

А. А. КРАСНОВСКИЙ и К. К. ВОЙНОВСКАЯ

## УЧАСТИЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И ХЛОРОФИЛЛА А В РЕАКЦИЯХ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ВОДОРОДА В РАСТВОРЕ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 8 IX 1952)

В предыдущих работах нашей лаборатории было показано участие хлорофилла в сенсibilизированных им реакциях переноса водорода (электрона) (1, 2). В настоящем сообщении кратко описаны результаты систематического сравнительного исследования фотохимических окислительно-восстановительных реакций, сенсibilизированных бактериохлорофиллом, хлорофиллом а и соответствующими феофитинами в растворе. В качестве исходных восстановителей были взяты вещества, характерные для обмена веществ зеленых растений (аскорбиновая кислота) и пурпурных серобактерий (сернистый натрий), в качестве «окислителей» (акцепторов водорода) — не поглощающие в красной области спектра простетические группы дегидразных ферментов: рибофлавин, дифосфо-пиридин-нуклеотид (ДПН) и краситель сафранин Т.

Опыты велись в среде этилового спирта и пиридина, содержащих 15% воды; в водных растворителях лучше растворим  $\text{Na}_2\text{S}$ . Хлорофилл а и бактериохлорофилл были выделены, соответственно, из листьев крапивы и культуры бактерий *Rhodospseudomonas* с конечным хроматографическим разделением согласно краткой описанной нами методике (3). Феофитины были получены действием 10% соляной кислоты на эфирные растворы хлорофиллов. Освещение раствора реагирующих соединений производили в отсутствие воздуха, в области максимума поглощения хлорофилла или бактериохлорофилла (см. рис. 1); за ходом реакции следили путем измерений  $K$  восстанавливаемого соединения.

В вакуумную трубку особой формы, допускающей ее установку в кюветодержателе фотоэлектрического спектрофотометра, вводили 6—7 мл раствора с концентрацией пигмента-сенсibilизатора около  $10^{-5}$  мол/л, восстановителя около  $10^{-2}$  мол/л, сафранина или рибофлавина около  $10^{-4}$  мол/л ( $K = 0,5—0,8$ ). Опыт вели по следующей схеме: 1) раствор в трубке эвакуировали масляным насосом при энергичном взбалтывании в течение 3 мин.; 2) измеряли  $K$  в максимумах поглощения пигмента и акцептора водорода; 3) выдерживали от 30 мин. до 1 часа в темноте с тем, чтобы проконтролировать возможное течение темновой реакции; 4) снова измеряли  $K$  в максимумах поглощения пигмента и акцептора; 5) освещали раствор в течение 3 мин. в фокусе конденсора киноламп 500 вт на специальной термостатируемой установке при  $20^\circ$  (в опытах с хлорофиллом через светофильтр RG-2, в опытах с бактериохлорофиллом через RG-5); 6) снова измеряли  $K$ , оставляли на 9 мин. в темноте, проводя измерение  $K$  по ходу реакции; 7) наконец, пускали в трубку воздух и снова измеряли после 30 мин. стояния. Контрольные опыты в двойных системах: пигмент — восстановитель, акцептор водорода — восстановитель и пигмент — акцептор водорода ставили в тех же условиях.

<sup>1)</sup> В опытах по сенсibilизированному восстановлению ДПН (2) нужно

было констатировать сравнительно небольшие изменения поглощения при 340 м $\mu$ , так как молекулярный коэффициент погашения восстановленного ДПН при 340 м $\mu$  значительно меньше величины коэффициента погашения у красителей. В этом случае в вакуумную трубку вводили 1 мл водно-аммиачного раствора 3 мг козимазы с содержанием 25% ДПН, 3 мг аскорбиновой кислоты или сернистого натрия и 5 мл раствора пигмента в пиридине, затем эвакуировали 3 мин. масляным

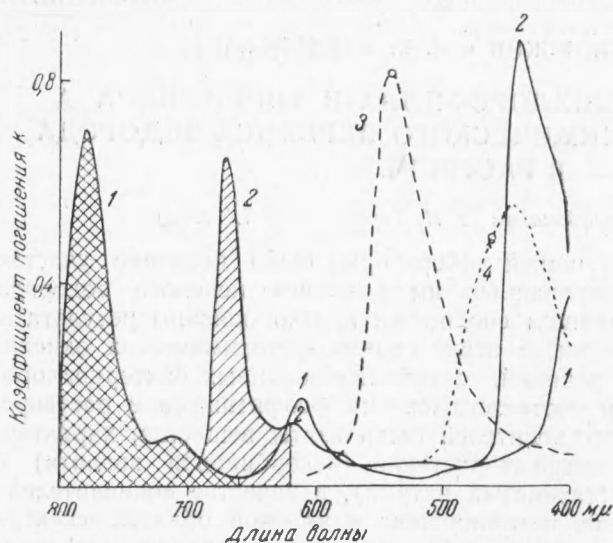


Рис. 1. Спектры поглощения: 1 — бактериохлорофилла, 2 — хлорофилла а, 3 — сафранина Т, 4 — рибофлавина в пиридине. Заштрихованы области спектра поглощения пигментов, в которых возбуждалась сенсibilизированная реакция. На спектральных кривых акцепторов обозначены точки, в которых вели измерения

аскорбиновой кислоты частично феофитинизируются (хлорофилл быстрее). б) Пигмент — акцептор водорода. Изменений обоих компонентов не наблюдается. в) Акцептор водорода — восстановитель. Исследованные соединения в темноте с аскорбиновой кислотой практически не реагируют ни в спирте, ни в пиридине; однако сернистый натрий уже в темноте восстанавливает рибофлавин и сафранин, наиболее явно в пиридиновом растворе.

2. Контрольные опыты в двойных системах при освещении в области поглощения пигментов: а) Пигмент — восстановитель. При освещении происходит обратимое фотохимическое восстановление пигментов, исследованное нами ранее; явное течение реакции наблюдается лишь в пиридине. Фотовзаимодействие хлорофилла с сернистым натрием невелико (реагирует не более 25% пигмента). б) Пигмент — акцептор водорода. Взаимодействия не наблюдается. в) Акцептор водорода — восстановитель. Так как эти соединения не поглощают в красной области спектра, пропускаемой светофильтрами RG-2 и RG-5, то результаты опытов те же, что и в темноте. Освещение в области собственного поглощения акцепторов водорода приводит к фотореакции, исследованной нами ранее (4).

3. Контрольные опыты в тройных системах в темноте. Нет существенных отличий от опытов с двойными системами в темноте.

4. Опыты в тройных системах при освещении в области поглощения пигментов (через светофильтры RG-2 и RG-5). а) Прежде всего нужно констатировать, что в присутствии

насосом, снимали спектр, освещали 3 мин. через соответствующий светофильтр и вновь снимали спектр.

Резюмируем результаты опытов.

1. Контрольные опыты в двойных системах в темноте (растворы пигментов и акцепторов водорода порознь в спирте и пиридине практически не изменяются): а) Пигмент — восстановитель. В течение часа темноты изменения практически не наблюдается. В спирте, содержащем воду, пигменты в присутствии аскор-

акцепторов водорода не наблюдается значительного падения максимума поглощения пигментов при фотореакции (падение не более 5—10%), что объясняется обратимым окислением фотовосстановленной формы пигментов акцепторами водорода. б) Хлорофилл а в спиртовом и пиридиновом растворе в присутствии аскорбиновой кислоты сенсibiliзирует восстановление до 50% рибофлавина и до 25% сафранина (от начального их количества), пуск воздуха приводит к полной регенерации рибофлавина и сафранина. Феофитин а ведет себя подобно. В присутствии  $\text{Na}_2\text{S}$  (вместо аскорбиновой кислоты) в пиридине наблюдалось более глубокое восстановление сафранина (до 80%) и рибофлавина (до 60%). в) Бактериохлорофилл в спирте и пиридине в присутствии аскорбиновой кислоты сенсibiliзирует восстановление до 25% рибофлавина и сафранина; в присутствии  $\text{Na}_2\text{S}$  в пиридиновом растворе восстановление акцепторов водорода идет глубже (до 70%). В спирте реакция с  $\text{Na}_2\text{S}$  идет своеобразно; в присутствии рибофлавина наблюдается почти полное выцветание бактериохлорофилла, тогда как с каждым из компонентов в отдельности реакция практически не идет. г) Бактериофеофитин в спирте в присутствии аскорбиновой кислоты почти не приводит к восстановлению рибофлавина и сафранина (5—7%); в присутствии  $\text{Na}_2\text{S}$  реагирует от 40 до 60% этих соединений. В пиридине с аскорбиновой кислотой реагирует до 60% рибофлавина и 25% сафранина; с  $\text{Na}_2\text{S}$  — до 70% рибофлавина и до 50% сафранина. д) Сенсibiliзированное восстановление ДПН аскорбиновой кислотой и сернистым натрием удается наблюдать лишь у хлорофилла а в соответствии с опытами одного из нас с Г. П. Брин, сделанными в 1948 г. (2). В случае бактериохлорофилла явного течения этой реакции не наблюдается (см. табл. 1). Таким образом, бактериохлорофилл и бактериофеофитин, так же как хлорофилл а и феофитин а, сенсibiliзируют в растворе окислительно-восстановительные реакции, связанные с переносом водорода (электрона). В случае хлорофилла в предыдущих работах лаборатории (1, 2) было показано прямыми опытами двухступенчатое течение реакции. Констатировать два этапа течения реакции удается вследствие достаточно длительной жизни активной фотовосстановленной формы хлорофилла. Однако при фотовосстановлении бактериохлорофилла обратная реакция идет столь быстро, что не удается измерить спектральные свойства фотопродукта (4), поэтому не удается осуществить раздельно второй этап процесса. Сходное поведение обоих пигментов дает основание полагать, что и в случае бактериохлорофилла сохраняется двухступенчатый механизм.

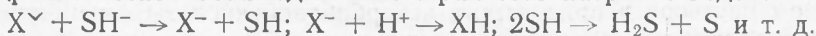
Таблица 1

Фотосенсibiliзированное восстановление дифосфопиридин нуклеотида (ДПН). Значения коэффициента погашения раствора  $K$

Длина волны в мμ	Хлорофилла			Бактериохлорофилл		
	$K$ до освещ.	$K$ после освещ.	$\Delta K$	$K$ до освещ.	$K$ после освещ.	$\Delta K$
360	0,595	0,798	0,203	0,660	0,628	-0,032
350	0,690	0,930	0,240	0,695	0,680	-0,015
345	0,775	1,020	0,245	0,751	0,751	0
340	0,880	1,140	0,260	0,840	0,870	0,030
335	1,040	1,280	0,240	0,970	1,040	0,070
330	1,280	1,500	0,220	1,140	1,290	0,150

Схему сенсibiliзированного восстановления, например рибофлавина (Р) аскорбиновой кислотой (АН), можно выразить следующим образом, где  $X^\vee$  — фотоактивированная молекула пигмента в длительно живущем (бирадикальном), по А. Н. Теренину (5), состоянии: 1) фотостадия  $X^\vee + \text{АН} \rightarrow \text{ХН} + \text{А}$ ; 2) темновые стадии:  $\text{ХН} + \text{Р} \rightarrow \text{Х} + \text{РН}$  и. т. д.

При использовании сернистого натрия вместо аскорбиновой кислоты восстановление происходит за счет отдачи электрона донора ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) и протона воды; вероятно участие в реакции ионов  $\text{SH}^-$ , образующихся при гидролитическом взаимодействии сернистого натрия с водой:



Осуществление в растворах бактериохлорофилла сенсibilизированных реакций, сходных с элементарными реакциями бактериального фотосинтеза, дает основания для предположения об его механизме; однако нужно объяснить то, что фотовосстановление бактериохлорофилла не удается наблюдать при действии многих доноров водорода бактериального фотосинтеза, а лишь при действии  $\text{Na}_2\text{S}$ ; так, неактивны яблочная кислота и пропиловый спирт (3). В этих случаях нужно предположить предварительную активацию этих соединений с вероятным участием специфических дегидраз, ведущую к образованию более активных продуктов обмена, которые могут фотохимически реагировать с бактериохлорофиллом.

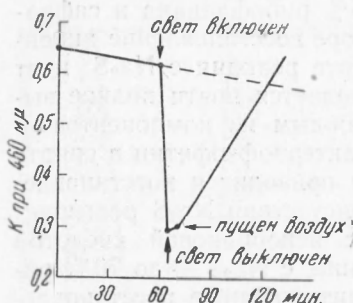


Рис. 2. Фотосенсибилизированное бактериохлорофиллом восстановление рибофлавина сернистым натрием

Так, в спиртовом растворе не удается наблюдать восстановления бактериохлорофилла сернистым натрием, однако добавка рибофлавина приводит к быстрому течению фотореакции. Темновое восстановление рибофлавина  $\text{Na}_2\text{S}$  ведет к предварительному образованию лейкоформы, вероятно реагирующей при освещении с бактериохлорофиллом.

В свете полученных результатов схему переноса водорода (электрона) при бактериальном фотосинтезе можно представить в общем случае так: донор водорода  $\rightarrow \Phi \rightarrow$  бактериохлорофилл  $\rightarrow \Phi' \rightarrow$  реакция восстановления  $\text{CO}_2$ .

Здесь символом  $\Phi$  обозначены ферментные и вспомогательные окислительно-восстановительные системы, переносящие водород (электрон). В недавних работах (7) было показано наличие у фотосинтезирующих бактерий ферментных систем, участвующих в переносе водорода. Фотостадия заключается в повышении восстановительного потенциала доноров посредством обратимо фотореагирующего бактериохлорофилла.

Наши исследования (6) показали, что бактериохлорофилл в клетке находится, главным образом, в агрегированном «полимерном» состоянии; в фотохимической реакции, вероятно, участвует находящаяся в равновесии с «полимерной» белково-липидная мономерная форма бактериохлорофилла; в этом случае приходится предположить возможность передачи энергии поглощенного кванта света между разными состояниями бактериохлорофилла. Обсуждение связанных с этим вопросов см. у А. Н. Теренина (8), которому мы приносим благодарность за советы и помощь.

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

Поступило  
31 VII 1952

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. А. Красновский, ДАН, 61, 91 (1948); 60, 421 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, 69, 393 (1949). <sup>2</sup> А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 73, 1239 (1950); 67, 325 (1949). <sup>3</sup> А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 81, 879 (1951). <sup>4</sup> А. А. Красновский, В. А. Гаврилова, ДАН, 81, 1105 (1951). <sup>5</sup> А. Н. Теренин, Acta physicochim. URSS, 18, 210 (1943); ЖФХ, 18, 1 (1944); Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947; Биохимия, 17, в. 1 (1952). <sup>6</sup> А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 389 (1952). <sup>7</sup> H. Gest, M. Kamen, Science, 109, 558 (1949). <sup>8</sup> А. Н. Теренин, Усп. физ. наук, 43, 347 (1951).