

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

**ПЕРЕНОС ВОДОРОДА ОТ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ  
К КОДЕГИДРАЗЕ I ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА, ПОГЛОЩЕННОГО  
ХЛОРОФИЛЛОМ**

(Представлено академиком А. Н. Терениным 17 V 1949)

Ранее одним из нас (1) была показана способность хлорофилла к обратимому фотохимическому восстановлению (посредством аскорбиновой кислоты, сульфогидрильных и некоторых других соединений), идущему с увеличением свободной энергии системы. Эту реакцию удается наблюдать в явной форме лишь в среде пиридина или в присутствии других органических оснований. Способность хлорофилла к окислительно-восстановительным превращениям в такого рода средах напоминает подобную активность гемохромогенов, у которых центральный атом железа координационно связан с пиридином либо с другими основаниями; как известно, эти наблюдения послужили в пользу предположения, что гемин в цитохроме и гемоглобине связан с белком посредством имидазолового кольца гистидина; подобная связь возможна и в случае хлорофилла. Далее, было показано, что хлорофилл фотохимически сенсibiliзирует перенос водорода от аскорбиновой кислоты к рибофлавиону и сафранину Т, „против“ термодинамически равновесных условий (2); было высказано также предположение, что хлорофилл способен переносить водород также предной форме пиридин-нуклеотидных дегидраз и что эта реакция смыкает фотохимическую стадию фотосинтеза, идущую с участием хлорофилла с цепью ферментативных реакций, ведущих к связыванию и восстановлению углекислоты.

Ниже показано, что хлорофилл осуществляет перенос водорода от аскорбиновой кислоты к дифосфопиридин-нуклеотиду—кодегидразе I (ниже обозначаемой Ко), и показан механизм этого процесса, заключающийся в реакции Ко с активной восстановленной формой хлорофилла (ниже обозначаемой  $XH_2$ ), образующейся при фотохимической реакции\*.

О восстановлении Ко до  $CoH_2$  мы судили по появлению характерного для  $CoH_2$  максимума поглощения, лежащего в водном растворе при 340 м $\mu$  с молекулярным коэффициентом погашения  $5,6 \cdot 10^3$ . Для определения максимума поглощения  $CoH_2$  в водно-пиридиновой среде, в которой осуществлялась сенсibiliзированная реакция, был использован раствор, получающийся при анализе Ко.

Навеску 2—3 мг Ко (взятую на микровесах) вводили в 1 мл водного раствора, содержащего 0,2% гидросульфита и 1% бикарбоната натрия, нагревали на кипящей водяной бане 1 мин., опускали в лед и добавляли 4 мл буфера с  $pH = 9,7$  (1 г  $NaHCO_3 + 1$  г  $Na_2CO_3$  в 100 мл воды). Через раствор продували воздух для окисления из-

\* Препарат кодегидразы I, содержащий около 60% дифосфопиридин-нуклеотида, нам любезно предоставил С. Н. Гинсбург, которому мы выражаем глубокую благодарность.

бытка гидросульфита до постоянного значения  $E$  при 340 м $\mu$ . Контрольный опыт ставили без  $Ko$  с той же процедурой; снятие спектра (на спектрофотометре Бекмана) производили против контрольного опыта. По величине  $E$  при 340 м $\mu$  определялось содержание  $Ko$  в препарате<sup>(3)</sup>. 1 мл восстановленного раствора смешивали с 5 мл пиридина, центрифугировали для удаления осадка выпавших солей и спектрофотометрировали против контрольного опыта, прошедшего ту же процедуру. Максимум поглощения в этом случае лежал в области 340—345 м $\mu$ . Введение 10 мг аскорбиновой кислоты не изменяло положения максимума.

Для осуществления сенсibilизированной реакции была применена методика, описанная ранее одним из нас<sup>(2)</sup>. Реакция проводилась в вакуумной трубке Тунберга специальной формы, помещаемой в кюветодержатель спектрофотометра Бекмана либо в специальное термостатическое устройство для облучения. В качестве источника света применялась кинолампа 500 вт с конденсором и красным светофильтром RG-2; освещение производилось, таким образом, в области красного максимума поглощения хлорофилла (620—700 м $\mu$ ).

В трубку вводили 5 мл раствора хлорофилла  $a + b$  в пиридине с концентрацией  $0,7 \cdot 10^{-5}$  мол/л, 1 мл водного раствора  $Ko$  с концентрацией  $5 \cdot 10^{-4}$  мол/л и 10 мг кристаллической аскорбиновой кислоты. После эвакуации масляным насосом при кипении растворителя (3 мин.) снимали спектр поглощения, затем освещали раствор в течение 3 мин. при 8° и с возможной быстротой проводили съемку спектра поглощения, начиная от 310 м $\mu$ . Измерения производили также в течение 1 часа стояния в темноте. Контрольные опыты ставились с 5 мл раствора хлорофилла в пиридине + 1 мл воды + 10 мг аскорбиновой кислоты с тем же графиком (во времени) съемки спектра.

В другом варианте опыты с  $Ko$  и контрольный (без  $Ko$ ) производились одновременно в двух вакуумных трубках, освещаемых в специальном вращающемся устройстве, чтобы обеспечить одинаковый средний режим освещения в обоих опытах: после 3-минутного освещения трубки вставляли в кюветодержатель спектрофотометра Бекмана и во времени измеряли дифференциальный спектр поглощения, в котором трубка без  $Ko$  стояла на месте растворителя. В контрольной паре опытов освещали две трубки без  $Ko$ , с той

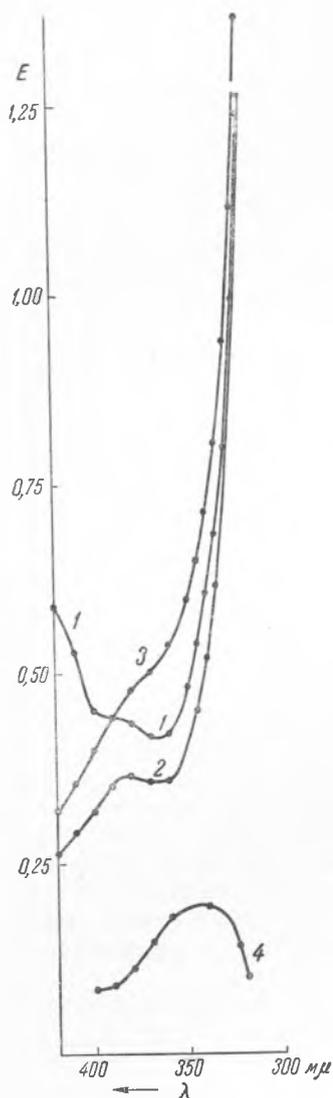


Рис. 1. Восстановление кодегидразы под действием света, поглощенного хлорофиллом. 1—5 мл раствора хлорофилла ( $a + b$ ) в пиридине + 10 мг аскорбиновой кислоты + 1 мг кодегидразы в вакуумной трубке до освещения; без кодегидразы тот же спектр; 2—после 3 мин. освещения через красный фильтр RG-2 опыт без кодегидразы; 3—после 3 мин. освещения, опыт с кодегидразой; 4—разность спектров 3—2; соответствует спектру восстановленной формы кодегидразы (максимум 340—345 м $\mu$ ). Спектры 1, 2, 3 сняты против воды

же последующей процедурой.

В контрольном опыте без  $\text{Co}$  фотохимическое взаимодействие хлорофилла с аскорбиновой кислотой приводит к образованию продукта восстановления с максимумом поглощения при  $525 \text{ м}\mu$ , в темноте реагирующего обратимо с образованием хлорофилла (<sup>1</sup>). В опытах с  $\text{Co}$ , являющемся акцептором водорода, иногда не удается наблюдать явного максимума  $\text{XH}_2$  при  $525 \text{ м}\mu$ , что связано с взаимодействием активного продукта восстановления хлорофилла с кодегидразой.

Из рассмотрения опытных данных (рис. 1) явствует восстановление  $\text{Co}$  под влиянием света, поглощенного хлорофиллом, с появлением максимума поглощения ( $\text{CoH}_2$ ) при  $340 \text{ м}\mu$ , спадающего при стоянии в темноте из-за течения обратной реакции.

Следовало показать теперь прямым опытом, что механизм процесса заключается в темновой реакции кодегидразы с фотохимически восстановленной формой хлорофилла  $\text{XH}_2$ . С этой целью были поставлены следующие опыты в вакуумной трубке Тунберга, обладающей боковым отводом. В боковой отвод вакуумной трубки вводили 1 мл водного раствора  $\text{Co}$  или другого окислителя с концентрацией  $1,5 \cdot 10^{-3}$  мол/л. В трубку вводили раствор хлорофилла в пиридине с  $E$  при  $670 \text{ м}\mu$   $0,7 + 5$  мг аскорбиновой кислоты, эвакуировали, освещали 3 мин. через красный светофильтр и в восстановленный раствор розового цвета вводили в темноте раствор  $\text{Co}$  из бокового отвода. В контрольном опыте в боковой отвод вакуумной трубки вводилась вода.

О ходе реакции между  $\text{XH}_2$  и  $\text{Co}$  можно судить по изменению любой из взаимно связанных величин: увеличению  $E$  при  $670 \text{ м}\mu$  (образование хлорофилла), либо при  $340 \text{ м}\mu$  ( $\text{CoH}_2$ ), либо по уменьшению  $E$  при  $525 \text{ м}\mu$  ( $\text{XH}_2$ ).

Измерение  $E$  при  $525 \text{ м}\mu$  неудобно, так как некоторые из исследованных „окислителей“ обладают поглощением света в этой области; измерение при  $340 \text{ м}\mu$  неудобно по тем же причинам; кроме того, величина молекулярного коэффициента погашения  $\text{CoH}_2$  составляет  $5,6 \cdot 10^3$ , т.е. в  $0,9 \cdot 10^5 / 5,6 \cdot 10^3 \cong 16$  раз меньше соответствующей величины для хлорофилла; при изменении  $E$  хлорофилла в процессе опыта на  $0,6-0,7$  соответственное изменение  $E$   $\text{CoH}_2$  составит около  $0,04$ , т.е. величину, не намного превышающую ошибку опыта в наших условиях его осуществления. В то же время в области красного максимума хлорофилла не поглощает ни одна из исследованных систем; измерение при  $670 \text{ м}\mu$  поэтому наиболее удобно.

Для сравнения, кроме  $\text{Co}$ , в качестве окислителей исследовались рибофлавин, сафранин Т (обладающий значением окислительно-восстановительного потенциала, близким к тому же значению для  $\text{Co}$ ) и кислород.

Из рис. 2 отчетливо видна быстрая реакция продукта восстановления хлорофилла со всеми исследованными соединениями. Несколько

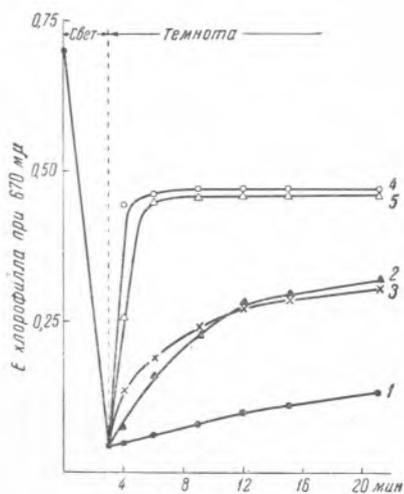


Рис. 2. Темновая реакция фото-восстановленной формы хлорофилла с различными „окислителями“. 5 мл раствора хлорофилла (а + б) в пиридине + 5 мг аскорбиновой кислоты, эвакуировано, освещено 3 мин. через красный фильтр; к восстановленному раствору прилиты из бокового отвода вакуумной трубки; 1 — 1 мл воды, 2 — 1 мл воды, пущен воздух; 3 — 1 мл раствора  $\text{Co}$  в воде с концентрацией  $0,015$  мол/л; 4 — 1 мл раствора сафранина Т в воде,  $0,015$  мол/л; 5 — 1 мл раствора рибофлавина в смеси воды и пиридина (30%),  $0,015$  мол/л

меньшую скорость реакции взаимодействия  $XH_2$  с  $Co$  можно объяснить менее благоприятным значением стерического фактора вследствие значительного отличия конфигурации молекулы  $Co$  от других примененных окислителей. Полученные данные с рибофлавином и сафранином  $T$  являются дополнительным подтверждением предположенного нами ранее <sup>(2)</sup> механизма сенсibilизированной реакции.

Механизм исследованной реакции можно представить следующей схемой:

1. Световая реакция:



где  $X^{\cdot}$  — молекула хлорофилла в длительно живущем бирадикальном состоянии, возникающем в результате поглощения кванта света <sup>(4, 5)</sup>;  $AN_2$  — аскорбиновая кислота;  $A$  — дегидроаскорбиновая кислота;  $XH_2$  — восстановленная форма хлорофилла. Здесь остается открытым вопрос о том, является ли это соединение свободным радикалом типа семихинона или валентно-насыщенным лейкосоединением, так же как и возможность первичного образования монодегидроаскорбиновой кислоты <sup>(1, 2)</sup>.

2. Восстановление  $Co$  в течение светового периода:



3. Обратная реакция (темновая);



Полученные данные дают основание полагать, что в процессе фотосинтеза хлорофилл может играть роль переносчика водорода от донора водорода (в конечном счете воды) к окисленной форме кодегидразы, участвующей в ступенчатых реакциях темнового восстановления углекислоты. Возможность участия дегидраз в процессе фотосинтеза находит подтверждение в работе Н. М. Сисакяна и К. Г. Чамовой <sup>(6)</sup>, обнаруживших дегидразы в изолированных хлоропластах.

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

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

Поступило  
23 III 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. А. Красновский, ДАН, 50, 421 (1948). <sup>2</sup> А. А. Красновский, ДАН, 51, 91 (1948). <sup>3</sup> S. Gutcho and E. Stewart, Anal. Chem., 20, 1185 (1948). <sup>4</sup> А. Н. Теренин, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 361 (1947). <sup>5</sup> А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947. <sup>6</sup> Н. М. Сисакян и К. Г. Чамова, ДАН, 67, № 2 (1949).