Доклады Академии наук СССР
1973. Том 208, № 1

УДК 581.132

БИОХИМИЯ

О. Я. КОРОЛЕВА, Д. И. САПОЖНИКОВ

О БЫСТРОЙ И МЕДЛЕННОЙ РЕАКЦИЯХ ЭПОКСИДАЦИИ ЗЕАКСАНТИНА В ВИОЛАКСАНТИНОВОМ ЦИКЛЕ

(Представлено академиком А. И. Белозерским 27 IV 1972)

На свету в зеленой пластиде совершается реакция дезэпоксидации виолаксантина. При выключении света в результате реакции эпоксидации содержание виолаксантина достигает исходного темнового уровня. Реакция эпоксидации в темноте протекает довольно длительное время ([1], [2]). Кривая, отражающая ход реакции эпоксидации, имеет вид гиперболы. Мы предположили, что этот факт можно объяснить существованием двух протекающих с различной скоростью реакций эпоксидации. С целью проверки этого предположения было проведено детальное изучение кинетики реакции эпоксидации.

Объектами исследования служили высечки из листьев гортензии (Hydrangea hortensis L.) и пализоты (Palisita mannii Cl.), выращенных в оранжерее Ботанического института АН СССР. Высечки листьев выдерживали в темноте 1 час. для получения выравненного материала, после чего одна проба бралась для анализа (исходный темновой вариант). Освещение проб проводили на световой установке, где источником света была лампа накаливания ЗН-8, мощностью 300 вт. Освещенность составляла 40 тыс. люксов, длительность экспозиции — 20 мин. По окончании освещения одну пробу брали в анализ для определения реакции дезэпоксидации (световой вариант), остальные пробы помещались в темноту, и через определенные промежутки времени отдельные пробы фиксировали для последующего анализа. Фиксация проб проводилась этанолом, охлажденным твердой углекислотой до $-70°$. Содержание ксантофиллов определяли с помощью принятого в нашей лаборатории метода хроматографии в тонком слое ([3]).

Результаты опытов по исследованию кинетики реакции эпоксидации представлены на рис. 1. Мы видим, что в течение первых 30 сек. после выключения света продолжается реакция дезэпоксидации. Затем наблюдается быстрое изменение содержания ксантофиллов, соответствующее реакции эпоксидации. Это колебание имеет максимум при одноминутной темновой экспозиции, и ко второй минуте оно затухает. Некоторое время (до 5 мин.) содержание пигментов не изменяется, а затем начинается обычная медленная реакция эпоксидации зеаксантина, которая наблюдается в течение 60 мин.

Резко отличный характер двух участков кривой, отражающей изменения содержания ксантофиллов после выключения света, подтверждает высказанное ранее предположение о существовании двоякого рода реакций эпоксидации.

На основании работы Хагера ([4]) было известно, что *п*-хлормеркурибензоат (*п*-ХМБ) не оказывает ингибирующего действия на реакцию эпоксидации. К сожалению, в этой работе не было указано время осуществления реакции эпоксидации; насколько можно судить по другой работе Хагера ([2]), автор не изучал эпоксидацию при выдерживании в темноте в течение времени короче 2 мин.

Поэтому мы решили испытать действием *п*-ХМБ на быструю реакцию эпоксидации (рис. 1, *Б*).

Как видно из графика, примененный ингибитор сводит на нет колебание содержания ксантофиллов, наблюдаемое на первых двух минутах после выключения света. При этом отмечается некоторое усиление последействия света в течение первых 30 сек. темноты, а также усиление пря-

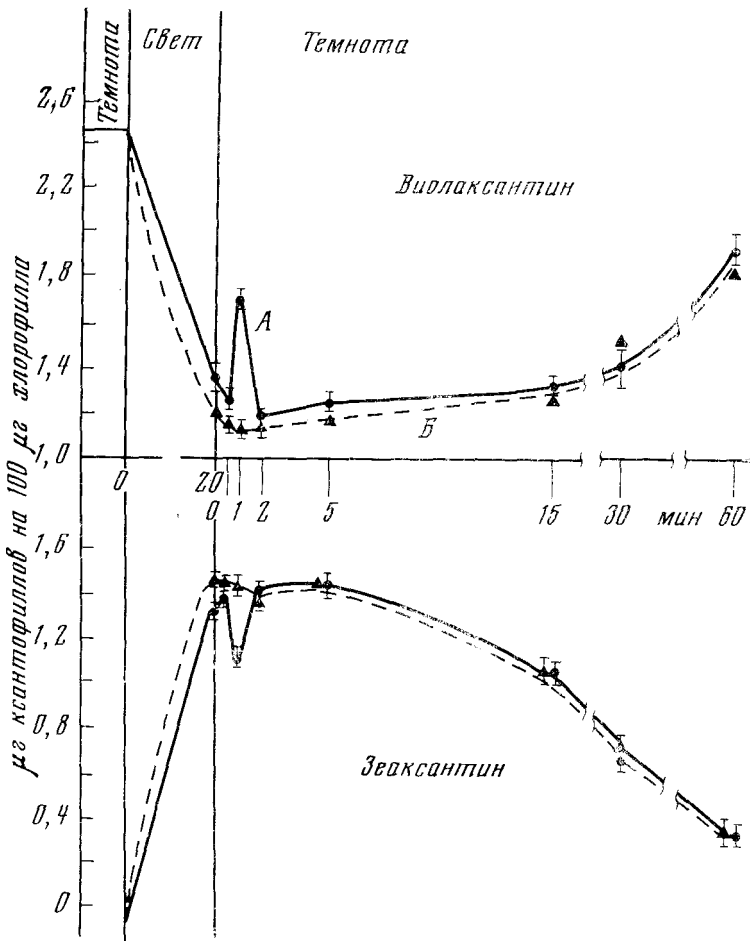

Рис. 1. Кинетика реакций виолаксантинового цикла в листьях гортензии. *А* — вода, *Б* — *п*-ХМБ (10^{-4} мол/л)

мой реакции. На медленную обратную реакцию эпоксидации *п*-ХМБ не оказывал влияния.

Известно, что ингибирующее действие *п*-ХМБ на сульфгидрильные группы ферментов снимается цистеином ([5], [6]). Чтобы убедиться в том, что *п*-ХМБ специфически тормозил в наших опытах ферментативную реакцию, осуществляющую быструю эпоксидацию, мы поставили следующий опыт. Пробы, инфильтрованные *п*-ХМБ, помещали на раствор цистеина (10^{-5} *М*) за 30 мин. перед освещением. Как видно из рис. 2, колебание быстрой обратной реакции, подавленное *п*-ХМБ, восстанавливается при введении цистеина. При этом происходит сдвиг по фазе колебания с первой минуты темноты на вторую. Из результатов этих опытов можно сделать вывод, что быструю обратную реакцию осуществляет ферментная система, для функционирования которой важную роль играют сульфгидрильные группы.

Так как *п*-ХМБ ингибировал быструю обратную реакцию и не влиял на медленную, мы предположили, что характер этих реакций различен. В связи с этим представлялось важным испытать действие ингибитора

медленной обратной реакции — салицилальдоксима (СА) на быструю обратную реакцию. Ингибитор в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ мол/л инфильтрировали в пробы за 30 мин. перед освещением. Результаты этой серии опытов представлены на рис. 3, из которого видно, что в присутствии СА быстрая эпоксидация происходила более интенсивно и при этом наблюдалось некоторое подавление реакции дезэпоксидации.

Таким образом, на основании результатов настоящей работы можно прийти к заключению о том, что в осуществлении виолаксантинового

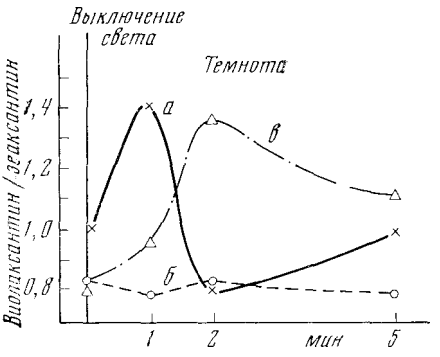

Рис. 2

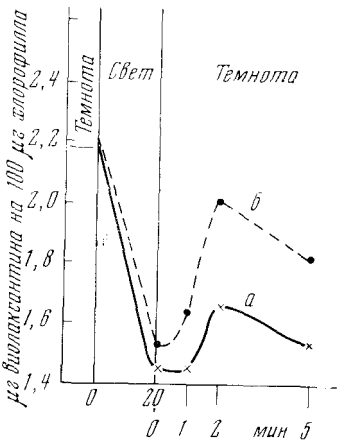

Рис. 3

Рис. 2. Снятие цистеином ингибирующего действия *n*-ХМБ на быструю реакцию эпоксидации в листьях гортензии. *а* — вода, *б* — *n*-ХМБ (10^{-4} мол/л), *в* — *n*-ХМБ (10^{-4} мол/л) + цистеин (10^{-3} мол/л)

Рис. 3. Действие салицилальдоксима на быструю реакцию эпоксидации в листьях пализоты. *а* — вода, *б* — СА ($5 \cdot 10^{-3}$ мол/л)

цикла могут участвовать две реакции эпоксидации. Эти реакции отличаются как по скорости, так и по чувствительности к различным ингибиторам.

Для осуществления виолаксантинового цикла необходимо, чтобы на свету происходила постоянная регенерация эпоксидных групп. Такая регенерация обеспечивается, по всей вероятности, быстрой эпоксидацией. Совокупность реакций эпоксидации и дезэпоксидации образует циклический процесс, имеющий на свету автоколебательный характер. После выключения света происходит затухание колебаний; в темноте в течение некоторого времени наблюдаются индуцированные светом реакции превращения ксантофиллов. В условиях наших опытов нам удалось зарегистрировать одно из таких колебаний, приходящееся на период времени, равный одной-двум минутам. К этому времени, по-видимому, прекращается последействие света и эпоксидация начинает осуществляться за счет чисто темновых процессов.

Дальнейшие исследования с помощью более чувствительных методов должны позволить обнаружить индуцированные светом колебания с меньшим периодом времени.

Ботанический институт им. В. Л. Комарова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
24 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Д. И. Саножников, Т. А. Красовская, А. Н. Маевская, ДАН, 113, 2, 456 (1957). [2] A. Hager, Planta (Berl.), 74, 2, 148 (1967). [3] Г. А. Корнюшенко, Д. И. Саножников, В сборн. Методы комплексного изучения фотосинтеза, Л., 1969. [4] A. Hager, Ber. Deutsch. bot. Ges., 79, H. 11, 94 (1966). [5] E. S. G. Barron, S. Levine, Arch. Biochem. and Biophys., 41, 175 (1952). [6] W. A. Bulen, Arch. Biochem. and Biophys., 62, 173 (1956).