

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

**ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛОЙ ВОДЫ НА РЕАКЦИЮ
ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ФОТОХИМИЧЕСКУЮ
АКТИВНОСТЬ ВЕЩЕСТВА ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЕВ***(Представлено академиком А. Н. Терениным 31 III 1954)*

Коллоидные бесклеточные растворы вещества зеленых листьев, полученные путем механического диспергирования ткани, сохраняют способность к осуществлению части реакции фотосинтеза — фотохимическому выделению кислорода воды, сопряженному с восстановлением ряда окислителей (реакция Хилла). Хлорофилл, извлеченный из листьев, теряет способность к осуществлению такого рода процессов, но, как было показано в наших работах, способен к фотохимическим реакциям, идущим «против» темновых термодинамически равновесных условий, с запасанием энергии в фотопродуктах (¹, ²).

Работы нашей лаборатории показали, что фотохимическая стадия этих реакций определяется элементарным актом фотовосстановления (восприятия электрона) возбужденной светом молекулы хлорофилла. Можно предполагать, что дальнейшие стадии фотохимического переноса «водорода» в этих реакциях должны быть связаны с темновыми стадиями переноса протона (³). Известно, что в общем случае протолитические реакции идут медленнее в D₂O, чем в H₂O (⁴). Исследование фотосинтеза водорослей показало, что при световом насыщении фотосинтез весьма сильно замедляется в случае D₂O по сравнению с H₂O (⁵). Таким образом, различия в скорости фотохимического процесса, идущего в условиях светового насыщения в среде D₂O и H₂O, могут служить указанием на наличие темновой стадии переноса протона в этих реакциях.

Действие D₂O на фотохимическую активность вещества зеленых листьев. В качестве метода определения фотохимической активности нами была использована реакция фотохимического восстановления фенол-индофенола (⁶), окисленная форма которого окрашена в красный цвет при pH 6,5, а восстановленная форма не поглощает света в видимой области спектра. Буферные растворы pH 6,5, 1/30 M, на которых готовили растворы фенол-индофенола и растирали листья, получали путем растворения Na₂HPO₄ и KH₂PO₄ в D₂O и H₂O. «Зеленые растворы» получали растиранием 100 мг листьев огурцов, консервированных в жидком азоте, с 2,5 мл фосфатного буфера pH 6,5. Гомогенат фильтровали через полотно и центрифугировали при 2500 об/мин в течение 20 мин. Полученный «раствор» доводили буфером до коэффициента погашения $K = 0,7$, при 550 мμ. 0,5 мл этого «раствора» смешивали с 0,5 мл раствора фенол-индофенола в том же буфере с $K = 0,7$ при 550 мμ. Путем вариаций соотношения объема растворов фенол-индофенола и «зеленого раствора», приготовленных на D₂O и на H₂O, получали нужные концентрации D₂O в рабочей смеси. Измерения производили на фотоэлектрическом спектрофотометре с диафрагмированием щели по высоте раствора в кюветах с толщиной слоя 1 см. Раствор освещали в фокусе конденсора кинолампы 500 вт через красный

светофильтр РГ-2 (около 10^6 эрг/сек $\cdot$ см²) в условиях заведомого светового насыщения. Кювета при освещении помещалась в термостатирующее устройство. Опыты проводились при 20 и 30° ($\pm 0,1^\circ$). Снижение K

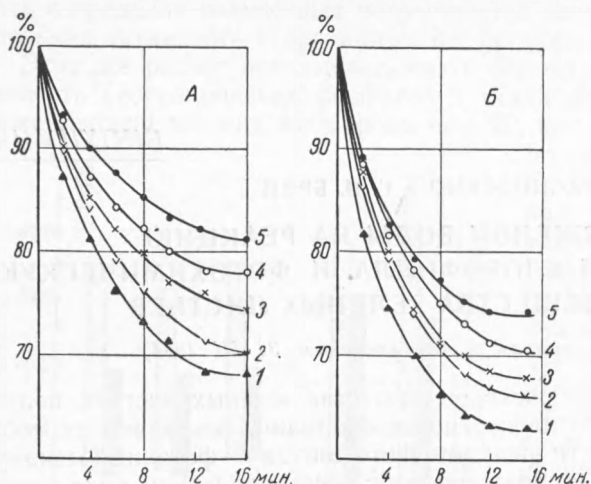


Рис. 1. Фотохимическая активность вещества зеленых листьев в системе H_2O-D_2O . А — при 20°, Б — при 30°. D_2O : 1 — 0%; 2 — 25%; 3 — 50%; 4 — 75%; 5 — около 100%

значения константы. В работах нашей лаборатории было показано, что освещение интенсивным красным светом ведет к потере фотохимической активности более быстро при 30°, чем при 20° (7). Наложение процесса фотоинактивации на процесс восстановления фенол-индофенола может объяснить непостоянство эффективного порядка реакции.

Рассмотрение кривых рис. 1 показывает, что D_2O замедляет реакцию восстановления фенол-индофенола при 20 и 30°. В условиях, близких к равновесию (через 16 мин.), при 20° в D_2O реагирует 38% фенол-индофенола от начального количества, а в случае H_2O 64%; при 30° в D_2O 54%, в H_2O 74%. Для того чтобы приблизительно охарактеризовать скорость процесса, мы подсчитали ее среднюю величину за первые 2 мин. реакции. При 20° скорость реакции в D_2O в 2 раза меньше, чем в H_2O ; при 30° в 1,3 раза меньше. Величина температурного коэффициента для D_2O равна 2,1, а для H_2O равна 1,3, что указывает на большую энергию активации, ограничивающей процесс реакции в случае D_2O . Уменьшение скорости реакции прямо пропорционально концентрации D_2O в смеси, что видно из рис. 2. Результаты опытов указывают на наличие темновой стадии переноса водорода в этом процессе; перенос дейтерия, требующий большей энергии активации, происходит медленнее. Эти выводы находятся в соответствии с работами нашей лаборатории, показавшими наличие световой стадии образования активных восстановленных соединений в «зеленых растворах» и темновой стадии восстановления окислителя (фенол-индофенола) этими активными соединениями.

при освещении было пропорционально количеству убывающего фенол-индофенола, что характеризовало величину фотохимической активности испытуемого раствора. На рис. 1 приведены результаты опытов. По оси ординат отложено K при 550 мμ в процентах от исходной величины; полному восстановлению фенол-индофенола соответствует падение K до 50%.

Попытки подсчета константы скорости реакций, исходя из моно- и бимолекулярной зависимости, не привели к получению постоянного

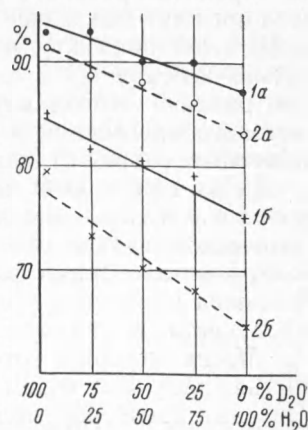


Рис. 2. Зависимость средней скорости реакции фотохимического восстановления фенол-индофенола от концентрации D_2O . 1 — опыты при 20°, 2 — при 30°; а — 2 мин., б — 10 мин.

Действие D_2O и H_2O на реакцию фотовосстановления хлорофилла аскорбиновой кислотой. В вакуумную трубку специальной формы, позволяющей вести измерения на фотоэлектрическом спектрофотометре, вводили 5 мг аскорбиновой кислоты, 5 мл раствора хлорофилла а (выделенного хроматографическим методом из листьев крапивы) в сухом пиридине с $K = 0,8$ при 670 м μ и 0,5 мл H_2O или D_2O . При введении избытка D_2O (по сравнению с аскорбиновой кислотой) происходит обмен лабильных атомов водорода этого соединения на дейтерий; равновесие сдвинуто в сторону дейтероаскорбиновой кислоты. После удаления воздуха методом, принятым в наших работах (1, 2), трубку попеременно вставляли в спектрофотометр и в осветительное устройство, которое состояло из 500-ваттной кинолампы, конденсора, светофильтра РГ-2 и термостатирующего приспособления, соединенного с ультратермостатом; опыты вели при 10^5 эрг/см $\cdot$ сек 2 .

После освещения следили за ходом обратной реакции в темноте, измеряя K при 670 м μ (см. рис. 3). Опыты показыва- ют, что присутствии D_2O весьма сильно влияет на скорость фотохимического процесса. Известный экспериментальный материал по фотохимии окислительно-восстановительных реакций указывает на то, что перенос электрона является чисто фотохимическим процессом; темновой стадией процесса является перенос протона (дейтерона) (3), требующий энергии активации. Вероятно, что перенос протона катализируется органическими основаниями, в среде которых наиболее глубоко идет реакция фотовосстановления. Каталитическое действие основания определяется скоростью восприятия и отдачи протона восстановленной форме пигмента; вероятность этих процессов связана с величиной сродства к протону основания (среды, катализатора) и партнеров реакции. В более слабых основаниях, например в этиловом спирте, количество образуемой «устойчивой» фотовосстановленной формы пигмента невелико (1) вследствие быстрой обратимости первичного фотоакта переноса электрона. Следует полагать, таким образом, что присоединение протона, катализируемое основаниями, к «электронной» форме стабилизирует фотопродукт, приводя к торможению обратной темновой реакции, требующей некоторой энергии активации, тогда как обратимый «возврат» электрона в темноте является весьма быстрым процессом. В недавних работах нашей лаборатории (9) исследовалась реакция фотовосстановления хлорофилла и его аналогов при помощи потенциометрического метода и при низкой температуре. В этих работах прямыми опытами показано наличие быстрого фотопроцесса и более медленной темновой стадии, приводящей в случае хлорофилла и феофитина к образованию «красной» восстановленной формы, являющейся, вероятно, «протонной» формой продукта фотовосстановления.

В свете изложенных фактов можно, таким образом, изобразить схемы элементарных процессов исследованных реакций, на которых разделены процессы переноса электрона (сплошная линия) и протона (пунктир). Обозначения: $X^{\cdot}$ — молекула хлорофилла в возбужденном, бирадикаль-

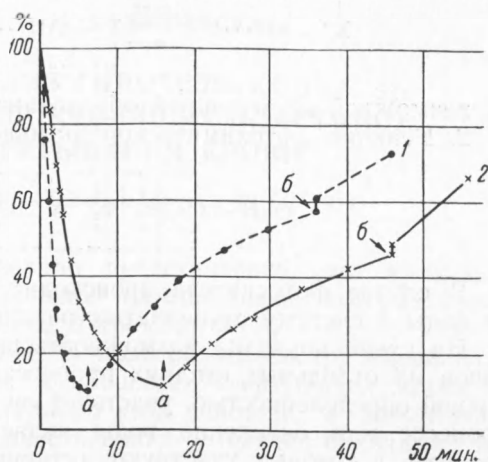
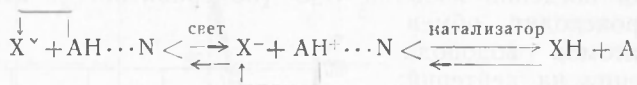


Рис. 3. Реакция фотовосстановления хлорофилла а аскорбиновой кислотой в пиридине с добавлением: 1 — 10% H_2O , 2 — 10% D_2O . а — конец освещения, б — пуск воздуха

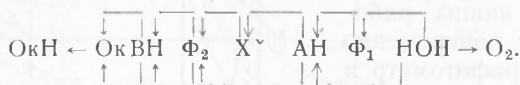
ном по А. Н. Теренину состоянию; АН и ВН — промежуточные окислительно-восстановительные системы; Φ_1 и Φ_2 — ферментативные системы, участвующие в переносе электронов и протонов; Ок — конечный окислитель, акцептор электрона и протона (водорода), в нашем случае фенол-индофенол.

1. Реакция фотовосстановления хлорофилла:



(с возможной дисмутацией образованных радикалов ХН и А).

2. Реакция фотохимической активности вещества листьев:



В случае фотосинтеза происходит перенос электронов и протонов от воды в систему ступенчатых реакций восстановления углекислоты.

На схеме показана возможность раздельного пути электронов и протонов на отдельных стадиях процесса. До сих пор не установлено с полной определенностью, участвует ли молекула воды в первичном фотопроцессе или окисление воды является следствием ферментативных реакций, в которых участвуют активные фотопродукты ⁽¹⁰⁾; на схеме показана последняя возможность.

Описанные в работе опыты указывают на то, что существенными чертами элементарных процессов исследованных реакций является сопряжение фотохимического переноса электрона, идущего с участием хлорофилла с темновыми (каталитическими) стадиями переноса протона.

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и помощь.

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

Поступило
5 III 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **64**, 663 (1949); **81**, 879 (1951); А. А. Красновский, В. А. Гаврилова, ДАН, **81**, 1105 (1951); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **89**, 527 (1953). ² А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); **73**, 1239 (1950); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109 (1952). ³ А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, Изд. АН СССР, 1947; Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 369 (1947). ⁴ А. Н. Бродский, Химия изотопов, Изд. АН СССР, 1952. ⁵ J. Curry, S. F. Trelease, Science, **82**, 18 (1935); F. N. Craig, S. F. Trelease, Am. J. Bot., **24**, 332 (1937); R. Pratt, S. F. Trelease, ibid., **25**, 133 (1938). ⁶ A. S. Holt, C. S. French, Arch. Biochem., **19**, 268 (1948). ⁷ А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **91**, 343 (1953). ⁸ А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **82**, 761 (1952). ⁹ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381 (1953); **95**, № 4 (1954). ¹⁰ А. А. Красновский, Усп. биол. хим., **1**, 473 (1950).