

А. А. КРАСНОВСКИЙ и К. К. ВОИНОВСКАЯ

**ОБРАТИМОЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ
И ОКИСЛЕНИЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА
И БАКТЕРИОФЕОФИТИНА**

(Представлено академиком А. Н. Терениным 17 X 1951)

В предыдущих работах нашей лаборатории были обнаружены и исследованы реакции обратимого фотохимического восстановления (1) и окисления (2) хлорофилла, некоторых его аналогов и производных, а также показано участие образующихся при фотореакции активных промежуточных соединений в сенсibilизированных хлорофиллом реакциях (3). В публикуемой работе кратко описаны найденные нами окислительно-восстановительные превращения бактериохлорофилла (обозначаемого ниже БХ) и бактериофеофитина (обозначаемого ниже БФ), идущие под действием света близкой инфракрасной области спектра, где расположены главные максимумы поглощения этих пигментов.

Выделение БХ. Сернопурпурные бактерии выращивались на среде, содержащей яблочную кислоту (4)*, в люминостате. Взвесь бактерий фильтровалась через слой кизельгура; пигменты извлекались метанолом, затем переводились в петролейный эфир и хроматографически разделялись в колонке с сахарозой. Растворители предварительно насыщались сероводородом (5). Размывание зон и отмывка каротиноидов производилась смесью петролейного и серного эфира в отношении 4:1.

БХ снимали с синей зоны серным эфиром; опыты обычно ставились со свежесделанным препаратом БХ. БФ получался в твердом виде путем обработки эфирного раствора БХ 10% соляной кислотой (6) с последующей отмывкой кислоты, сушкой и испарением эфира.

Методика опытов применялась та же, что и в наших работах с хлорофиллом. Фотореакции осуществлялись в вакуумных трубках особой формы, допускающей их установку в кюветодержателе спектрофотометра Бекмана. 5 мл раствора пигмента (с коэффициентом погашения в инфракрасном максимуме поглощения $K = 0,5-0,8$), содержащего исследуемый окислитель или восстановитель, эвакуировались масляным насосом при взбалтывании (в опытах с кислородом воздуха эту операцию не делали), измеряли спектр поглощения, затем освещали в термостатирующем устройстве при 10° в фокусе конденсора кинолампой 500 вт через светофильтр RG-5. После освещения измеряли спектр поглощения; иногда это не удавалось сделать из-за быстро текущей обратной реакции. В случае реакции фотоокисления кислородом воздуха для обратной регенерации вводили восстановители: аскорбиновую кислоту, сероводород и др. При фотовосстановлении конечная регенерация пигмента про-

* Исходная культура сернопурпурных бактерий была нам любезно предоставлена Л. К. Осницкой (Институт микробиологии Академии наук СССР), которой мы выражаем свою благодарность.

исходила при действии кислорода воздуха. Некоторые данные опытов показаны в табл. 1 и 2 и на рис. 1 и 2.

Таблица 1

Обратимое фотоокисление кислородом воздуха БХ и БФ
Условия опыта. Освещение производилось на воздухе через светофильтр RG-5: растворов БХ 30 сек.; растворов БФ 3 мин. Обратная регенерация осуществлялась введением восстановителя сразу после облучения

Растворитель	Восстановитель	Колич. пигмента в % от исходного			
		БХ		БФ	
		фото-реакция	обратная реакция	фото-реакция	обратная реакция
Спирт этилов.	Аскорбиновая кислота	9,1	73,8	80,7	89,8
Спирт этилов.	Сероводород	7,1	68,6	—	—
Ацетон	Аскорбиновая кислота	11,2	38,9	—	—
Ацетон	Сероводород	14,5	35,5	—	—
Пиридин	Аскорбиновая кислота	20,0	23,9	87,0	78,7
Толуол	Сероводород	13,7	34,5	—	—

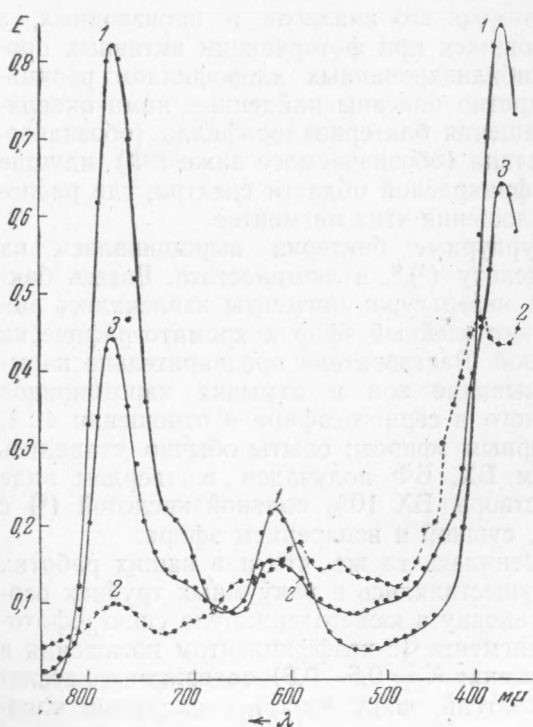


Рис. 1. Обратимое фотоокисление раствора бактериохлорофилла (БХ) в спирте кислородом воздуха с последующей регенерацией аскорбиновой кислотой. 1 — раствор БХ до облучения, 2 — после облучения (1 мин.), 3 — после введения аскорбиновой кислоты на 26 мин. после облучения и стояния в темноте в течение 1 часа.

малоактивными. Однако БХ уже в темноте окисляется орто-хиноном (в растворе толуола) с образованием хлорофиллоподобного продукта, обладающего максимумом поглощения при 680 мμ. БФ более устойчив к фотоокислению, однако и здесь удается наблюдать обратимость реакции при добавлении аскорбиновой кислоты.

Количество реагирующего пигмента подсчитано по изменению величины коэффициента погашения в инфракрасном максимуме.

Результаты опытов по фотоокислению. БХ весьма быстро окисляется под действием кислорода воздуха; быстрее всего в этиловом спирте, медленнее в пиридине; раствор в спирте после освещения дает интенсивную реакцию на перекиси с железородановым раствором (?). Обратная регенерация пигмента достигается при добавлении аскорбиновой кислоты или сероводорода; неактивными оказались яблочная, лимонная, пировиноградная, янтарная кислоты, тиозинамин. Промежуточный продукт окисления довольно устойчив; после 10 час. стояния раствора удается при добавлении аскорбиновой кислоты регенерировать большую часть пигмента. Другие окислители: *n*-хинон, нитрит и нитрат натрия, гематин оказались

Обратимое фотовосстановление БХ и БФ

Условия опыта. Освещение растворов производилось в вакууме через светофильтр RG-5 с восстановителем (аскорбиновой кислоты 20 мг, сернистого натра 5 мг): БФ—1) в спирте 30 сек., 2) в пиридине 0,5—1 мин.; растворов БХ в пиридине 3,5 мин. Обратная регенерация осуществлялась введением кислорода через 5—10 мин. после облучения. Обратная реакция шла и в отсутствие кислорода воздуха.

Растворитель	Восстановитель	Колич. пигмента в % от исходного			
		БФ		БХ	
		фото-реакция	обратная реакция	фото-реакция	обратная реакция
Спирт	Аскорбиновая кислота	63,1	82,8	100	100
	Сернистый натр	82,0	90,4	93,3	94,8
Пиридин + 10% воды	Аскорбиновая кислота	18,4	52,1	28,9	50,1
	Сернистый натр	39,9	80,0	57,5	90,7

Результаты опытов по фотовосстановлению. БХ восстанавливается при действии аскорбиновой кислоты и сернистого натра*. Так же как и в случае хлорофилла, реакция идет глубже всего в пиридине, в этиловом же спирте явного течения реакции не удается наблюдать. Реакция весьма быстро обращается в темноте (секунды), без доступа воздуха, что затрудняет снятие спектра промежуточного продукта. БФ восстанавливается быстрее и глубже, чем БХ, и обратная реакция идет медленнее, чем в случае БХ. Промежуточный продукт восстановления зеленого цвета обладает характерным максимумом при 640 м μ . Испытанные в качестве восстановителей яблочная, янтарная, лимонная, пировиноградная кислоты, тиозинамин, тиосульфат натрия оказались неактивными.

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы.

1. БХ быстро фотоокисляется кислородом воздуха с образованием перекисного соединения, не обладающего характерным спектром порфиринов; наиболее вероятно взаимодействие кислорода с длительным бирадикальным возбужденным состоянием пигмента, в соответствии с теорией А. Н. Теренина (8), что

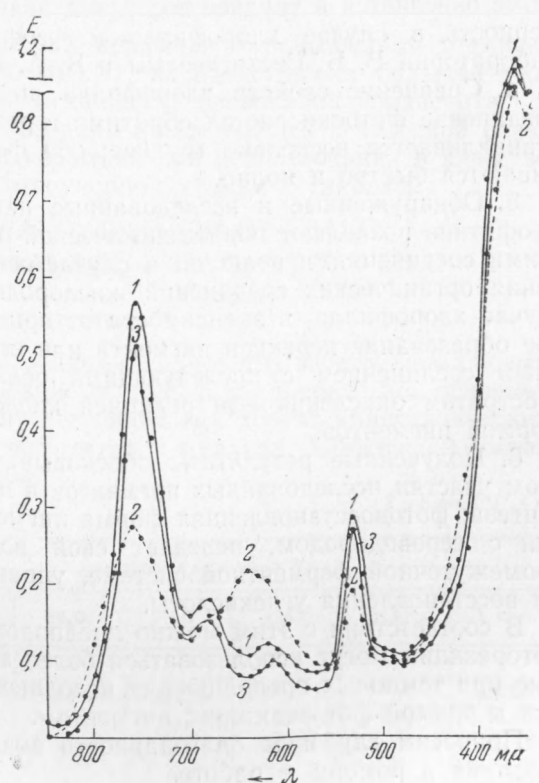


Рис. 2. Обратимое фотовосстановление раствора бактериофеофитина (БФ) в пиридине сернистым натром. 1—раствор БФ до облучения, 2—промежуточный продукт реакции после 30 сек. освещения, 3—конечный продукт (после пуска воздуха и стояния в темноте)

* Опыты велись в пиридине, содержащем 10% воды, для лучшего растворения сернистого натра.

сопровождается раскрытием сопряженной по кругу системы двойных связей молекулы пигмента; обратимое восстановление этой перекиси приводит к образованию исходной молекулы пигмента. Так же как и в случае хлорофилла, нам не удалось констатировать вероятность обратимого окисления — дегидрирования; необратимое окисление — дегидрирование орто-хиноном — приводит к образованию хлорофиллоподобного соединения, т. е. к дегидрированию с появлением одной изолированной двойной связи молекулы пигмента.

2. Фотовосстановление БХ и БФ также приводит к падению инфракрасного максимума поглощения; течение реакции этих пигментов свидетельствует о том, что восстановление не идет по месту изолированных двойных связей, полностью гидрированных у БХ; мы уже высказывали предположение (¹), что фотовосстановление сопровождается раскрытием сопряженной по кругу системы двойных связей с образованием активного промежуточного продукта типа устойчивого свободного радикала («семи»- или «полухинона»).

3. Сравнение свойств БХ и БФ показывает, что первое соединение легче окисляется и труднее восстанавливается, чем второе; та же закономерность в случае хлорофилла и феофитина наблюдалась в нашей лаборатории В. Б. Евстигнеевым и В. А. Гавриловой (⁹).

4. Сравнение свойств хлорофилла и БХ показывает, что второе соединение фотоокисляется обратимо гораздо легче, чем первое, но восстанавливается несколько труднее; оба феофитина обратимо восстанавливаются быстро и полно.

5. Обнаруженные и исследованные нами обратимые реакции БХ и феофитина позволяют понять химический путь фотосенсибилизированных этими соединениями реакций: в случае сенсибилизированного фотоокисления органических соединений кислородом воздуха, так же как и в случае хлорофилла, в зависимости от природы среды возможно первичное образование перекиси пигмента или его фотовосстановление окисляемым соединением с последующими реакциями перекиси пигмента с субстратом окисления или реакцией кислорода с фотовосстановленной формой пигментов.

6. Полученные результаты обосновывают предположение о химическом участии исследованных пигментов в процессе бактериального фотосинтеза: фотовосстановленная форма пигмента, образующаяся при реакции с сероводородом, передает свой водород (протон и электрон) промежуточной ферментной системе, управляющей темновыми реакциями восстановления углекислоты.

В соответствии с этим можно предположить, что у *Athiorhodaceae* для фотореакции могут использоваться более активные соединения, образующиеся при темновых превращениях исходных доноров водорода, неспособных к прямой фотореакции с пигментом.

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

Поступило
29 VIII 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, ДАН, 60, 421 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, 69, 393 (1949); А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, 64, 663 (1949). ² А. А. Красновский, ДАН, 58, 617 (1947). ³ А. А. Красновский, ДАН, 61, 91 (1948); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, 58, 1087 (1947); 67, 325 (1949); А. А. Красновский, Усп. биохимии, 1, изд. Акад. мед. наук, 1950. ⁴ J. G. Eumers u. E. C. Wassink, *Enzymologia*, 2 (1948). ⁵ A. Manten, *Ant. v. Leeuwenhoek Journ. Microb. and Serology*, 14 (1948). ⁶ C. S. French, *Journ. Gen. Phys.*, 23, 483 (1940). ⁷ А. А. Красновский и Т. Н. Гуревич, ДАН, 74, 569 (1950). ⁸ А. Н. Теренин, *Acta Physicochim. URSS*, 18, 210 (1943); *Фотохимия красителей*, изд. АН СССР, 1947. ⁹ В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова, ДАН, 74, 781 (1950).