

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ и В. А. ГАВРИЛОВА

О ПЕРВИЧНОЙ СТАДИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 22 I 1954)

В предыдущем сообщении ⁽¹⁾ был приведен экспериментальный материал, дающий основание к предположению, что при фотовосстановлении пиридиновых растворов хлорофилла и родственных ему соединений, обнаруженном в работах А. А. Красновского ⁽²⁻⁴⁾, сначала появляется первичная, весьма лабильная восстановленная форма хлорофилла, влияющая на потенциал инертного металлического электрода, а появление красной восстановленной формы с максимумом поглощения при 525 м μ является уже вторичным темновым процессом. С целью проверки правильности подобного предположения был проведен ряд опытов, результаты которых излагаются в данном сообщении.

Для того чтобы окончательно убедиться, что понижение потенциала платинового или золотого электрода, опущенного в пиридиновый раствор пигмента, содержащий восстановитель, при освещении и обратное повышение его в темноте не является результатом только фотопроцессов, идущих на фазовой границе электрод — среда, а зависит от образования электродно-активной восстановленной формы пигмента во всей толще раствора, был проведен следующий опыт: в электродный сосуд, подобный описанному в предыдущем сообщении, но имеющий, кроме того, боковой отвод А (см. рис. 1, I), позволяющий путем поворота его на шлифе сливать в сосуд находящуюся в нем жидкость, наливался пиридиновый раствор феофитина (около $0,5 \cdot 10^{-4}$ мол/л), содержащий аскорбиновую кислоту (около $1,1 \cdot 10^{-2}$ мол/л). Феофитин в этом, так же как и в некоторых последующих опытах, брался вместо хлорофилла потому, что при отсутствии принципиального различия в способности к фотовосстановлению у этих пигментов скорость реакции с феофитином значительно больше ⁽⁵⁾, вследствие чего работа с ним приводит в ряде случаев к более резко выраженным результатам. После выкачивания воздуха при кипении раствора производилось измерение начальной разницы потенциалов, и затем раствор Б почти полностью переливался в А. В Б оставалось только очень небольшое количество раствора, достаточное для того, чтобы электрод находился в жидкости. Раствор в А освещался красным светом (500-ваттная кинолампа на расстоянии 25 см через конденсор и светофильтр RG-2) 1 минуту и сейчас же после выключения света переливался в Б. Измерения разницы потенциалов показали, что потенциал платинового электрода сразу заметно понижался (на 50—75 мв в наших опытах) и при стоянии в темноте посте-

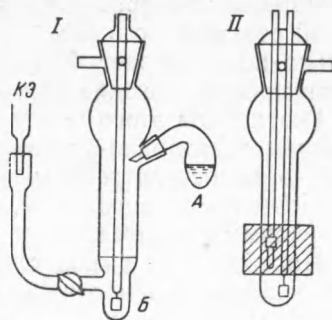


Рис. 1. Электродные сосуды.
КЭ — каломелевый электрод

пенно (3—5 мин.) повышался, т. е. наблюдалась точно такая же картина, как и при непосредственном освещении приэлектродного пространства.

Наличие двух стадий при фотохимическом восстановлении растворов хлорофилла было подтверждено нами опытами, проведенными при различных температурах. Освещение растворов производилось в прозрачном сосуде Дюара, наполненном охлаждающей смесью (твердая углекислота в ацетоне). На рис. 2 приведены полученные результаты. Рис. 2 А

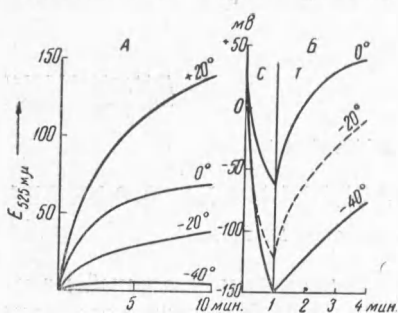


рис. 2. Влияние температуры: А — на скорость образования красной фотовосстановленной формы хлорофилла; Б — на изменение потенциала при освещении. С — свет, Т — темнота

показывает, что скорость образования красной восстановленной формы хлорофилла, количество которой характеризуется величиной поглощения в максимуме 525 м μ , сильно зависит от температуры. Уже при -40° (работать при температуре более низкой было невозможно вследствие замерзания пиридина) скорость эта настолько мала, что красная форма образуется только в незначительном количестве. Наоборот, понижение температуры в указанных пределах не только не уменьшает, но даже усиливает эффект изменения потенциала, наблюдаемый на электроде. Следует отметить, что потенциометрические измерения в данном случае проводились, во-первых, с более слабыми растворами хлорофилла, чем те, которые дают максимальный эффект ⁽¹⁾, для того чтобы иметь возможность с теми же растворами проводить и спектральные измерения; во-вторых, из-за необходимости охлаждения применялся отличный от ранее описанного кварцевый электродный сосуд с двумя платиновыми электродами, из которых один помещался несколько выше и закрывался снаружи черной бумагой, а другой находился ниже и пространство около него освещалось (рис. 1, II). Таким образом, разница потенциалов в данном случае измерялась между электродами, из которых один помещался в освещаемый, а другой в неосвещаемый раствор. Вполне возможно, что в этом случае на уменьшении величины фотоизменения потенциала при повышении температуры сказывалось не только увеличение скорости темновой реакции, но в некоторой степени и диффузионные явления, но это только подчеркивает факт, что при низкой температуре потенциальные изменения происходят при более благоприятных условиях.

Результаты этого опыта показывают совершенно ясно, что при образовании электродно-активной восстановленной формы хлорофилла речь идет о непосредственном фотохимическом процессе, скорость которого не зависит от температуры, тогда как образование красной восстановленной формы является вторичным темновым процессом.

Подобный же вывод следует из результатов проведенных нами опытов с применением освещения малой интенсивности и опытов с использованием растворов, содержащих очень малые количества восстановителя — аскорбиновой кислоты или фенилгидразина. В обоих случаях условия можно считать неблагоприятными для прохождения фотохимической реакции восстановления, и следовало ожидать, что восстановленная форма пигмента, образующаяся в первую стадию реакции, после кратковременного освещения будет содержаться в относительно большем количестве по сравнению с вторичной красной формой, чем это имеет место при обычных условиях, т. е. при достаточно сильном освещении и относительно больших количествах восстановителя.

Действительно, опыт показал, что в случае слабого освещения изменения потенциала электрода были относительно (по отношению к максимально возможным в данных условиях) гораздо больше, чем спектраль-

ные изменения, характеризующие появление красной восстановленной формы.

В табл. 1 приводятся данные, полученные при использовании малых количеств восстановителя. Как следует из цифр, даже в случае применения очень малых количеств аскорбиновой кислоты или фенилгидразина изменение потенциала при освещении было весьма значительным, тогда как красная форма практически не образовывалась.

Однако, по нашему мнению, наиболее убедительно показывает наличие по крайней мере двух стадий при фотохимическом восстановлении хлорофилла и его аналогов следующий опыт. Если помещенный в вакуумную трубку и эвакуированный раствор хлорофилла или феофитина в пиридине (10^{-4} — 10^{-5} мол/л, содержащий аскорбиновую кислоту ($5 \cdot 10^{-2}$ — 10^{-1} мол/л), охладить до -40° , осветить в течение 15 сек. сильным красным светом, затем быстро вставить трубку в спектрофотометр и измерять поглощение в области 525 мμ, то можно заметить, что поглощение это почти сразу начинает значительно увеличиваться. Для того чтобы не происходило запотевания трубки, имеющей температуру -40° , в каретке спектрофотометра Бекмана, трубка перед помещением в прибор опускалась на мгновение

Таблица 1

Изменение потенциала платинового электрода и поглощения при 525 мμ в присутствии малых количеств восстановителя при освещении раствора хлорофилла $a+b$ в пиридине

Восстановитель	мг на 5 мл раствора	Изменение потенциала при освещении*, мв	Поглощение в максимуме 525 мμ	
			до освещ.	после освещ.*
Без восстановителя	—	— 1	49	49
Аскорбиновая кислота	0,1	—168	62	63
Фенилгидразин . . .	0,01	— 78	39	41

* Освещение лампой 110 в, 500 вт при накале 80 в,* через конденсор, светофильтр RG-1; $t = 20^\circ$.

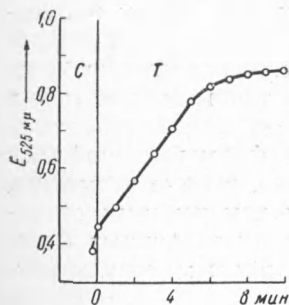


Рис. 3. Образование вторичной восстановленной формы феофитина из первичной, образовавшейся в результате освещения при -40°

в слабый раствор глицерина в спирте, в результате чего она покрывалась тонким слоем, устранявшим обмерзание. Увеличение поглощения продолжается в течение 8—9 мин. и затем прекращается. Соответствующие опыты с таким же охлаждением, но без предварительного освещения раствора ничего подобного не обнаруживали.

На рис. 3 графически представлена картина, наблюдаемая в таких опытах с феофитином, с которым, как было уже указано, благодаря большей скорости его фотовосстановления наблюдаемые явления особенно хорошо выражены. Хлорофилл ведет себя точно таким же образом, но изменения абсолютных значений коэффициентов погашения на свету и в темноте значительно меньше.

Результаты этого опыта могут быть объяснены, повидимому, только тем, что при низкой температуре в результате освещения образуется первичная фотовосстановленная форма пигмента, которая не может в этих условиях перейти в красную форму с максимумом 525 мμ, а также не может быстро превратиться обратно в первоначальный пигмент (наши опыты показали, что обратный ход потенциала в темноте замедляется при понижении температуры) и вследствие этого накапливается в некотором количестве. При стоянии в спектрофотометре, когда температура раствора постепенно поднимается, скорость образова-

ния вторичной формы увеличивается, что и обнаруживается по увеличению поглощения при 525 м μ и соответствующему изменению окраски раствора.

Подобный опыт проводился нами в различных вариантах, при различной интенсивности освещения, различных количествах восстановителя, и во всех случаях получалась качественно та же самая картина. Особенно сильное увеличение поглощения в темноте наблюдалось при значительных количествах восстановителя (до 100 мг аскорбиновой кислоты на 5 мл раствора).

Таким образом, в результате вышеописанных опытов, а также ряда других, заключающихся в сравнении хода изменения окислительно-восстановительного потенциала и изменения поглощения в различных условиях спектра фотовосстановленного раствора под влиянием различных факторов, можно считать определенно показанным, что фотовосстановление хлорофилла и его аналогов в присутствии органических оснований (в частности, в пиридиновом растворе), приводящее в случае хлорофилла к образованию красной восстановленной формы с максимумом поглощения 525 м μ , представляет собой процесс, проходящий не меньше, чем в две ступени, и включает в себя чисто фотохимическую и темновую стадии. В результате первой стадии образуется первичная весьма лабильная электродно-активная восстановленная форма хлорофилла, которая при нормальной температуре быстро переходит в результате темнового процесса во вторичную, обуславливающую красную окраску раствора.

Поскольку обратимое изменение потенциала при освещении наблюдается не только в пиридиновом растворе хлорофилла и восстановителя, но и в пиридиновых растворах хлорофилла в присутствии, кроме восстановителя, и других веществ, в частности некоторых акцепторов водорода, а также в растворах в некоторых других растворителях, т. е. в тех случаях, когда не удастся наблюдать появления красной формы, то мы вправе сделать вывод, что образование вышеуказанной лабильной электродно-активной фотовосстановленной формы пигмента является действительно первичной стадией фотовосстановления хлорофилла и его аналогов. В зависимости от условий среды, в которой происходит реакция, эта форма подвергается быстрым изменениям в том или другом направлении. Весьма вероятно, что именно эта форма и является «рабочей» формой при фотохимических реакциях восстановления, сенсibiliзируемых хлорофиллом, и, возможно, при фотохимической стадии фотосинтеза в растениях.

Природа этой первичной фотовосстановленной формы хлорофилла остается пока неясной. Судя по ее свойствам, однако, вполне возможно, что образование ее связано с чисто электронными изменениями структуры молекулы хлорофилла, тогда как в образовании вторичных форм участвуют атомы или молекулы и, в частности, протон и молекулы растворителя.

В заключение выражаем благодарность акад. А. Н. Теренину и А. А. Красновскому за ценные указания и обсуждение работы.

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

Поступило
19 I 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **92**, 381 (1953).
² А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). ³ А. А. Красновский, Г. П. Брин, К. К. Войновская, ДАН, **69**, 393 (1949). ⁴ А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **73**, 1239 (1950). ⁵ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, **74**, 781 (1950).