Доклады Академии наук СССР
1955. Том 100, № 1

БИОХИМИЯ

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ и В. А. ГАВРИЛОВА

ОБ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВАХ ХЛОРОФИЛЛОВ a И b

(Представлено академиком А. Н. Терениным 26 VI 1954)

Хлорофилловый компонент естественной системы пигментов всех высших наземных растений и большинства зеленых водорослей представляет собою смесь двух пигментов — хлорофиллов a и b, отличающихся по формуле только тем, что вместо метильной группы, имеющейся у хлорофилла a, хлорофилл b содержит карбонильную группу. Отношение количества хлорофилла a к количеству хлорофилла b у большинства нормальных листьев колеблется в довольно узких пределах от 2,5 до 3,5, но вообще для всех групп растений пределы эти расширяются: от 1,4 у зеленых водорослей до 5,5 у альпийских растений (1).

Обращает на себя внимание факт, что относительное количество хлорофилла b увеличено у тех растений, которые живут в неблагоприятных условиях освещения. Не вызывает особых сомнений, что такое явление объясняется приспособлением растений к лучшему использованию световой энергии, однако основанием к такому объяснению до сих пор считалось только то, что полосы поглощения хлорофилла b несколько сдвинуты по отношению к полосам хлорофилла a и в присутствии обоих пигментов достигается несколько лучшее поглощение красного и сине-фиолетового участков спектра. Однако если принять во внимание относительно небольшое увеличение поглощения света в присутствии хлорофилла b по сравнению с одним хлорофиллом a и большую концентрацию пигментов в хлоропластах, приводящую непосредственно в гранулах вообще к сильному поглощению по всему спектру, подобное объяснение не может считаться полностью удовлетворительным. Постоянное же присутствие, наряду с хлорофиллом a, хлорофилла b или, в тех случаях, когда он отсутствует, хлорофилла c или d (1) заставляет думать, что имеется какой-то более глубокий смысл в наличии этих дополнительных пигментов для фотосинтетической деятельности растений.

В нашей лаборатории получен значительный фактический материал, подтверждающий гипотезу (выдвинутую впервые К. А. Тимирязевым) о непосредственном химическом участии хлорофилла при фотохимическом акте фотосинтеза, и показано, что наиболее вероятным механизмом участия хлорофилла в этом акте будет его фотохимическое восстановление (2–4). Основываясь на этом материале, мы сочли целесообразным сравнить некоторые окислительно-восстановительные свойства обоих хлорофиллов. Чистые пигменты были получены хроматографическим разделением на колонке из сахарозы их смеси, выделенной из крапивы.

На рис. 1 приведены кривые, показывающие ход фотоокисления кислородом воздуха растворов хлорофиллов a и b и соответствующих феофитинов в спирте и пиридине. О ходе реакции судили по уменьшению поглощения в красном максимуме пигментов. Начальное поглощение для всех пигментов было одинаковым. В обоих растворителях хлорофилл a окисляется наиболее быстро, заметно медленнее идет окисление хлорофилла b и еще медленнее феофитинов. В случае спирта окисление феофи-

тинов идет настолько медленно, что за взятый промежуток времени невозможно заметить разницы между феофитином a и b. Однако по кривым, полученным для растворов в пиридине, ясно, что и в случае феофитинов компонент b окисляется медленнее.

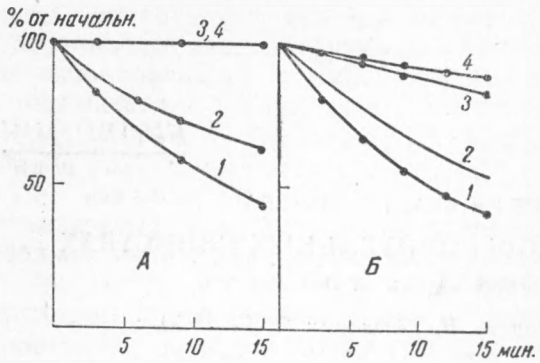


Рис. 1. Ход фотоокисления кислородом воздуха хлорофиллов a (*1*), b (*2*), феофитинов a (*3*) и b (*4*) в этаноле (*А*) и пиридине (*Б*). Освещение конденсированным светом 300-ваттной лампы через красный светофильтр RG-2. Концентрация пигментов $\sim 0{,}5 \cdot 10^{-5}$ мол / л

Обратная картина получается в случае фотовосстановления. На рис. 2 приведены кривые изменения величины поглощения в красном максимуме хлорофиллов a и b и феофитина (a + b) при освещении их пиридиновых растворов (освобожденных от кислорода) в присутствии аскорбиновой кислоты. Из кривых ясно, что хлорофилл b восстанавливается заметно скорее, чем хлорофилл a, хотя и значительно медленнее, чем феофитин. По наклону кривых в самом начале реакции можно вычислить, что скорости фотовосстановления хлорофилла a, b и феофитина в данных условиях относятся приблизительно, как 1 : 4 : 20.

Подобная же разница наблюдается и в случае электрометрических измерений потенциала платинового электрода, опущенного в пиридиновый

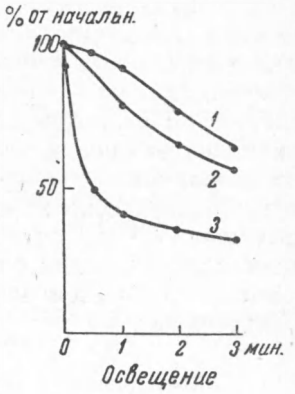


Рис. 2.

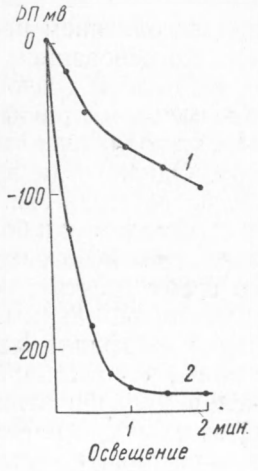


Рис. 3.

Рис. 2. Ход фотовосстановления аскорбиновой кислотой ($0{,}5 \cdot 10^{-2}$ мол/л) хлорофиллов a (*1*), b (*2*) и феофитина (a + b) (*3*). Освещение конденсированным светом лампы 300 вт, 110 в при накале 60 в. Светофильтр RG-2. Концентрация пигментов $\sim 0{,}5 \cdot 10^{-5}$ мол/л

Рис. 3. Изменение потенциала платинового электрода (ФП), опущенного в эвакуированный раствор хлорофилла с аскорбиновой кислотой a (*1*) и b (*2*) при освещении. Условия освещения см. рис. 1

раствор хлорофиллов, содержащий аскорбиновую кислоту (10^{-2} мол/л). Как нами было установлено, понижение потенциала при освещении подобных растворов свидетельствует об образовании первичной электродноактивной восстановленной формы хлорофилла ([3], [4]). На рис. 3 показано

изменение потенциала электрода при одинаковом освещении эвакуированных пиридиновых растворов хлорофиллов a и b, имеющих одинаковое начальное поглощение в красном максимуме ($E \cong 1{,}5$) при T —40°. Опыт проводился в кварцевом сосуде с двумя платиновыми электродами, из которых один затемнялся (4). Освещение производилось через красный светофильтр.

Из кривых ясно, что в случае хлорофилла b первичная восстановленная форма образуется гораздо быстрее и, очевидно, ее равновесное количество заметно больше, чем в случае хлорофилла a. Подобное положение связано, повидимому, с тем, что обратная реакция — справа налево, по уравнению $Хл + HR \overset{h\nu}{\rightleftarrows} ХлН + R$, происходит в случае хлорофилла a значительно скорее. Вероятно, восстановленная форма хлорофилла a (ХлН или $Хл^-$), так же как и неизмененный пигмент, обладает большей способностью к окислению, чем подобная форма хлорофилла b.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что хлорофилл b обладает заметно большей склонностью к фотовосстановлению и меньшей способностью к окислению, чем хлорофилл a. Между прочим, вывод о большой скорости восстановления хлорофилла b по сравнению с хлорофиллом a также и в темновых условиях был сделан в работе нашей лаборатории по исследованию реакции Тимирязева (восстановление хлорофилла цинковой пылью в присутствии уксусной кислоты (5)).

Так как нет сомнения, что роль хлорофилла при фотосинтезе заключается в сенсибилизации окислительно-восстановительной реакции, то представлялось интересным сравнить способность обоих хлорофиллов в этом отношении. В работах нашей лаборатории (6) была показана способность хлорофиллов к сенсибилизации фотохимических реакций, идущих против равновесных темновых условий, и, в частности, фотовосстановления аскорбиновой кислотой сафранина, рибофлавина и кодегидразы I.

Мы попытались провести количественное сравнение скорости фотовосстановления первых двух красителей при использовании в качестве сенсибилизаторов хлорофиллов a и b при комнатной и пониженной температурах. Полученные результаты, без сомнения, позволяют сделать вывод, что в случае хлорофилла b реакция проходит лучше. Однако количественного сравнения скоростей реакции сделать не удалось из-за быстрой обратной реакции. Поэтому мы использовали известную по ряду работ (7) реакцию сенсибилизированного восстановления метилового красного, но вместо метилового спирта в качестве растворителя применили пиридин и, вместо фенилгидразина в качестве донора водорода, аскорбиновую кислоту. Преимуществом этой реакции является то, что она протекает необратимо и изменение количества красителя может служить непосредственной мерой скорости реакции.

Кривая поглощения метилового красного в пиридине имеет максимум поглощения, лежащий в области 420—430 мμ. При 500 мμ поглощение также весьма значительно. Принимая во внимание, что при 500 мμ поглощение обоих хлорофиллов очень невелико, мы считали возможным судить о количестве присутствующего метилового красного по величине поглощения при этой длине волны. Для контроля, однако, мы проводили измерения также в области максимума поглощения метилового красного, вычитая поглощение хлорофилла в этой области, определенное в контрольном опыте. Опыт проводили при комнатной температуре, хотя следует отметить, что реакция хорошо идет и при —40°. Осветительная установка описана в (3).

На рис. 4 показан ход реакции фотовосстановления метилового красного в случае применения в качестве сенсибилизаторов хлорофиллов a и b. На оси ординат отложены изменения поглощения при 500 и 430 мμ. в процентах от первоначальной величины. Как следует из рисунка, реакция в случае хлорофилла b протекает значительно скорее. Если сравнить

скорости реакции в обоих случаях по наклону кривых или по времени, необходимому для того, чтобы восстановилось 50% красителя, то получается, что скорость реакции в случае хлорофилла b в 3,5—4 раза больше, чем в случае хлорофилла a, что близко совпадает с приведенными выше данными по разнице скоростей фотовосстановления самих пигментов. Это лишний раз свидетельствует о том, что процесс сенсибилизации хлорофиллами включает в себя в качестве промежуточной стадии образование восстановленной формы самих пигментов.

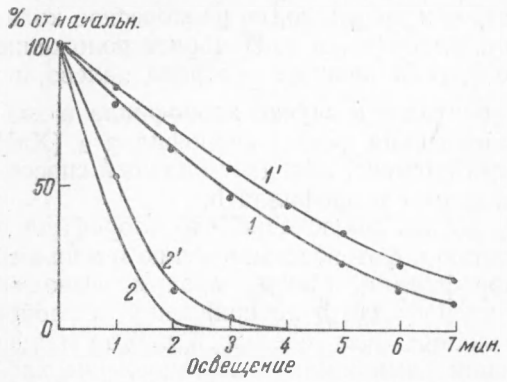


Рис. 4. Ход фотовосстановления метилового красного аскорбиновой кислотой ($0{,}5 \cdot 10^{-2}$ мол/л) при освещении красным светом (RG-2), сенсибилизированного хлорофиллом a (*1*) и b (*2*). Кривые *1*, *2* — по поглощению при 500 мμ; кривые *1*′ *2*′ — по поглощению при 430 мμ

Как уже было указано, на основании работ, проведенных за последние несколько лет в нашей лаборатории, можно считать весьма вероятным, что первичным фотохимическим актом фотосинтеза является фотовосстановление хлорофилла. Изложенные выше данные позволяют выдвинуть предположение, что наличие большего или меньшего количества хлорофилла b наряду с хлорофиллом a изменяет не только величину поглощения света, но и активность фотохимического аппарата растений. Чем больше хлорофилла b, тем интенсивнее происходит фотовосстановление и тем более слабым светом может удовлетвориться растение при равной производительности. Вполне возможно, что тот факт, что хлорофилл a обязательно присутствует в фотосинтезирующем растении, говорит о его специфической роли в этом процессе, а хлорофилл b (и, вероятно, хлорофилл c и d, окислительно-восстановительные свойства которых еще не изучены) является как бы вспомогательным приспособлением в вышеуказанном смысле слова. Большое количество хлорофилла b в обычных условиях является, повидимому, ненужным и даже вредным, так как возможно, что при слишком ярком для данных условий освещении он может разрушаться, подвергаясь необратимому восстановлению.

Естественно, что высказанное нами предположение нуждается в дополнительной проверке в природных условиях, так как возможно, что свойства хлорофиллов в растворе и в растении заметно отличаются.

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

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

Поступило
18 VI 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Е. Рабинович, Фотосинтез, 1, 1951, стр. 404 и сл. [2] А. А. Красновский и др., ДАН, 58, 617 (1947); 58, 1087 (1947); 60, 421 (1948); 61, 91 (1948); 63, 163 (1948); 67, 325 (1949); 69, 393 (1949); 73, 1239 (1950); 81, 223 (1951); 81, 1105 (1951); 87, 109 (1952); 87, 527 (1953). [3] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 92, 381 (1953). [4] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 95, 841 (1954); 96, 1201 (1954). [5] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, ДАН, 74, 103 (1950). [6] А. А. Красновский, ДАН, 61, 91 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 67, 325 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 87, 109 (1952). [7] J. G. Ghosh, S. B. Sen Gupta, J. Ind. Chem. Soc., 11, 65 (1934); R. Livingston, J. Phys. Coll. Chem., 51, 775 (1947).