

Г. Г. КОМИССАРОВ, А. Н. АСАНОВ, Ю. С. ШУМОВ

СВЕТОИНДУЦИРОВАННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ КИСЛОРОДА В ВОДНОЙ СУСПЕНЗИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 24 I 1972)

В предыдущих сообщениях (¹⁻³) высказано и обосновано предположение о том, что искусственные системы, представляющие собой пленку органического пигмента на поверхности инертного носителя (полимера, белка и др.) либо коллоидную частицу пигмента, способны к фоторазложению воды. В настоящей работе для экспериментального доказательства выделения кислорода в подобных системах был использован метод модулированной амперометрии, позволяющий регистрировать изменение концентрации O_2 , равное 10^{-16} мол/сек (^{4, 5}).

Собранная амперометрическая установка, принцип действия которой подробно описан в (^{5, 6}), состоит из трех основных частей — оптической, регистрирующей и кюветы (рис. 1). Оптическая часть предназначена для получения светового потока, модулированного по интенсивности $I = I_0(1 + \sin \omega t)$. В качестве источников света использовались лампа накаливания 450 вт, ксеноновая лампа ДКСШ-1000, а также импульсная лампа (длительность вспышки 20 мсек., энергия 100 дж). Синусоидальная модуляция светового потока с частотой 20 гц достигалась подбором формы отверстий в дисковом прерывателе, насаженном на ось мотора, который питается от стабилизированного источника напряжения. После прохождения системы линз и фильтров свет падает на кювету, в которой возникают колебания тока с амплитудой, пропорциональной скорости выделения кислорода, и частотой, равной частоте модуляции света.

С целью опробования установки были проведены измерения светоиндуцированного выделения кислорода хлореллой. Результаты этих опытов хорошо согласуются с известными литературными данными. Выполненные эксперименты показали высокую надежность и стабильность работы установки.

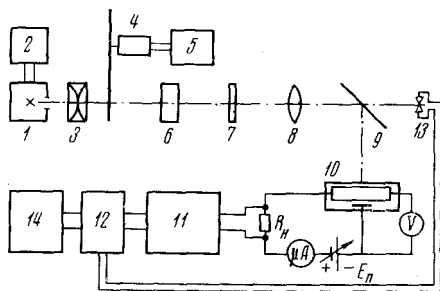


Рис. 1. Блок-схема установки для регистрации кислорода: 1 — источник света, 2 — блок питания, 3 — конденсор, 4 — мотор с прерывателем, 5 — блок питания мотора, 6 — тепловой фильтр, 7 — оптический фильтр, 8 — линза, 9 — зеркало, 10 — кювета, 11 — селективный усилитель, 12 — синхронный детектор, 13 — фотодиод, 14 — самописец

Методика приготовления образцов состояла в следующем. К навеске измельченной сухой крапивы (10 г) добавляли 50 мл органического растворителя (этиловый спирт, ацетон). Через 10—20 мин. экстракт отделяли фильтрованием. Полученную пигментную вытяжку смешивали с поропком носителя и удаляли растворитель испарением при комнатной температуре. В качестве носителей использовали окись алюминия, сефадекс, эмульсионный полиэтилен и полистирол. Полученные воздушно сухие

образцы помещали в вакуум-эксикатор для окончательного удаления растворителя. В ряде опытов была использована суспензия пигментов, приготовленная добавлением при интенсивном перемешивании к предварительно высушенной пигментной вытяжке 0,1 N раствора хлористого калия. Были получены также образцы, содержащие на поверхности носителя индивидуальные органические пигменты (спектрально чистый хлорофилл а, синтетический β-каротин, хлорированный фталоцианин алюминия фирмы «Eastman Kodak Co USA»). В случае нанесения пигментов непосредственно на платиновый электрод, предварительно подвергнутый тщательной очистке, использовали органические растворители (октан, спирт, ацетон).

Первые опыты, выполненные с полученными образцами, дали интересные результаты. Существенным явился факт наличия фотоотклика, временное изменение которого совпало с таковым для суспензии хлореллы. Естественно, что величина сигнала при этом была заметно ниже, чем у хлореллы. Так, при многократном повторении опытов величина фотоотклика у хлореллы составила $700 \div 1500$ мВ. В случае же использования пигментной вытяжки, находящейся на различных носителях, величина фотоотклика была на 1—2 порядка меньше. На полистироле эта величина равна $10 \div 15$ мВ, на полиэтилене $20 \div 30$ мВ, на сефадексе $25 \div 40$ мВ, на окиси алюминия $30 \div 40$ мВ. Наибольшая величина фотоотклика наблюдалась на коллоидных частицах пигментной вытяжки ($80 \div 100$ мВ). Следует отметить, что приведенные числа носят лишь иллюстративный характер, так как абсолютное значение фотоотклика определяется не природой носителя, а размером его зерен, т. е. наиболее мелкодисперсный носитель обладает наиболее развитой поверхностью, что и определяет интенсивность реакции. Однако сравнение величины фотоотклика для хлореллы и приготовленных образцов не лишено основания, поскольку интенсивность зеленой окраски в обоих случаях подбиралась одинаковой для получения приблизительно одних и тех же количеств хлорофилла (7).

Аналогия в свойствах природной и модельной системы проявляется также в отношении их к реагентам Хилла. Так, добавление в искусственную систему, содержащую пигментную вытяжку, солей трехвалентного железа приводит к заметному возрастанию сигнала при одновременном увеличении ресурса работы, который в отсутствие добавок равен 4—6 час.

В ходе экспериментов было обнаружено также, что величина фотоотклика в искусственных системах существенно зависит от времени темнового промежутка между двумя последующими вспышками. Такая же зависимость четко прослеживается и в суспензии хлореллы.

Поскольку в пигментной вытяжке содержится смесь пигментов, представлялось интересным определить, какой пигмент ответствен за появление фотоотклика. Для этой цели были сняты спектры действия, которые показали, что максимум фотоотклика располагается в красной области спектра, т. е. обусловлен хлорофиллом. В связи с этим были проведены эксперименты с системами, содержащими хлорофилл а на поверхности окиси алюминия. Оказалось, что величина фотоотклика в этом случае равна $30 \div 50$ мВ.

Так как фотовольтаические свойства хлорофилла близки к его синтетическому аналогу фталоцианину, то, естественно, большой интерес представляла попытка обнаружить фотоотклик в модельной системе, содержащей фталоцианин, т. е. использовать систему целиком абиогенного происхождения, в которой заведомо нет ни ферментов, ни кофакторов. Система фталоцианин — окись алюминия оказалась фотоактивной.

Из работ Жолио с сотрудниками (8) следует, что величина фотоотклика существенно зависит от расстояния между суспензией хлореллы и платиновым электродом. Поэтому целесообразно было провести ряд опытов, в которых пигмент наносился бы непосредственно на поверхность рабочего электрода для уменьшения этого расстояния до минимума. Величина фотоотклика в этих условиях повышалась до 250 мВ для пигментной вытяжки и до 5000 мВ для фталоцианина. Подобная система электролит — пигмент —

платиновый электрод составляет предмет наших многолетних исследований (^{2, 8-10}), в связи с чем применение метода модулированной амперометрии мы рассматриваем как новый методический подход к выяснению механизма эффекта Беккереля, причем этот метод представляется весьма удобным и перспективным. Отметим в связи с этим лишь, что на собранной установке нам удалось повторить ранее обнаруженные закономерности. Так, добавление каротина к пленке хлорофилла на поверхности электрода приводило к значительному возрастанию фотоотклика (до 750 мВ) (⁹).

В связи с изложенными выше результатами чрезвычайную остроту приобретает вопрос о причине появления фотоотклика в изученных систе-

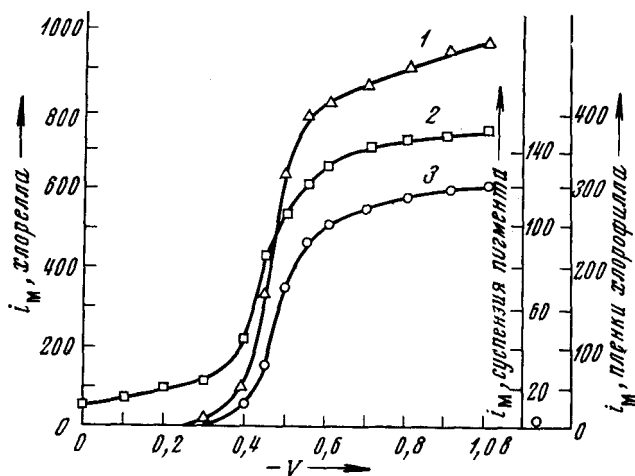


Рис. 2. Зависимость величины модулированного фотоотклика от катодной поляризации платинового электрода (в условных единицах): 1 — хлорелла, 2 — пленки хлорофилла на платиновом электроде, 3 — суспензия пигментной вытяжки

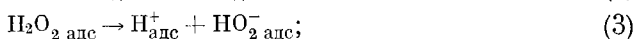
мах. Мы считаем, что регистрируемый сигнал обусловлен кислородом. Эта уверенность основывается на следующих фактах. Как для хлореллы, так и для искусственных систем получается одинаковая зависимость модулированного фотоотклика от величины катодной поляризации платинового электрода, которая характерна для восстановления кислорода на платине (рис. 2). Некоторые отличия в ходе этой зависимости наблюдаются в случае образцов, содержащих фталоцианин, что свидетельствует об отсутствии полной тождественности фотоэлектрохимических свойств хлорофилла и фталоцианина. Для того чтобы ответить на вопрос, происходит ли в модельных системах фотоиндуцированное выделение либо поглощение кислорода, в каждом опыте измерялась постоянная составляющая амперометрического тока. Эта составляющая уменьшилась в случае суспензии хлореллы, находящейся в темноте. Результат свидетельствует о темновом поглощении O_2 , которое обусловлено дыханием водоросли. При освещении же суспензии хлореллы и искусственных систем наблюдалось увеличение постоянной составляющей амперометрического тока, из чего следует однозначный вывод о том, что происходит выделение кислорода *. Контрольные опыты, вы-

* Уменьшение постоянной составляющей амперометрического тока на 1—2% при освещении мы наблюдали в свежеприготовленных пленках пигмента на поверхности платинового электрода. Если же пленка выдерживалась затем в темноте в течение двух и более часов, то постоянная составляющая увеличивалась при освещении на 8%. Такое изменение в поведении пленки связано, по-видимому, с изменением ее структуры на электроде, т. е. в первый момент времени ее можно рассматривать как непористую пленку, а по прошествии некоторого времени в ней образуются поры за счет расклинивающего давления электролита. При этом пленка по своим свойствам приближается к плотной суспензии частиц на поверхности электрода (^{2, 3}).

полненные с использованием носителя без пигмента, показали отсутствие фотоотклика.

Хотя полярографическое определение кислорода является специфичным и надежным методом, мы считаем необходимым проведение в дальнейшем масс-спектроскопических измерений, которые могут вызвать, однако, значительные трудности в силу малого выделения O_2 в искусственных системах.

Полученные результаты можно рассматривать как подтверждение ранее высказанного предположения о механизме первичных стадий фотосинтеза (^{1, 3, 11}). Пигментный слой хлоропласта покрыт адсорбированными ионами гидроксила и водорода (или адсорбированными молекулами воды). Под действием света в нем генерируются экситоны, которые распадаются на поверхности пигмента с образованием пары носителей заряда электрон — дырка. Эти носители, не удаляясь друг от друга, взаимодействуют с адсорбированными ионами: $H_{адс} + e \rightarrow H_{адс}$; $OH_{адс}^- + p \rightarrow OH_{адс}$. Водород восстанавливает затем НАДФ, который включается в темновой биохимический цикл фиксации углекислоты. С учетом представлений, изложенных в (^{1, 3, 11}), а также данных работ по электролизу и радиолитизу воды путь выделения кислорода можно представить в виде последовательности следующих реакций:



Реакции (1), (4), (6) являются световыми, а для протекания стадий (2), (3), (5) свет не нужен. Такая схема позволяет объяснить экспериментально наблюдаемое в фотосинтетических организмах максимальное выделение кислорода после третьей вспышки (¹²).

В заключение отметим, что полученные в настоящей работе результаты открывают новые возможности для объяснения механизма первичных стадий фотосинтеза, основанные на представлениях электрохимии полупроводников, фотокатализа, теории органических полупроводников.

Авторы выражают глубокую благодарность акад. Н. М. Эмануэлю за постоянное внимание к работе и ценные замечания, сделанные при написании статьи. Благодарим также проф. Х. Метцнера (Тюбингенский университет) за предоставление фталоцианина и Б. А. Киселева за предоставленный нам хлорофилл а.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
3 I 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. Г. Комиссаров, Докл. на II Всесоюз. биохимическом съезде, Ташкент, 1969. ² Г. Г. Комиссаров, Ю. С. Шумов, О. Л. Морозова, Биофизика, 14, 1120 (1970). ³ G. Komissarov, Sov. Sci. Rev., 285, Sept. 1971. ⁴ P. Joliot, C. R., 260, 5920 (1965). ⁵ P. Joliot, M. Hofnung, R. Chaband, J. Chim. Phys., 63, 1423 (1966). ⁶ P. Joliot, A. Joliot, Biochim. et biophys. acta, 153, 625 (1968). ⁷ Т. Н. Годнев, Хлорофилл, его строение и образование в растениях, Минск, 1963. ⁸ Г. Г. Комиссаров, Ю. С. Шумов, ДАН, 171, 1205 (1966). ⁹ Г. Г. Комиссаров, Ю. С. Шумов, Л. М. Атаманчук, Биофизика, 13, 324 (1968). ¹⁰ Ю. С. Шумов, Г. Г. Комиссаров, Биофизика, 13, 984 (1968). ¹¹ Г. Г. Комиссаров, Тез. докл., сборн. Проблемы биофотохимии, М., 1970. ¹² P. Joliot, A. Joliot et al., Photochem. Photobiol., 14, 287 (1971).