

УДК 541.14+547.979.4

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
Н. Н. ДРОЗДОВА, Е. М. БОКУЧАВА

СТУПЕНЧАТОЕ ФОТООКИСЛЕНИЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА. СПЕКТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ПОГЛОЩЕНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФОРМ

Изучая фотоокисление бактериохлорофилла, мы описали условия обратимой (одноэлектронной) фотореакции и необратимого фотоокисления, ведущего к образованию хлорофиллоподобного продукта (1). В данной работе найдены условия более глубокого фотоокисления с образованием протохлорофиллоподобных продуктов; наряду со спектрами поглощения измеряны спектры флуоресценции промежуточных форм.

Условия обратимого фотоокисления пигментов *n*-бензохиноном описаны в наших предыдущих работах (2, 3). Необратимое окисление бактериохлорофилла проводили в толуоловых растворах в вакууме свежеприготовленным раствором *o*-бензохинона (10^{-4} М). Спектры флуоресценции измеряли при 20 и при -196° в прозрачном сосуде Дьюара при возбуждении линиями ртути 366 и 404 мк.

Спектры флуоресценции промежуточных продуктов фотоокисления. Продукт фотоокисления хлорофилла а *n*-бензохиноном имеет максимум поглощения при 480 мк и бактериохлорофилла — при 430 мк, поэтому можно было ожидать появления флуоресценции этих соединений в сине-зеленой области спектра. Опыт проводили в спирт-глицериновом растворе пигмента с *n*-бензохиноном (10^{-3} М). Вначале записывали спектр флуоресценции системы пигмент — *n*-бензохинон при -196° (до проведения фотореакции), затем повышали температуру до -70° и освещали красным светом 2 мин., — за это время проходило фотоокисление; сразу после освещения погружали трубку в жидкий азот, понижая температуру до -196° (чтобы остановить обратную реакцию) и опять записывали спектр флуоресценции. Во всех опытах как с бактериохлорофиллом, так и с хлорофиллом а после освещения наблюдалось обратимое уменьшение величины флуоресценции в главных максимумах (778 мк — бактериохлорофилл и 671 мк — хлорофилл а). Регенерация пигмента при обратной реакции (размораживание раствора) приводила к восстановлению первоначальной флуоресценции исходного пигмента.

В этих опытах не было обнаружено новых максимумов флуоресценции, которые можно было бы приписать продуктам фотоокисления. То, что ион-радикальные продукты «одноэлектронного» обратимого фотоокисления не обладают флуоресценцией, находится в соответствии с данными нашей лаборатории о том, что первичные ион-радикальные фотовосстановленные формы тетрапиррольных пигментов также не обладают люминесценцией (4). Следует указать, однако, что эти нефлуоресцирующие фотопродукты, тем не менее, фотохимически активируются под действием синего света (5), поэтому требует исследования возможность того, что их флуоресценция потушена избытком хинона более эффективно, чем у исходных пигментов. Флуоресценция устойчивых продуктов фотоокисления описана ниже.

Ступенчатое фотоокисление бактериохлорофилла *o*-бензохиноном. Скорость окисления бактериохлорофилла (10^{-5} М) *o*-бензохиноном зависит от концентрации окислителя; при концентрации

o-хинона $10^{-2} M$ при 20° реакция идет в темноте мгновенно с образованием хлорофиллоподобного продукта (¹, ⁶), при уменьшении концентрации до $10^{-4} M$ реакция в темноте идет медленно и ускоряется при освещении. В этих опытах раствор *o*-хинона получали непосредственно перед реакцией в головке вакуумной трубки Тунберга при взаимодействии окиси серебра и пирокатехина, растворенного в толуоле. В вакууме приливали раствор *o*-хинона к раствору пигмента и записывали спектры поглощения и флуоресценции до и после 25-минутного освещения через светофильтр КС-19 ($\lambda > 700$ м μ). За это время весь бактериохлорофилл превращается в хлорофиллоподобный продукт, имеющий характерные максимумы поглощения при 685 и 435 м μ (рис. 1). Этот продукт обладает интенсивной флуоресценцией при 692 м μ , и, кроме того, регистрируется небольшой максимум при 641 м μ . В случае применения светофильтров с различным положением длинноволновой границы пропускания можно проследить ступенчатые переходы фотопродуктов. Так, после фотоокисления бактериохлорофилла при освещении близким и.-к. светом (светофильтр КС-19, $\lambda > 700$ м μ) в «продукт 685» (П-685) мы продолжали освещение через светофильтр КС-17 ($\lambda > 670$ м μ), т. е. в максимуме первого фотопродукта, и наблюдали дальнейшее изменение спектров поглощения и флуоресценции. При этом часть П-685 переходит в П-636; за 40 мин.

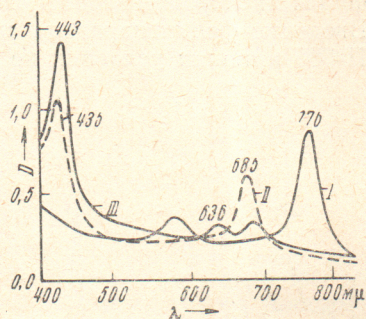


Рис. 1. Спектры поглощения при фотоокислении бактериохлорофилла *o*-бензохиноном в толуоле при 20° . Бактериохлорофилл $10^{-5} M$, *o*-хинон $10^{-4} M$. I — исходный спектр, II — после освещения через КС-19, III — после последующего освещения через КС-17

освещения происходит уменьшение поглощения при 685 м μ , появление новой полосы поглощения при 636 м μ и увеличение поглощения в синей области спектра со сдвигом максимума до 443 м μ (рис. 1). Подобные изменения наблюдаются и в спектре флуоресценции: уменьшение интенсивности в максимуме при 692 м μ и увеличение при 641 м μ (рис. 2), соответствующее максимуму поглощения «продукта 636». Дальнейшее освещение через светофильтр КС-13 ($\lambda > 630$ м μ) не вызывает существенных изменений поглощения и флуоресценции последнего устойчивого продукта. Совокупность спектральных данных не оставляет сомнения в том, что П-636 является аналогом протохлорофилла, образованным при дальнейшем

Таблица 1

	Бактериохлорофилл	1-й окисл. продукт — «хлорофилл»	2-й окисл. продукт — «протохлорофилл»	Хлорофилл а	Окисленный продукт — «протохлорофилл»
Максимумы поглощения, м μ	776	685	636	668	626
Максимумы флуоресценции, м μ	783	692	641	673	623

окисления хлорофиллоподобного П-685. Для сравнения мы проводили опыты по фотоокислению хлорофилла а ($10^{-5} M$) *o*-бензохиноном ($10^{-4} M$) при освещении красным светом (КС-17) при 20° в толуоле; при этом наблюдалось образование протохлорофиллоподобного продукта, имеющего максимум поглощения 626 м μ и соответствующий пик флуоресценции при 628 м μ . Возможно, что наряду с фотоокислением по месту полуизолированной связи идет окисление других группировок в молекуле пигмента. В табл. 1 приведены характерные максимумы поглощения и флу-

оресценции продуктов окисления бактериохлорофилла и хлорофилла а (*o*-хиноном в толуоле при 20°). Ранее была описана возможность образования протохлорофиллоподобного продукта при фотоокислении хлорофилла кислородом (8).

Действие восстановителей на окисленные формы бактериохлорофилла. Ранее в нашей лаборатории наблюдали, что добавление восстановителей к продуктам фотоокисления бактериохлорофилла кислородом ведет к частичной регенерации исходного пигмента (6, 7). Введение фенилгидразина после фотоокисления бактериохлорофилла до П-685 в наших условиях не приводит к регенерации пигмента в темно-

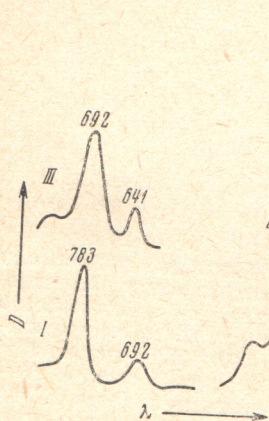


Рис. 2

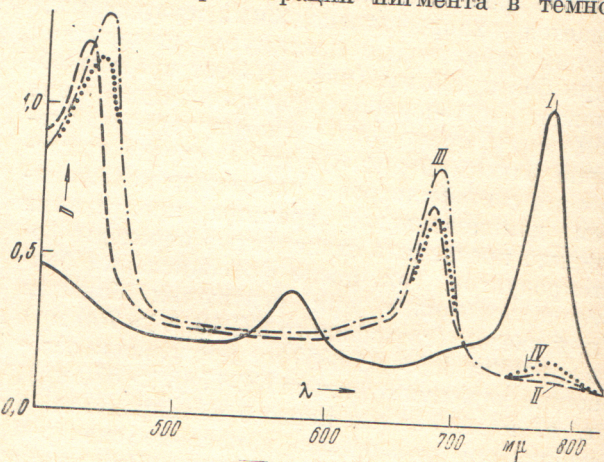


Рис. 3

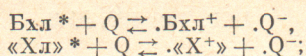
Рис. 2. Спектры флуоресценции при фотоокислении бактериохлорофилла *o*-бензохиноном в толуоле при 20°. Обозначения те же, что на рис. 1

Рис. 3. Действие аскорбиновой кислоты на окисленные формы бактериохлорофилла. I — исходный раствор, II — после освещения через КС-19, III — после добавления аскорбиновой кислоты и стояния в темноте, IV — после освещения с аскорбиновой кислотой в вакууме через интерференционный светофильтр (ИФ-675)

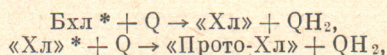
те; если освещать раствор после прибавления фенилгидразина красным светом в вакууме, то наблюдается уменьшение главного максимума пигмента при 685 мμ и увеличение поглощения в области 500—530 мμ, т. е. обычное образование красной фотовосстановленной формы хлорофилла; после выключения света и при пуске воздуха идет обратная реакция. Добавление к 4 мл раствора окисленного П-685 в толуоле 20 мг аскорбиновой кислоты в 2 мл пиридина приводит к увеличению поглощения в главном максимуме (до 10%) и незначительной регенерации бактериохлорофилла; стояние в темноте в течение 30 мин. не вызывает дальнейших изменений. Последующее освещение в вакууме красным светом приводит к уменьшению оптической плотности при 695 мμ и к дальнейшей регенерации бактериохлорофилла до 10% от исходного количества (рис. 3). Для сравнения подобный опыт проводили с хлорофиллом а. Добавление *o*-хинона и аскорбиновой кислоты и последующее освещение не привело к увеличению оптической плотности в области поглощения бактериохлорофилла; наблюдалось лишь обычное фотовосстановление хлорофилла с образованием «красной формы». Таким образом, продукты, образующиеся при фотоокислении бактериохлорофилла, отличаются по своим свойствам от хлорофилла а.

Итак, изложенный экспериментальный материал подтверждает, что при фотоокислении бактериохлорофилла *o*-бензохиноном наблюдается ступенчатое «двухэлектронное» фотоокисление до хлорофилло- и протохлорофиллоподобных продуктов; проведение же реакции в других условиях ведет к обратимому «одноэлектронному» фотопроцессу, что может быть выражено следующей схемой:

Обратимое фотоокисление:



необратимое фотоокисление:



где Q — окислитель (бензохинон).

Устойчивые продукты необратимого фотоокисления обладают характерными спектрами поглощения и люминесценции.

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

Поступило
12 VIII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, И. М. Сапожникова, ДАН, 177, 1225 (1967). ² А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 150, 1378 (1963); 153, 722 (1963). ³ Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, 30, 605 (1965). ⁴ Ю. Е. Ерохин, А. А. Красновский, Биофизика, 6, 392 (1961). ⁵ А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 188, № 6 (1969). ⁶ А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 81, 879 (1951). ⁷ А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, И. М. Сапожникова, ДАН, 172, 727 (1967). ⁸ И. И. Дилунг, Укр. хим. журн., 24, в. 2, 202 (1958).