

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Т. Ф. АНДРЕЕВА и Л. Е. ЗУБКОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ЯДОВ НА
ФОТОХИМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ
ХЛОРОПЛАСТОВ**

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 29 XI 1949)

Имеющиеся в литературе данные (¹⁻³) указывают на участие ферментных систем в процессе фотохимического выделения кислорода изолированными хлоропластами. Участие ферментов в фотохимической реакции хлоропластов доказывается чувствительностью этой реакции к воздействию ферментативных ядов и к действию повышенных температур. Однако результаты, полученные при воздействии ядов, противоречивы (^{1, 2}). Между тем, правильные представления в этой области могут иметь большое значение для решения целого ряда вопросов химизма процесса фотохимического выделения кислорода изолированными хлоропластами.

В связи с этим в настоящей работе мы проследили влияние некоторых ферментативных ядов на фотохимическую активность хлоропластов. Было исследовано влияние таких ядов, как: моноиодуксусная кислота, фтористый натрий, гидроксилламин, азид натрия, диэтилдитиокарбамат натрия.

Работа проведена с суспензиями хлоропластов, полученными из листьев фасоли (*Phaseolus vulgaris*), свеклы (*Beta vulgaris*) и конских бобов (*Vicia faba*). Хлоропласты выделялись по ранее изложенному способу (⁴): полученные суспензии состояли из разрушенных хлоропластов гранулярного строения (⁵). Фотохимическая активность таких суспензий (выделение кислорода в присутствии *n*-бензохинона (³)) учитывалась манометрическим методом (⁴). Определения проводились как в воздушной среде, так и в атмосфере азота, содержащего менее 0,1% кислорода.

Фотохимическая активность хлоропластов определялась после предварительного настаивания суспензии с соответствующим ядом в течение 30—60 мин. Опыты проводились при рН 6,5. рН реакционной смеси проверялось до начала опыта и в конце определения фотохимической активности. Полученные данные представлены в табл. 1.

При рассмотрении табл. 1 видно, что гидроксилламин, азид натрия и диэтилдитиокарбамат натрия подавляют фотохимическую активность изолированных хлоропластов. По силе действия на первом месте стоит гидроксилламин, полностью выключаящий реакцию в небольших концентрациях, далее следуют азид натрия и диэтилдитиокарбамат.

Моноиодуксусная кислота и фтористый натрий не являются ядами для процесса фотохимического выделения кислорода, так как влияние моноиодуксусной кислоты начинает проявляться только при таких высоких концентрациях, как $1 \cdot 10^{-1}$ М; фтористый натрий и при этой концентрации не действует на фотохимическую реакцию. Фтористый натрий является ядом на группу ферментов фосфорного обмена клетки. Моноиодуксусная кислота реагирует с SH-группами, но она, так же как и NaF, влияет на превращения фосфора. Подавляющее действие моно-

Таблица 1

Дата	Объект	Состав атмосферы в опытном сосуде	Концентрация яда в молях	Фотохимич. активность хлоропластов в мм ³ О ₂ в час на 1 см ² суспензии		% подавления реакции
				без яда	с ядом	
1949 2 V	Конские бобы	Азот	Гидроксиламин 0,0002	60,9	13,0	81,3
17 VI	Фасоль	Воздух	0,0002	21,7	-4,4	100
16 VI	Конские бобы	»	0,0005	46,9	-6,0	100
29 VI	Конские бобы	Азот	Азид натрия 0,001	85,7	30,5	64,4
28 VI	То же	»	0,002	57,1	18,6	67,4
25 VI	» »	»	0,005	48,5	12,3	74,6
27 VI	» »	»	0,005	72,0	19,8	72,5
18 X	Свекла	Азот	Диэтилдитиокар- бамат 0,005	57,0	26,9	52,8
19 X	»	»	0,005	41,3	27,6	33,2
20 X	»	»	0,005	42,9	27,2	36,6
15 X	»	»	0,01	35,0	18,1	48,3
1948			Моноиодусная кислота			
15 IX	Свекла	Азот	0,005	47,2	44,0	6,8
16 IX	»	»	0,01	33,1	30,6	7,6
26 X	»	Воздух	0,05	52,7	51,2	2,9
23 X	»	»	0,1	44,7	26,4	40,9
14 X	Свекла	Воздух	Фтористый натрий 0,01	36,2	36,4	—
21 X	»	»	0,1	21,4	20,2	5,6
22 X	»	»	0,1	37,0	35,1	5,1

иодусной кислоты на процесс фотосинтеза (6) при отсутствии ее влияния и влияния фтористого натрия на фотохимическую активность изолированных хлоропластов указывает на возможное участие фосфора в тех реакциях фотосинтеза, которые не имеют места в процессе фотохимического выделения кислорода изолированными хлоропластами.

Наши опыты показали, что в суспензии изолированных хлоропластов находится довольно значительное количество Са-глицерофосфатазы, одного из ферментов фосфорного обмена клетки. Однако, как и следовало ожидать, параллелизма между активностью фосфатаз и фотохимической активностью хлоропластов мы не наблюдали ни при сравнении этих величин у суспензий хлоропластов разной активности, ни при воздействии ядов (CH₂JCOOH и NaF).

Как видно из данных табл. 1, диэтилдитиокарбамат (характерный яд на оксидазы, содержащие медь) оказывает тормозящее влияние на фотохимическую реакцию в более высоких концентрациях ($5 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-2}$ M), чем гидроксиламин и азид натрия.

Из группы оксидаз, содержащих медь, полифенолоксидаза обнаружена в хлоропластах (7, 8). Эти данные и установленный нами факт подавления реакции диэтилдитиокарбаматом указывают на возможное участие полифенолоксидазы в фотохимической реакции изолированных хлоропластов. Можно также предполагать, что в этом процессе принимает участие аскорбиноксидаза, которая также чувствительна к воздействию диэтилдитиокарбамата. Участие аскорбиноксидазы в этом процессе согласуется с воззрениями А. А. Красновского о химизме фотосинтеза (9, 10).

Из всех исследованных ядов гидроксиламин оказывает наиболее сильное действие на фотохимическую реакцию. Концентрации гидрокси-

амин в $2 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$ M полностью останавливают выделение кислорода изолированными хлоропластами.

Необходимо отметить, что процесс фотосинтеза, так же как и фотохимическая активность хлоропластов, очень чувствителен к воздействию гидросиламина и подавляется теми же концентрациями гидросиламина ($2 \cdot 10^{-4}$ M), которые, по нашим данным, исключают фотохимическую активность хлоропластов. Азид натрия вызывает снижение активности на 65—75%, но в концентрациях, значительно более высоких, чем гидросиламин ($1 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$ M). Гидросиламин и азид натрия являются ядами на каталазу и группу оксидаз.

Вопрос об участии каталазы в процессе фотосинтеза до настоящего времени не решен окончательно. Поэтому представляло интерес выяснить роль каталазы в процессе фотохимического выделения кислорода изолированными хлоропластами.

Каталаза определялась по методу А. Н. Баха и А. И. Опарина, а также манометрически на приборе Варбурга. Определения проводились при концентрации H_2O_2 0,2%. Как видно из данных табл. 2, подавление фотохимической активности при воздействии гидросиламина и азид натрия сопровождается снижением каталазной активности.

Таблица 2

Дата	Объект	Состав атмосферы в опытном сосуде	Концентрация яда в суспензии в молях	Фотохимич. активность хлоропластов в мм ³ O ₂ в час на 1 см ³ суспензии		% подавления реакции	Активность каталазы в см ³ 0,01 M KMnO ₄ за 30 мин. на 1 см ³ суспензии		% подавления каталазы	Активность каталазы (вр. выдел. 150 мм ³ O ₂ на 1 см ³ суспензии в мин.)	
				без яда	с ядом		без яда	с ядом		без яда	с ядом
1949			Гидросиламин								
16 VI	Конские бобы	Воздух	0,0005	3,9	—4,8	100	44,5	6,4	85,7	—	—
17 VI	Фасоль	»	0,0005	23,9	—2,4	100	62,2	4,0	93,6	—	—
12 VII	Конские бобы	Азот	0,0005	32,1	—3,6	100	—	—	—	2	40
			Азид натрия								
27 VI	Конские бобы	»	0,005	72,0	19,8	72,5	12,6	1,1	91,3	—	—
7 VII	»	»	0,005	43,3	23,3	46,2	—	—	—	5	185

Однако более детальное рассмотрение данных показало, что не активность каталазы определяет падение фотохимической реакции. Так например, в случае гидросиламина при полном подавлении реакции каталаза остается достаточно активной, выделяя 150 мм³ O₂ за 40 мин. (табл. 2).

Прибавление к суспензии хлоропластов из бобов, отравленной азидом натрия, экстракта из листьев фасоли, богатого каталазой, не вызывает повышения фотохимической активности хлоропластов, в то время как активность каталазы увеличивается в несколько раз (табл. 3).

На основании полученных данных можно предполагать, что каталаза не участвует в фотохимическом выделении кислорода и что эту функцию выполняет другой фермент, чувствительный к гидросиламину и азиду натрия. С другой стороны, полученный результат может быть объяснен участием в процессе фотохимического выделения кислорода оксидаз, также чувствительных к гидросиламину и азиду натрия.

Ряд фактов подтверждает наблюдение, полученное при изучении действия ядов, о том, что не каталаза определяет фотохимическую активность хлоропластов. Так например, мы не наблюдали параллелизма в содержании каталазы и фотохимической активности у различ-

Таблица 3

Дата	Объект	Состав атмосферы в опытном сосудике	Концентрация яда в суспензии в молях	Фотохимич. активность в мм ³ О ₂ в час на 1 см ³ суспензии			Активность каталазы (время выдел. 150 мм ³ О ₂ на 1 см ³ сусп. в мин.)		
				конт-роль	азид натрия	азид натрия + экстракт	конт-роль	азид натрия	азид натрия + экстракт
1949 16 VII	Конские бобы	Азот	0,001	58,2	20,6	13,5	4	40	5
18 VII	То же	»	0,002	75,0	24,5	23,4	2	30	6
19 VII	» »	»	0,002	20,6	8,9	11,3	6	136	6
21 VII	» »	»	0,002	38,1	15,9	15,7	2	150	5

ных растений; падение фотохимической активности при хранении суспензии и при воздействии повышенных температур сопровождалось лишь незначительным снижением каталазной активности.

Не удалось повысить фотохимическую активность инактивированных хлоропластов и прибавлением листовых экстрактов. Исходя из представлений Н. М. Сисакяна (11) о том, что главная масса ферментов пластид находится в прочно адсорбированном состоянии, при изготовлении листовых экстрактов мы использовали различные приемы, ведущие к десорбции ферментов в окружающий раствор: замораживание (12), действие высокого осмотического давления (13), центрифугирование (7, 14). Полученные экстракты содержали каталазу, но, тем не менее, они не оказали благоприятного влияния на фотохимическую активность хлоропластов.

На основании полученных данных можно предполагать, что снижение фотохимической активности при хранении суспензии при инактивации ее воздействием температуры в 28—30° связано с нарушением активности тех ферментов, которые прочно связаны с липопротеиновым комплексом хлоропластов и не могут быть внесены в суспензии прибавлением листовых экстрактов.

Предположение о том, что этими ферментами могут быть оксидазы, согласуется с данными Н. М. Сисакяна (14, 15), указывающими на большую прочность связи некоторых окислительных ферментов (например, цитохромоксидазы, пероксидазы) с липопротеиновым комплексом пластид. Интересен в этом отношении и факт вредного действия автолиза на активность окислительных ферментов (7, 15), так как в условиях автолиза мы наблюдали также падение фотохимической активности изолированных хлоропластов.

В заключение выражаем глубокую благодарность проф. А. А. Ничипоровичу за руководство работой.

Поступило
25 XI 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Hill, Proc. Roy. Soc. Lond., 127, No. 847, 192 (1939). ² C. S. French, A. S. Holt and P. D. Powell Science, 103, № 2678, 505 (1946). ³ О. Варбург и В. Люттгенс, Биохимия, 11, в. 4 (1946). ⁴ Т. Ф. Андреева и Л. Е. Зубкович, ДАН, 60, № 4 (1948). ⁵ Л. Е. Зубкович и Т. Ф. Андреева, ДАН, 67, № 1 (1949). ⁶ H. J. Kohn, Journ. Gen. Physiol., 19, 23 (1935). ⁷ Н. М. Сисакян и Е. Б. Куваева, ДАН, 62, № 1 (1948). ⁸ D. Agnon, Plant Physiology, 24, № 1 (1949). ⁹ А. А. Красновский, ДАН, 59, № 1 (1948). ¹⁰ А. А. Красновский и Г. П. Брич, ДАН, 67, № 2 (1949). ¹¹ Н. М. Сисакян и А. М. Кобякова, Биохимия, 13, в. 1 (1948). ¹² А. И. Опарин, Журн. сахарн. пром., № 7—8, 393 (1931). ¹³ Н. М. Сисакян, А. М. Кобякова и Н. А. Васильева, Биохимия, 12, в. 1 (1947). ¹⁴ Н. М. Сисакян и А. М. Кобякова, Биохимия, 14, в. 1 (1949). ¹⁵ Н. М. Сисакян и И. И. Филиппович, ДАН, 67, № 3 (1949).