Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 3

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Л. М. КОСОБУЦКАЯ

АКТИВНАЯ ФОРМА ХЛОРОФИЛЛА В КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРАХ ВЕЩЕСТВА ЗЕЛЕНЫХ ЛИСТЬЕВ И ЕЕ ОБРАТИМЫЕ ФОТОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 24 V 1955)

В наших работах ([1]) было установлено, что хлорофилл, свежеобразованный из протохлорофилла, находится в фотохимически активной форме, обладая в этом состоянии главным максимумом поглощения при 670 мμ; в процессе зеленения и накопления хлорофилла в гранулах его максимум поглощения постепенно перемещается к 678 мμ, что сопровождается ростом фотохимической устойчивости пигмента. Однако на всех стадиях образования и во «взрослых» растениях содержится фотохимически лабильная форма хлорофилла. Выцветание этой формы при сильном освещении приводит к значительному ослаблению флуоресценции листьев и к потере флуоресценции коллоидного раствора вещества зеленых листьев, теряющего при этом способность к реакции Хилла. Эти наблюдения привели нас к предположению, что именно активная флуоресцирующая форма хлорофилла в листьях растений непосредственно, химически участвует в реакциях фотосинтеза; равновесие между устойчивыми агрегированными и активными мономерными формами хлорофилла определяется физиологическими условиями, в которых находится растение. Опыты, в которых наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции хлорофилла при интенсивном освещении красных водорослей, свидетельствуют о наличии фотолабильной флуоресцирующей формы хлорофилла и у этих организмов ([2]).

В данной работе нам удалось найти условия, приводящие к увеличению количества активной формы хлорофилла в «зеленых» растворах» и показать ее способность к обратимым фотохимическим превращениям.

Работу мы вели преимущественно с листьями сахарной свеклы (сорта Уладовка и Верхнячка), выращенными из корней, в вазонах с почвой при двух вариантах освещения. Растения, росшие у окна, обладали темнозелеными листьями, с обычным состоянием хлорофилла (максимум поглощения 678 мμ); листья, выросшие на рассеянном свете в глубине комнаты, имели бледнозеленую окраску и большее количество мономерной формы, обладая максимумом поглощения при 672—673 мμ. Листья измельчали в ступке с фосфатными буферными растворами $^1/_{15}$ *M*, pH 4,8 и 8,5. Кашицу отжимали через полотно и центрифугировали 10 мин. при 3500 *g*. Полученный «зеленый раствор» смешивали с глицерином в отношении 4 : 6. Все эти операции вели при затемнении комнаты. Применение в качестве среды водного глицерина позволяет получить прозрачные и устойчивые (в коллоидном смысле) вязкие «растворы», допускающие точные спектрофотометрические измерения и работу при низких температурах. Добавление глицерина не влияет на положение красного максимума поглощения хлорофилла; водно-глицериновые растворы сохраняют способность к реакции Хилла (по фенолиндофенолу), что, в соответствии с нашими

предыдущими исследованиями ([3]), может служить указанием на сохранение естественного состояния хлорофилла. «Зеленый раствор» приводили к величине оптической плотности (K) 0,6—0,7 в красном максимуме поглощения при толщине слоя 1—1,2 см. Опыты вели в вакуумных трубках или круглых кюветах.

Трубку с «зеленым раствором» поочередно помещали в держатель спектрофотометра Бекмана и в стеклянный цилиндр, где циркулировала вода из термостата или, в опытах при —40°, в смесь ацетона с твердой углекислотой; трубку в цилиндре освещали 500-ваттной киноламповой через конденсор и красный светофильтр RG-2 (около 10^6 эрг/см^2 · сек).

В процессе выцветания наблюдали за кинетикой падения K в красном макимуме поглощения хлорофилла. Измерения вели по следующему графику времени (от начала освещения) : 5, 10, 15, 30, 60, 120, 300 сек. Интервал между окончанием освещения и измерением составлял обычно 10 сек.

Кинетика выцветания хлорофилла в водных и водно-глицериновых «зеленых растворах» указывает на то, что наряду с формами хлорофилла, устойчивыми к действию света, имеется лабильная форма хлорофилла, выцветающая в течение первых секунд освещения. Количество этой формы зависит от стадии развития растения, температуры и pH «раствора».

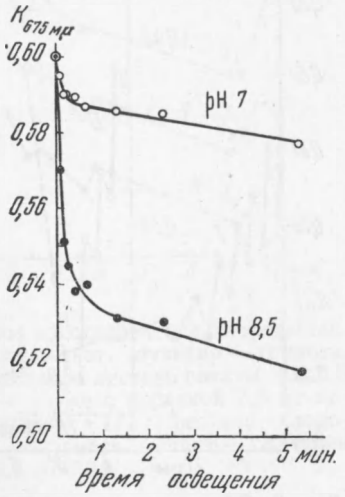


Рис. 1. Кинетика выцветания хлорофилла в «зеленых растворах» из листьев свеклы

У «зеленых растворов», приготовленных из светлозеленых листьев свеклы, количество быстро выцветающей формы мало зависит от pH в пределах pH 7—8,5, тогда как у «растворов» из темнозеленых листьев при pH 8,5 выцветает в 2—4 раза больше хлорофилла, чем при pH 7 (рис. 1). У молодых листьев тополя при pH 8,5 выцветает в 5 раз больше хлорофила, чем при pH 4,8. Количество выцветающей формы хлорофилла в ряде опытов достигало 20% от общего количества хлорофилла. При pH 8,5 наблюдается сдвиг красного максимума поглощения хлорофилла на 1—2 мμ в коротковолновую сторону, по сравнению с pH 7, что следует объяснить дезагрегацией белковолипоидного соединения хлорофилла.

Выцветание приводит к потере флуоресценции «зеленых растворов», наблюдаемой через светофильтр RG-5 при возбуждении линиями ртути 365 м. При выцветании наблюдается перемещение красного максимума поглощения на 1,5—2 мμ в длинноволновую сторону за счет разрушения «формы 670».

Скорость и глубина выцветания хлорофилла в «зеленых растворах» при 30° намного выше, чем при 20°, что может служить указанием на постоянный сдвиг равновесия между агрегированными и мономерными формами за счет быстрого выцветания последних. Нагревание выше 40—45°, увеличивая выцветание, приводит к необратимому изменению состояния хлорофилла.

Получение «зеленых растворов», содержащих большое количество активной формы хлорофилла, позволяет исследовать его фотохимические превращения теми методами, которые применялись в нашей лаборатории для исследования растворов хлорофилла в органических растворителях.

Освещение «зеленых растворов» в присутствии воздуха уже в первые секунды приводит к быстрому падению оптической плотности K в красном максимуме поглощения; после выключения света в темноте в течение не-

скольких секунд наблюдается некоторое обратное увеличение K; те же явления наблюдаются, если в среде присутствует аскорбиновая кислота, предварительно нейтрализованная Na_2HPO_4 (рис. 2). При —40° фотоокисление и обратная реакция также наблюдаются, но идут гораздо медленнее. Эти явления можно объяснить обратимым окислением хлорофилла кислородом воздуха, исследованным в работах нашей лаборатории. При фотоокислении ([4]), так же как и при темновом окислении перекисями ([5]), пигменты образуют наряду с продуктами деструктивного окисления лабильные окисленные соединения, из которых удается регенерировать пигменты в темноте при действии восстановителей.

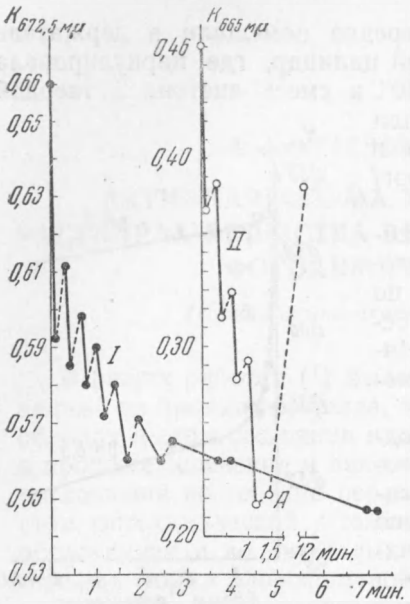


Рис. 2. Обратимое окисление хлорофилла. Сплошные линии — свет; пунктир — темнота. *I* — «зеленый раствор» листьев свеклы, pH 8,5; *II* — раствор хлорофилла a + b в смеси спирт — глицерин (3,5 : 6,5). В точке *A* введена аскорбиновая кислота

Те же явления, что и в «зеленых растворах», наблюдаются в случае применения спирто-глицериновых растворов хлорофилла a + b; повидимому, в этих опытах глицерин играет роль восстановителя, реагирующего с лабильными окисленными соединениями. Образование этих соединений сопровождается увеличением поглощения в области 520—550 mμ; их восстановление ведет к падению K в этой области спектра ([4, 5]).

В случае удаления воздуха при длительном откачивании водно-глицериновых «зеленых растворов» не удается наблюдать значительного необратимого выцветания хлорофилла. В результате кратковременного освещения наблюдается падение K в максимуме поглощения хлорофилла с возвращением K в темноте и после пуска воздуха (рис. 3). Потенциометрические измерения показывают изменение потенциала инертного электрода в «зеленом растворе» (без воздуха) в отрицательную сторону с быстрым возвращением в темноте.

Эти опыты указывают на то, что без воздуха происходит обратимое фотовосстановление хлорофилла присутствующими в среде донорами водорода. Введение аскорбиновой кислоты приводит к малому увеличению эффекта. При —40° не удается наблюдать обратимого выцветания. В спиртно-глицериновом растворе хлорофилла a+b наблюдаются те же явления (рис. 3). Изученная ранее в работах нашей лаборатории реакция обратимого фотовосстановления хлорофилла при 20° сопровождается падением максимумов поглощения хлорофилла с образованием долгоживущих фотопродуктов ([6]); при температуре —40° не удается наблюдать этого явления вследствие быстрых обратных реакций первичных фотопродуктов ([7]), что соответствует нашим наблюдениям над «зеленым раствором».

Таким образом, наши опыты показывают, что фотоактивная флуоресцирующая мономерная форма хлорофилла (вероятно, связанного с липопротеинами гранул) в «зеленых растворах» способна к обратимым фотохимическим превращениям, подобным превращениям «мономерных» форм хлорофилла в истинных растворах.

В заключение следует указать, что наши наблюдения позволяют предложить единое объяснение обширного материала по изучению флуоресценции хлорофилла в листьях (см., напр. ([8])), интерпретируемого в рабо-

тах ряда авторов главным образом в аспекте энергетики молекулы хлорофилла без учета возможности его биохимических превращений — изменения состояния и обратимых реакций флуоресцирующей мономерной формы пигмента. Мы приходим к тому выводу, что описанные изменения флуоресценции обычно являются следствием изменения состояния и фотохимических превращений флуоресцирующей мономерной формы хлорофилла. Обычно наблюдавшееся в работах ряда авторов начальное возрастание флуоресценции листьев при их освещении после периода темноты следует объяснить образованием «рабочей» мономерной формы хлорофилла (вероятно, за счет фотодезагрегации или новообразования). Падение флуоресценции при дальнейшем освещении листьев следует объяснить превращениями мономерной формы — уменьшением ее фотостационарной концентрации при вовлечении хлорофилла в систему реакций фотосинтеза ([1,9]).

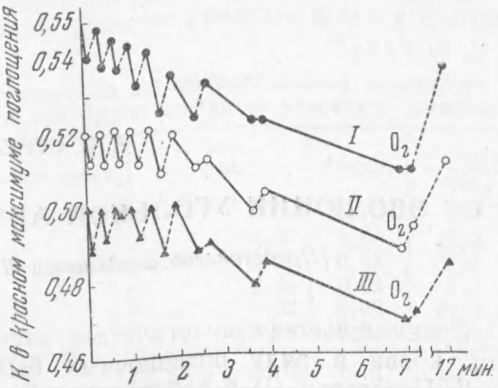


Рис. 3. Обратимое восстановление хлорофилла. Сплошные линии — свет, пунктир — темнота. *I* — «зеленый раствор» листьев свеклы, pH 8,5 ($K_{672,5}$ мμ); *II* — то же с добавкой 2,5 мг аскорбиновой кислоты; *III* — раствор хлорофилла $\frac{a}{b}$ a + b в смеси спирт — глицерин (3,5 : 6,5) (K_{665} мμ)

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Терешину за внимание и обсуждение работы.

Поступило
18 V 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 177 (1952); 91, 1343 (1953); Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, 19, 37 (1954); А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская, 92, 1201 (1953). [2] C. S. French, V. K. Young, J. Gen. Physiol., 35, 873 (1952). [3] Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, 18, 340 (1953). [4] А. А. Красновский, ДАН, 58, 617 (1947); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 81, 879 (1951). [5] А. А. Красновский, ДАН, 58, 835 (1947). [6] А. А. Красновский, ДАН, 60, 421 (1948). [7] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 92, 381 (1953); 95, 841 (1954); 98, 1017 (1954). [8] J. Franck, Symp. Soc. Exper. Biol., 5, 160 (1951); E. C. Wassink, Adv. Enzymol., 11, 91 (1951). [9] А. А. Красновский, Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 122 (1955).