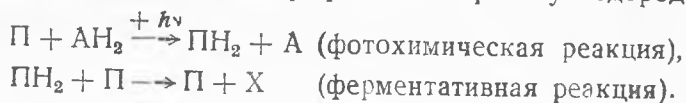
	$\Delta E$ при 635 мμ, протохлорофилл	$\Delta E$ при 540 мμ, сафранин Т
Контрольный опыт без протохлорофилла (сафранин Т + аскорбиновая к-та) . . . . .	—	0,006
Протохлорофилл + сафранин Т + аскорбин. к-та . . . . .	0,035	0,076
Течение обратной реакции после выключения освещения: через 2 мин. . . . .	0,025	0,046
» 5 » . . . . .	0,018	0,021
Пушен воздух: через 45 мин. . . . .	0,002	0,000

Опыт показывает восстановление сафранина под влиянием света, поглощенного протохлорофиллом, и обратное окисление лейкоформы сафранина в темноте и под действием кислорода воздуха.

Результаты исследования показывают подобие фотохимического поведения протохлорофилла и хлорофилла; полученные данные позволяют предположить следующие возможные пути образования хлорофилла при зеленении проростков:

1. Прямое фотохимическое восстановление протохлорофилла до хлорофилла посредством присутствующих в проростках восстановителей: аскорбиновой кислоты ( $АН_2$ ), сульфогидрильных соединений и т. п. Восстановление в растворе первично приводит к образованию лейкосоединения. Восстановление изолированной двойной связи (если оно имеет место) идет с трудом. При осуществлении подобной реакции в растительной клетке следует предположить реакцию протохлорофилла в сочетании со специфическим белком, направляющим путь восстановления до хлорофилла, а не до обратимо реагирующего лейкосоединения.

2. Темновое (ферментативное) восстановление протохлорофилла (П) за счет активной „лейкоформы“ пигмента ( $ПН_2$ ), образующейся при фотохимическом процессе. Ферментативная темновая реакция, возможно, идущая с участием дегидразных систем, направляет восстановление по пути образования хлорофилла (Х), также участвующего в фотохимической реакции. Вероятность подобного процесса обосновывается способностью протохлорофилла к переносу водорода:



Следует считать также возможным образование хлорофилла посредством фотосенсибилизированного протохлорофиллом восстановления отличных от протохлорофилла промежуточных продуктов.

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

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

Поступило  
22 III 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. А. Монтеверде и В. Н. Любименко, Изв. СПб Ботан. сада, 9 (1909). <sup>2</sup> Т. Н. Годнев, VII Тимирязевское чтение. Строение хлорофилла и возможные пути его образования в растении, изд. АН СССР, 1947. <sup>3</sup> S. Frank, J. Gen. Physiol., 29, 157 (1946). <sup>4</sup> K. Seyboldt and K. Egle, Planta, 26 (718) (1937); 28 (718) (1938). <sup>5</sup> В. Н. Любименко, Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире, 1935. <sup>6</sup> Т. Н. Годнев и С. В. Калищевич, Тр. Ин-та физиол. растений им. Тимирязева АН СССР, в. 2, 160 (1945). <sup>7</sup> А. А. Красновский, ДАН, 50, 421 (1948). <sup>8</sup> А. А. Красновский, ДАН, 51, 91 (1948).