

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

РЕАКЦИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕННОЙ ФОРМЫ ХЛОРОФИЛЛА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 22 VI 1950)

В предыдущих сообщениях была описана реакция обратимого фотохимического восстановления хлорофилла и его аналогов в различных средах и с участием различных соединений (¹⁻³). Было показано, что обратимое восстановление хлорофилла происходит в явной форме лишь в среде органических оснований или при добавлении оснований к иным растворителям: реакция происходит с аскорбиновой и диоксималеновой кислотами, цистеином, сероводородом и фенилгидразином. При фотовосстановлении хлорофилла «а» образуется промежуточный продукт красного цвета с максимумом поглощения при 525 мμ; в темноте и под действием окислителей происходит обратное образование хлорофилла.

В наших работах показано участие активной фотовосстановленной формы в сенсibilизированных хлорофиллом окислительно-восстановительных реакциях (^{4, 5}).

В настоящей работе исследуется темновое взаимодействие активной фотовосстановленной формы хлорофилла, обозначаемой ниже ХН, с красителями, обладающими разной величиной окислительно-восстановительного потенциала, простетическими группами ферментов, некоторыми соединениями биохимического значения и неорганическими ионами.

При постановке этих опытов исходной является фотохимическая реакция восстановления хлорофилла $a + b$ аскорбиновой кислотой в пиридиновом растворе. Реакцию осуществляли в вакуумной трубке особой формы, позволяющей установить трубку в кюветодержатель термостатирующего устройства спектрофотометра Бекмана. В трубку вводили 5 мл пиридинового раствора хлорофилла $a + b$ с концентрацией 10^{-5} мол/л и 0,1 мл водного 5% раствора аскорбиновой кислоты. В отвод пробки помещали 1 мл водного или пиридинового раствора исследуемого «окислителя» с концентрацией от 10^{-2} до $5 \cdot 10^{-4}$ мол./л. Трубку с раствором эвакуировали в течение трех минут масляным вакуумным насосом при взбалтывании, затем раствор хлорофилла освещали в течение трех минут в фокусе концентратора кинолампой 500 ватт через красный светофильтр RG-2 при 16°. Зеленый раствор после освещения становился розовым (вследствие фотовосстановления хлорофилла). Трубку немедленно помещали в кюветодержатель термостатирующего устройства спектрофотометра, измеряли коэффициент погашения при 670 мμ, затем приливали из отвода пробки раствор «окислителя» и вели измерения E_{670} через 3-минутные интервалы. Первый отсчет (до слива) делали через 30 сек. после прекращения облучения. Контрольные опыты с 1 мл воды или пиридина ставили в начале и конце серии: на рис. 1—4 приведены средние результаты нескольких контрольных опытов. Таким образом, о скорости обратной реакции окисления восстановленной формы хлорофилла судили по увеличению поглощения света в красном максимуме хлорофилла.

Темновое взаимодействие «окислителей» с аскорбиновой кислотой. Фотореакция осуществляется при значитель-

ном избытке аскорбиновой кислоты, ее концентрация составляет $5 \cdot 10^{-3}$ мол/л; концентрация вводимого «окислителя» в трубке (после слива) составляла $2 \cdot 10^{-3}$ — 10^{-4} мол/л.

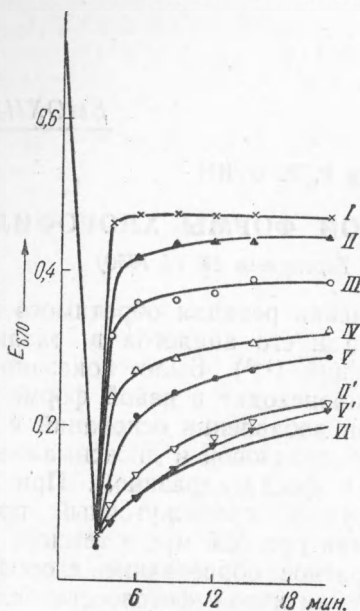


Рис. 1. Окисление фотовосстановленной формы хлорофилла при 16° . I—тионин $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, II—хинон 10^{-2} мол/л, II'—хинон $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, III—метиленовый синий $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, IV—фенол-индофенол $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, V—дегидроаскорбиновая кислота $5 \cdot 10^{-2}$ мол/л, V'—дегидроаскорбиновая кислота $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, VI—контроль (вода)

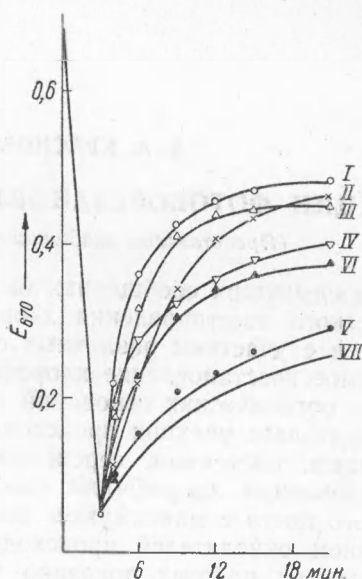


Рис. 2. Окисление фотовосстановленной формы хлорофилла при 16° . I—гематин $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, II— NO_2 10^{-2} мол/л, III— NO_3 10^{-2} мол/л, IV— Fe^{+++} 10^{-2} мол/л, V— Cu^{++} 10^{-2} мол/л, VI—кислород воздуха, VII—контроль (пиридин)

Ряд примененных «окислителей» способен к темновому взаимодействию с аскорбиновой кислотой. Раствор красителя из бокового отвода пробки приливали после откачивания воздуха к раствору аскорбиновой кислоты в пиридине (в темноте). Сразу происходило обесцвечивание следующих красителей (в скобках указано значение окислительно-восстановительного потенциала E_0' в вольтах при $\text{pH} = 7$): фенол-индофенола (+0,23), тионина (+0,062), метиленового голубого (+0,011). Не обесцвечивались нильский синий (−0,12), рибофлавин (−0,22), сафранин Т (−0,29), нейтральный красный (−0,32). Величина E_0' аскорбиновой кислоты в водном растворе составляет +0,060 в, таким образом самопроизвольно должны восстанавливаться красители с более положительным значением E_0' , тогда как красители с более отрицательным значением E_0' в темноте не реагируют*. Эти соотношения наблюдаются на опыте, что свидетельствует о приближенном сохранении в случае пиридиновых растворов знака ΔE , полученного из табличных данных для водных растворов. Темновое восстановление аскорбиновой кислотой хинона, нитратов, нитритов и ионов железа известно.

Взаимодействие фотовосстановленной формы хлорофилла с системами, обладающими положительной величиной E_0' . Реакции с различными соединениями

* Одним из нас было ранее показано, что освещение в области поглощения красителя сдвигает равновесие таких систем (5).

этой группы видны из рис. 1, 2. ХН окисляется до хлорофилла красителями (тионин, метиленовый голубой, фенол-индофенол) хиноном, гематином, дегидроаскорбиновой кислотой, ионами Fe^{+++} , NO_2' и NO_3' , а также кислородом воздуха.

Так как все эти соединения способны в темноте окислять аскорбиновую кислоту, то возникает вопрос, следствием чего является наблюдаемая обратная реакция: взаимодействия ХН непосредственно с «окислителем» или с окисленной формой аскорбиновой кислоты. Для выяснения этого нами были поставлены опыты с дегидроаскорбиновой кислотой,

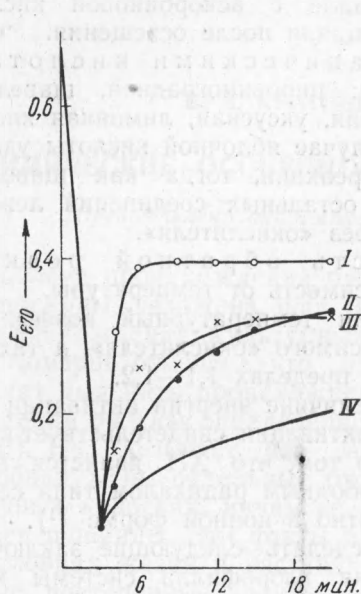


Рис. 3. Окисление фотовосстановленной формы хлорофилла при 16° . I — сафранин Т $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, II — нейтральный красный $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, III — нильский синий, $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, IV — контроль (вода)

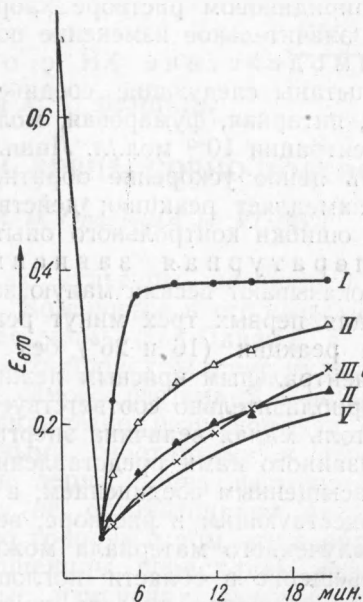


Рис. 4. Окисление фотовосстановленной формы хлорофилла при 16° . I — рибофлавин $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, II — ДПН 10^{-3} мол/л, III — ДПН $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л, IV — контроль (пиридин), V — контроль (вода)

полученной окислением растворов аскорбиновой кислоты на активированном угле в водном растворе (6). Определение концентрации дегидроаскорбиновой кислоты производилось обычным способом титрования 2,6-дихлорфенолиндофенолом после восстановления сероводородом. Из рис. 1 видно, что даже при большой концентрации дегидроаскорбиновой кислоты ($5 \cdot 10^{-2}$ мол/л) скорость обратной реакции значительно ниже, чем в случае красителей с концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ мол/л. Отсюда следует, что исследованные окислители либо реагируют непосредственно с ХН, либо в результате реакции окислителя с аскорбиновой кислотой образуется ее активная «полуокисленная» форма — монодегидроаскорбиновая кислота, быстро реагирующая с ХН.

Взаимодействие фотовосстановленной формы хлорофилла (ХН) с системами, обладающими отрицательной величиной E_0' . Из рис. 3 и 4 отчетливо видно быстрое окисление фотовосстановленной формы хлорофилла всеми примененными соединениями, не реагирующими в темноте с аскорбиновой кислотой (в скобках — значения E_0' в вольтах): нильский синий* ($-0,12$ в),

* Нильский синий, в отличие от других примененных здесь соединений, поглощает свет в красной области спектра, поэтому на рис. 3 показан ход изменения E хлорофилла за вычетом E контрольного опыта без хлорофилла.

сафранин Т ($-0,29$), нейтральный красный ($-0,32$), рибофлавин ($-0,22$), дифосфопиридин-нуклеотид** (ДПН) ($\sim -0,32$).

Система ксантин — гипоксантин обладает потенциалом $0,37$ в (7); ксантин уже не реагирует с фотовосстановленной формой хлорофилла (ХН). Эти опыты показывают, что потенциал системы $\text{ХН} \rightleftharpoons \text{Х}$ лежит, вероятно, около $-0,35$ в. Примененный нами здесь метод индикаторов может дать лишь приближенное значение этой величины; в дальнейшем предполагается прямое электрометрическое измерение E_0' .

Предварительные опыты измерения потенциала золотого электрода в водно-пиридиновом растворе хлорофилла с аскорбиновой кислотой показали значительное изменение потенциала после освещения.

Взаимодействие ХН с органическими кислотами. Были испытаны следующие соединения: пировиноградная, щавелевая, яблочная, янтарная, фумаровая, молочная, уксусная, лимонная кислоты при концентрации 10^{-2} мол./л. Лишь в случае яблочной кислоты удалось наблюдать явное ускорение обратной реакции, тогда как щавелевая кислота замедляет реакцию; действие остальных соединений лежит в пределах ошибки контрольного опыта без «окислителя».

Температурная зависимость обратной реакции. Опыты показывают весьма малую зависимость от температуры.

Так, для первых трех минут реакции температурный коэффициент обратной реакции (16 и 26°) без внесимого «окислителя», а также с ДПН и нейтральным красным лежит в пределах $1,1$ — $1,2$.

Это приблизительно соответствует величине энергии активации $1,5$ — 3 кал. Столь малая величина энергии активации свидетельствует в пользу высказанного нами представления о том, что ХН является не валентно-насыщенным соединением, а свободным радикалом типа семихинона, существующим в растворе, вероятно в ионной форме (1).

Из полученного материала можно сделать следующие заключения.

1. Освещение в области поглощения хлорофилла системы хлорофилл — аскорбиновая кислота приводит к образованию системы, способной восстанавливать соединения с потенциалом до $-0,32$ в. Предполагается, что E_0' системы после освещения лежит около $-0,35$ в, что близко к потенциалу фотосинтетической системы хлоропласта.

2. Фотовосстановленная форма хлорофилла реагирует со всеми красителями — окислительно-восстановительными индикаторами и простетическими группами дегидразных ферментов: рибофлавином и дифосфопиридин-нуклеотидом, что указывает на возможный путь переноса фотохимически мобилизованного водорода посредством дегидраз.

3. Восстановленная форма хлорофилла реагирует непосредственно или с участием промежуточной системы (аскорбиновая кислота \rightleftharpoons окисленная форма) с гематином, ионами железа, а также с нитритом и нитратом, что указывает на возможный фотохимический путь восстановления соединений азота в зеленой клетке.

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

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

Поступило
15 VI 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). ² А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949). ³ А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **66**, 663 (1949). ⁴ А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949). ⁵ А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948). ⁶ В. Н. Букин, Биохимия, **8**, 61 (1943). ⁷ D. E. Green, Biochem. Journ., **28**, 1550 (1934). ⁸ S. Williamson and D. E. Green, Journ. Biol. Chem., **135**, 343 (1940).

** В работе применяли препарат, содержащий 10% ДПН, выделенный нами из дрожжей по методу, близкому к описанному в (8); опыты привели к тем же результатам, что и в случае 60% ДПН (4) при той же концентрации ДПН в растворе.