

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Л. М. КОСОБУЦКАЯ

**ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ВОССТАНОВЛЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ,
ПЕРЕЖИВАЮЩИХ ПЕРИОД ОСВЕЩЕНИЯ В КОЛЛОИДНЫХ
РАСТВОРАХ ВЕЩЕСТВА ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЕВ**

(Представлено академиком А. Н. Терениным 3 XII 1951)

Исследование фотохимических реакций хлорофилла, бактериохлорофилла и их аналогов, проведенное в нашей лаборатории, привело к обнаружению активных продуктов фотохимического восстановления⁽¹⁾ или окисления⁽²⁾ этих пигментов. Образованные активные фотопродукты обладают в определенных условиях внешней среды достаточно длительным периодом существования, что позволило исследовать их спектральные свойства и реакционную способность и установить их химическое участие в сенсibilизированных пигментами реакциях.

Для понимания природы элементарных реакций фотосинтеза мы считали существенной обнаруженную и исследованную в наших работах реакцию обратимого фотовосстановления хлорофилла, сопряженную с сенсibilизированным переносом водорода (электрона) ряду «окислителей», в том числе простетическим группам дегидразных ферментов — рибофлавины и фосфоропиридин-нуклеотидам⁽³⁾. В присутствии этих акцепторов водорода в растворе не удается обнаружить накопления фотовосстановленной формы хлорофилла, быстро реагирующей с указанными соединениями.

Обнаружение активных продуктов, переживающих период освещения в растворах, содержащих хлорофилл, определило поиски соединений, переживающих период освещения и у фотохимических активных коллоидных растворов вещества хлоропластов, способных при действии света к выделению кислорода воды, сопряженному с восстановлением хинонов и подобных соединений. В этих поисках мы применяли те же методы, что и в наших работах с растворами хлорофилла, — спектрофотометрическое измерение концентрации молекул «акцептора водорода» при его взаимодействии в темноте с предварительно освещенным «зеленым раствором» из листьев. В. Н. Любименко⁽⁴⁾ показал, что листья некоторых растений при измельчении образуют весьма устойчивые зеленые коллоидные растворы «натурального хлорофилла», сохраняющие спектральные свойства хлорофилла в листе. Мы применяли листья фасоли (сорт Триумф).

Свежесорванные (обычно утром) верхние листья фасоли, выросшей на открытом грунте в июле — августе, растирали в ступке с 1/20 М фосфатным буферным раствором с рН 7, содержащим 0,1 М КСl (на 5 г листьев 30 мл буфера), отжимали через полотно и центрифугировали раствор при 400 g 20 мин.; полученный зеленый рас-

твор сливали с осадка и использовали для опытов, разбавляя его буфером до нужной концентрации. Все операции приготовления «зеленого раствора» производились по возможности при 0°. Раствор хранили не более 4 час. в темноте при 0°; хранение приводит к потере фотохимической активности.

Среди многих веществ, которые фотохимически восстанавливаются суспензией хлоропластов, для нас наиболее пригодны были соединения, обладающие наибольшей величиной молекулярного коэффициента погашения (K_m), с тем, чтобы возможно было спектрофотометрическое определение минимальных количеств активных восстановителей, переживающих световой период. Этим требованиям отвечает дихлорфенолиндофенол (ДХФИ) с $K_m = 0,8 \cdot 10^5$ при 600 м μ и при pH = 7. Условия его применения для определения активности промытых хлоропластов разработаны (6). Фотохимическая активность определялась нами в отсутствие воздуха. Ведение опыта в аэробных условиях ведет к обратному окислению образующегося лейкосоединения ДХФИ, вероятно, ускоряющемуся при действии оксидаз, присутствующих в растворе. Течение фотореакции с воздухом и без него показано на рис. 1. «Зеленые растворы» из листьев фасоли обладали высокой активностью. При 10-минутном освещении без воздуха восстановление ДХФИ было практически полным.

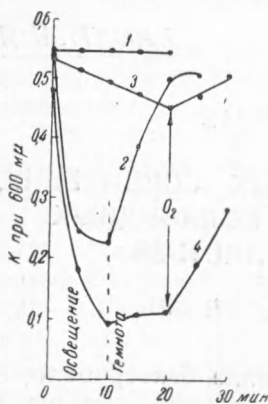


Рис. 1. Фотохимическое восстановление ДХФИ «зеленым раствором» с воздухом и без него. Совместный раствор: 3 мл «зеленого раствора» ($K = 1$ при 600 м μ) + 3 мл ДХФИ ($K = 1$ при 600 м μ). Освещение через красный светофильтр RG=2.1—растворы в темноте с воздухом (контроль), 2—освещение с воздухом, 3—растворы в темноте без воздуха; 4—освещение без воздуха; стрелка — пуск воздуха

Для обнаружения активных продуктов, переживающих период освещения, опыт ставился следующим образом. В вакуумную трубку с отводом особой формы, позволяющей ее установку в спектрофотометре Бекмана, вводили 3 мл «зеленого раствора» с $K = 1$ при 600 м μ , а в боковой отвод 3 мл раствора ДХФИ в фосфатном буфере с $K = 1$ при 600 м μ . Воздух эвакуировали (в течение 7 мин. вакуумным масляным насосом при взбалтывании) с тем, чтобы избежать обратного окисления промежуточных активных соединений. После эвакуации трубку с растворами оставляли стоять 3 мин. при 0°, после чего «зеленый раствор» освещали в фокусе конденсора 500-ваттной кинолампы через светофильтр RG-2 в течение 5 мин. при 0°. Через 1—5 сек. после выключения света к зеленому раствору из бокового отвода приливали ДХФИ и измеряли K при 600 м μ через 20—40 сек. после слива*. Для контроля проводили подобный опыт без освещения, приливая ДХФИ к эвакуированной суспензии, простоявшей 8 мин. в темноте при 0°. Разница $\Delta K = K_t - K_c$ в величине коэффициента погашения между контрольным темновым (K_t) и световым опытом (K_c) указывает на образование переживающих освещение активных продуктов. В результате десятков опытов были получены значения ΔK от 0,030 до 0,150. Величина ΔK в сильной степени зависит от физиологического состояния листьев и условий приготовления раствора. Подобные результаты были получены с растворами из промытых хлоропластов, но со значительно меньшей величиной эффекта ($\Delta K = 0,030 - 0,050$).

* Чтобы измерение вести при наименьшей погрешности показаний прибора ($K = 0,3 - 0,7$), в качестве «растворителя» ставили кювету с раствором ДХФИ с $K = 0,4 - 0,45$ при 600 м μ .

Для суждения о длительности жизни образованных активных соединений были проведены опыты со сливом ДХФИ через 30 сек., 1, 3 и 5 мин. после выключения освещения (стояние при 0°). Во всех этих опытах значение ΔK оставалось примерно одинаковым; активные продукты существуют более 5 мин. в условиях торможения обратных реакций (низкая температура, отсутствие воздуха).

В качестве акцептора водорода, кроме ДХФИ, были испытаны также красители с более низким окислительным потенциалом: тионин ($E_0 = +0,06$ в при рН 7), метиленовый голубой (+0,02 в), нильский синий (-0,12 в), рибофлавин (-0,22 в), сафранин (-0,29 в) и нейтральный красный (-0,30 в) с измерением поглощения света в соответствующем максимуме их спектра. При освещении без воздуха зеленого раствора, содержащего эти красители, полнота фотохимического восстановления красителей соответствовала ряду (в порядке уменьшения восстановления): тионин, метиленовый голубой, нильский синий; в случае других красителей степень восстановления была близка к ошибке опыта. Предварительно освещенные зеленые растворы восстанавливают тионин; значение ΔK при 600 м μ примерно вдвое меньше, чем в опытах с ДХФИ.

В опытах с приливанием ДХФИ наблюдается дальнейшее медленное восстановление в темноте (как в опыте с освещением, так и в темновом) обычно при сохранении той же величины ΔK . При впуске воздуха происходит обратное окисление лейкосоединения ДХФИ. Это свидетельствует о том, что наблюдаемое изменение K после освещения действительно связано с восстановлением ДХФИ. Однако с тем, чтобы исключить другие возможные причины изменения K при 600 м μ , были проведены опыты, определяющие устойчивость зеленого раствора к действию света без ДХФИ. Величина ΔK в этих опытах (т. е. в эвакуированных зеленых растворах) и при сливе 3 мл одного буферного раствора без ДХФИ была близка к погрешности измерения.

Темновое восстановление ДХФИ следует объяснить наличием веществ типа аскорбиновой кислоты и действием дегидразных ферментов за счет естественных доноров водорода. С тем чтобы проверить действие этих факторов, были поставлены контрольные опыты с нагретым в течение 30 мин. до 60° зеленым раствором, сохраняющим при этом способность восстанавливать ДХФИ в темноте, но в гораздо меньшей степени, чем исходный раствор. Это подтверждает наличие обоих факторов при темновом восстановлении ДХФИ. В работах Н. М. Сисакяна с сотрудниками была обнаружена высокая дегидразная активность вещества хлоропластов фасоли и других растений (6).

Итак, в описанных выше опытах получены следующие основные результаты.

1. Предварительное освещение при 0° эвакуированного зеленого раствора увеличивает количество активных веществ, приводящих к восстановлению ДХФИ, на 10—30% (по сравнению с контрольным опытом в темноте). Пуск воздуха приводит к обратному окислению образованного лейкосоединения ДХФИ*.

2. Подсчет молярной концентрации переживающих освещение активных фотопродуктов (исходя из эквимолекулярного соотношения

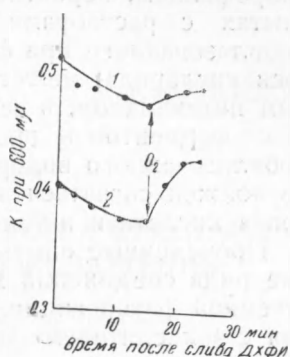


Рис. 2. Восстановление ДХФИ «зеленым раствором» (слив ДХФИ в темноте без воздуха). 1—до слива зеленый раствор стоял в темноте при 0°; 2—зеленый раствор до слива 5 мин. освещали при 0°. Стрелка — пуск воздуха

с лейко ДХФИ) показывает, что эта величина составляет 5—8% от концентрации хлорофилла, присутствующего в зеленом растворе.

3. Образуемые соединения не являются продуктами превращения хлорофилла, что следует из незначительных изменений коэффициента погашения хлорофилла в опыте; скорее всего, при реакции образуется восстановленная форма промежуточной системы, сопряженной с хлорофиллом, вероятно, по пути, показанному в наших модельных опытах с растворами (3). Конечным и промежуточным акцептором мобилизованного при фотореакции водорода воды (кроме выделяющегося кислорода) может быть система с наиболее высоким окислительным потенциалом; в зеленых растворах имеется весь набор клеточных ферментов и промежуточных систем. Захват фотохимически мобилизованного водорода, например дегидроаскорбиновой кислотой, не должен сказаться на результате наших опытов, так как аскорбиновая кислота и в темноте восстанавливает ДХФИ.

Проведенные опыты свидетельствуют о том, что фотовосстановление ряда соединений хлоропластами не происходит путем непосредственной фотореакции, а включает темновую стадию взаимодействия с «окислителем» активных продуктов, образованных при фотореакции.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и помощь.

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

Поступило
24 XI 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948); А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **66**, 663 (1949); А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949); В. Б. Евстигнеев и В. А. Гаврилова, ДАН, **74**, 781 (1950); А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, **81**, № 5 (1951); Л. М. Кособуцкая и А. А. Красновский, ДАН, **74**, 103 (1950).
² А. А. Красновский, ДАН, **58**, 617 (1947); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **58**, 1087 (1947); ³ А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); **73**, 1239 (1950); Г. П. Брин и А. А. Красновский, Биохимия, **16**, № 5 (1951); А. А. Красновский, Усп. биохим., **1**, 473 (1950).
⁴ В. Н. Любименко, Дневн. I Всеросс. съезда ботаников. П., 1921, стр. 47; Хемосинтез и фотосинтез в растительном мире, 1935.
⁵ A. S. Holt, R. Smith and C. S. French, Plant Physiology, **26**, 164 (1951).
⁶ Н. М. Сисакян, Ферментативная активность протоплазменных структур, изд. АН СССР, 1951; Н. М. Сисакян и К. Г. Чамова, ДАН, **67**, 337 (1949).
⁷ A. N. Mehler, Arch. of Biochem. and Biophys., **33**, 65 (1951).

* В недавней работе Мелер (?) не смог обнаружить переживающие период освещения активные продукты, что следует объяснить недостатками методики его опытов, проведенных в присутствии воздуха и при комнатной температуре, т. е. в условиях, благоприятствующих течению обратных реакций.