

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

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА b ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS

Новый бактериальный хлорофилл был открыт Аймеллен и Йенсен (^{1, 2}) в группе пурпурных несерных бактерий и назван бактериохлорофиллом b. Химическая структура его неизвестна (³).

В настоящей работе описаны результаты исследования фотохимических превращений бактериохлорофилла b в сравнении с изученными ранее в нашей лаборатории фотохимическими свойствами бактериохлорофилла a.

Использовали штамм *Rhodopseudomonas viridis*, любезно предоставленный нам проф. Е. Н. Кондратьевой и В. Э. Успенской (кафедра микробиологии Московского университета). Условия выращивания культуры соответствовали описанным ранее (¹); клетки собирали центрифугированием и выделяли пигмент по методике, принятой для получения бактериохлорофилла a и видоизмененной с учетом большой лабильности нового пигмента. Экстракцию пигмента из клеток бактерий проводили при 0° метанолом, содержащим незначительное количество сернистого натрия (при сохранении pH 7). Все процедуры по выделению и хроматографию проводили при затемнении и по возможности быстро. Освещение растворов производили красным светом кинолампы 300 вт через конденсор и светофильтр КС-19, пропускающий свет длиннее 700 мμ. Максимальная интенсивность света в опытах 10^5 эрг/(см²·сек). Источником синего света служил осветитель ОИ-18 (линии возбуждения ртутной лампы 404 и 436 мμ) с фильтрами ФС-1, ВС-8 и СЗС-7. Спектры поглощения регистрировали на модифицированном спектрофотометре СФ-14, чувствительном в близкой инфракрасной области (до 900 мμ). Измерение окислительно-восстановительного потенциала при фотореакции наблюдали по методике, принятой в нашей лаборатории.

При фотоокислении бактериохлорофилла b кислородом воздуха в спирте, толуоле и ацетоне при 20 и — 70° наблюдались следующие спектральные изменения: за 25—30 сек. освещения происходило уменьшение поглощения в области главного максимума пигмента и появление новых полос поглощения в области 440, 500—600 и 680 мμ. При добавлении в темноте аскорбиновой кислоты происходила регенерация исходного бактериохлорофилла (до 30—40%). Реакция с бактериохлорофиллом a в тех же условиях идет в 2—3 раза медленнее с образованием продуктов, поглощающих при 430, 550—700 мμ. Регенерация исходного пигмента аскорбиновой кислотой в этом случае более полная (до 80%); не удается наблюдать образования хлорофиллоподобного продукта, с максимумом поглощения при 680 мμ, с чем, очевидно, и связана большая обратимость реакции. В этих опытах была обнаружена, наряду с продуктами обратимого окисления, значительная склонность бактериохлорофилла b к быстрому необратимому фотоокислению с образованием устойчивого продукта «680»: это свойство характерно лишь для бактериохлорофилла b.

Исследование взаимодействия бактериохлорофилла b с o-хиноном показало, что пигмент обладает значительно большей реакционной способ-

ностью, чем бактериохлорофилл а в тех же условиях. Окисление проводили по описанной ранее методике (⁴, ⁵). В ацетоне при 20° наблюдали световое (25—30 сек.) окисление бактериохлорофилла b, которое проявлялось в полном исчезновении главного максимума пигмента (795 мμ) и появлении новых полос поглощения при 440 и 680 мμ. При этом весь бактериохлорофилл b превращался в хлорофиллоподобное соединение (рис. 1). При использовании толуола в качестве растворителя и концентраций *o*-хинона от 10^{-3} до 10^{-5} M происходило мгновенное окисление пигмента в темноте с образованием соединения типа хлорофилла («680»), обладающего интенсивной флуоресценцией при 695 мμ. Других новых максимумов ни в спектрах поглощения, ни флуоресценции обнаружено не было. Образование зеленого окисленного продукта бактериохлорофилла а наблюдали в нашей лаборатории под действием *n*- и *o*-хинонов (⁶, ⁷). Несмотря на спектральное сходство этих промежуточных соединений, продукт окисления бактериохлорофилла b очень устойчив и не подвергается дальнейшему изменению, в то время как при фотоокислении бактериохлорофилла а мы отмечали ступенчатый механизм реакции, ведущей к появлению соединения типа протохлорофилла (⁶).

n-Хинон при освещении красным светом также окислял бактериохлорофилл b в ацетоне при 20° в течение 30 сек. до хлорофиллоподобного продукта, в то время как с бактериохлорофиллом а эта же реакция наблюдалась при длительном освещении (25—30 мин.) и окисление было неполным. Так как скорость окисления бактериохлорофилла b неизмеримо выше, чем бактериохлорофилла а, на рис. 1B масштаб времени дан в логарифмическом выражении.

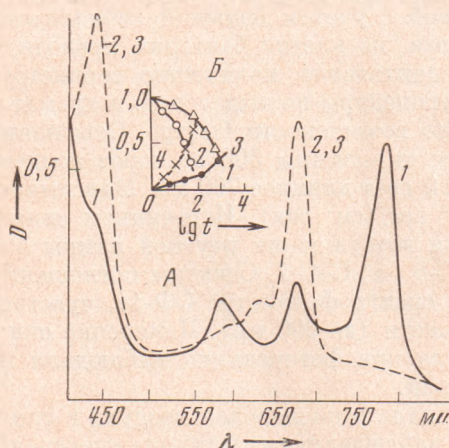


Рис. 1. А — необратимое фотохимическое окисление бактериохлорофилла b *o*-бензохиноном ($2 \cdot 10^{-4}$ M) в ацетоне при 20°: 1 — исходный спектр, 2 — после освещения в течение 30 сек., 3 — после стояния в темноте; В — скорость фотоокисления бактериохлорофиллов а и b *n*-бензохиноном ($2 \cdot 10^{-4}$ M) в ацетоне при 20°. Изменение оптической плотности при 770 и 795 мμ и при 680 мμ. Бактериохлорофилл а (1); бактериохлорофилл b (2); хлорофиллоподобный продукт, образующийся при фотоокислении бактериохлорофилла а (3) и бактериохлорофилла b (4)

Обратимое фотоокисление бактериохлорофилла b удалось наблюдать при реакции пигмента с *n*-хиноном в смеси этилового спирта и глицерина при их объемном соотношении 2,5 : 1,5 при — 70°. Взаимодействие между пигментом и окислителем наблюдалось под действием света и сопровождалось падением главного максимума бактериохлорофилла b и появлением окисленной формы пигмента в области 450 мμ. Обратная реакция шла медленно в темноте, но значительно ускорялась под действием синего света (рис. 2), который, вероятно, активировал первичные фотопродукты, поглощающие в синей области спектра. Обратимые изменения окислительно-восстановительного фотопотенциала, полученные в системе бактериохлорофилл b — убихинон (Q_0) в вязкой спирто-глицериновой среде при 20°, представлены на рис. 3. Появление положительного потенциала свидетельствовало об образовании окисленной формы пигмента, взаимодействующей с электродом. При выключении света наблюдалась обратная реакция. Величина ΔE при повторном освещении системы постепенно умень-

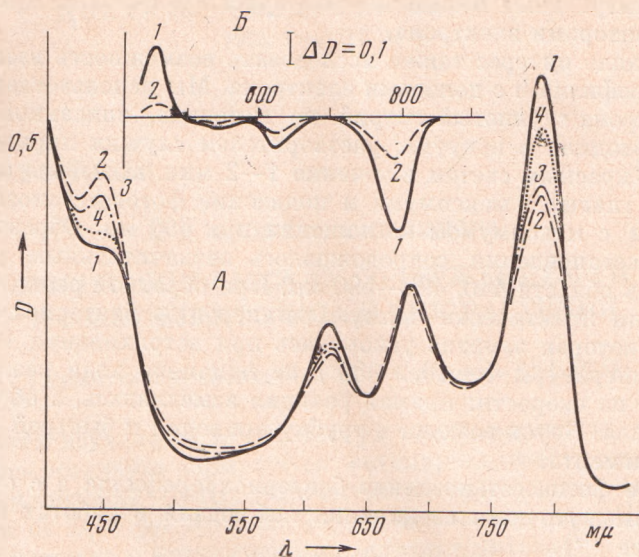


Рис. 2. Обратимое фотоокисление бактериохлорофилла *b* *n*-бензохиноном ($10^{-4} M$) при -70° в спирто-глицериновой среде. А: 1 — исходный спектр, 2 — после освещения красным светом в течение 3 мин., 3 — после стояния в темноте при -70° в течение 10 мин., 4 — после освещения синим светом в течение 2 мин.; В — дифференциальные спектры 1 (2—1), 2 (4, 1)

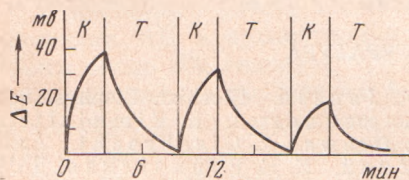


Рис. 3

Рис. 3. Изменение фотопотенциала в системе: бактериохлорофилл *b* — убихинон при освещении красным светом (бактериохлорофилл *b* ($10^{-5} M$), убихинон ($10^{-3} M$), спирт: глицерин 2,5/1,5). *κ* — красный свет, *τ* — темнота

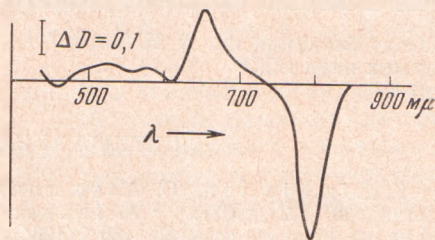


Рис. 4

Рис. 4. Дифференциальный спектр свет — темнота при фотовосстановлении бактериохлорофилла *b* сернистым натрием (2 мг) в пиридине в присутствии 2—3% воды при 20°

шалась, так как, наряду с обратимым фотоокислением и образованием лабильной формы пигмента происходило и необратимое образование хлорофиллоподобного продукта «680». По мере того как изменение фотопотенциала системы уменьшалось, происходило накопление устойчивого продукта необратимого окисления «680», который, в свою очередь, обнаружил способность к обратимому взаимодействию с окислителем. Этот продукт мало активен при взаимодействии с убихиноном, и поэтому в качестве акцептора электрона при окислении этого соединения пришлось использовать *n*-хинон, обладающий большей величиной окислительно-восстановительного потенциала. В работах нашей лаборатории (⁷⁻⁹) было показано, что бактериохлорофилл *a* обратимо взаимодействует с акцепторами электрона; при этом осуществлялся «одноэлектронный» процесс, сопровождающийся появлением лабильной окисленной формы пигмента «430». Таким образом, фотопотенциометрические исследования подтвердили ре-

зультаты спектральных изменений бактериохлорофилла *b* при взаимодействии с акцепторами электрона.

Представляло интерес также исследовать возможность взаимодействия бактериохлорофилла *b* с донорами электрона. Мы использовали в качестве донора электрона сернистый натрий по методике, описанной ранее ⁽¹⁰⁾. Реакцию проводили в вакууме, растворителем служил пиридин. Освещение системы красным светом в течение 1—2 мин. вызывало значительное уменьшение главного максимума и появление фотовосстановленной формы пигмента с максимумом поглощения при 660 мμ. Образование этого продукта восстановления сопровождалось незначительным увеличением поглощения в области 440, 490—590 мμ. При обратной реакции в темноте мы наблюдали практически полную регенерацию бактериохлорофилла *b* (90—92%), которая заметно ускорялась при встряхивании (рис. 4). Понижение температуры (—10, —30°) не изменяло хода реакции, сказываясь только на скорости: прямая реакция замедлялась, а обратная практически не шла. Впуск воздуха в трубку приводил к быстрой регенерации исходного пигмента.

Обратимое фотовосстановление бактериохлорофилла *a* с образованием сходного промежуточного соединения наблюдали в работах нашей лаборатории ранее ⁽¹⁰⁾.

Результаты работы позволяют заключить, что бактериохлорофиллы *a* и *b* обладают наряду с общими фотохимическими свойствами существенными различиями, которые обусловлены значительно большей реакционной способностью нового бактериального хлорофилла.

Приносим глубокую благодарность проф. Е. Н. Кондратьевой и В. Э. Успенской за предоставление исходной культуры *Rhodospseudomonas viridis* и ценные советы по выращиванию.

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

Поступило
4 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. Eimhjellen, O. Aasmundrud, A. Jensen, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 232 (1963). ² A. Jensen, O. Aasmundrud, K. Eimhjellen, *Biochim. et biophys. acta*, **88**, 466 (1964). ³ G. Drews, P. Giesbrecht, *Arch. Mikrobiol.*, **53**, 255 (1966). ⁴ А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **81**, 879 (1951). ⁵ А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, И. М. Сапожникова, ДАН, **177**, 1225 (1967). ⁶ А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, Е. М. Бокучава, ДАН, **190**, 464 (1970). ⁷ А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, **150**, 1378 (1963). ⁸ Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, *Биохимия*, **30**, 605 (1965). ⁹ Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский и др., ДАН, **183**, 221 (1968). ¹⁰ А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, ДАН, **92**, 381 (1953).