

УДК 582.132.1

БИОХИМИЯ

А. Я. ШКУРОПАТОВ, Н. И. ПУТИЛОВА, Ю. М. СТОЛОВИЦКИЙ,
В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПИГМЕНТ-БЕЛКОВОЛИПОИДНОГО КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ I С *n*-БЕНЗОХИНОНОМ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

(Представлено академиком А. А. Базевым 19 X 1973)

Механизм фотосенсибилизации пигментами окислительно-восстановительных реакций исследовался на модельных системах различной степени сложности (¹⁻³). За последние годы получили развитие методы выделения пигмент-белковолипоидных комплексов (ПБЛК) I и II фотосистем (по терминологии Z-схемы), фотохимические свойства которых изучены еще совершенно недостаточно (⁴⁻⁸). Проведение подобных исследований на целых хлоропластах с добавками детергента (⁹) безусловно осложняется многокомпонентностью таких объектов, присутствием белков различной природы, большим содержанием валового пигмента, не связанного со структурными белками.

Целью данной работы является исследование методом потенциометрии (^{1,10}) фотохимического взаимодействия между *n*-бензохиноном и ПБЛК фотосистемы I, полученного при достаточно мягких условиях обработки и выделения.

Пигмент-белковолипоидный комплекс фотосистемы I получали из хлоропластов гороха (сорт «Превосходный») методом ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе. Гомогенат хлоропластных гран инкубировали в 3,5% тритоне X-100 (весовое соотношение тритон X-100/хлорофилл=50), содержащем 0,005 *M* трис-HCl буфер (pH 8,0) и 0,4 *M* сахарозу, в течение 1,5 час. и наносили на колонку с плотноупакованной ДЕАЕ-целлюлозой. Прочно адсорбировавшийся материал промывали буферным раствором 0,05% тритона X=100 (для полного удаления свободных, не связанных с белком пигментов). ПБЛК элюировали 0,1 *M* раствором NaCl в 0,005 *M* буфере, содержащем 0,05% тритона X-100, и многократно рехроматографировали для полного отделения примесей комплекса фотосистемы II. В состав полученного комплекса входит белок (весовое соотношение хлорофилл/белок=0,7), хлорофиллы (молекулярное соотношение хлорофилл а/хлорофилл b=7,8), каротиноиды (молекулярное соотношение каротин/ксантофиллы=4,3). По биохимическому составу данный комплекс аналогичен ПБЛК, выделенному ранее методом электрофореза в полиакриламидном геле и идентифицированному как комплекс фотосистемы I (⁴⁻⁷).

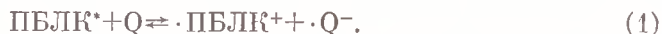
В настоящей работе использовали буферный раствор ПБЛК с содержанием хлорофилла ~0,04 мг/мл. Исследование фотопотенциала проводили при комнатной температуре по методике, описанной ранее (^{1,10}). Спектры действия фотопотенциала регистрировали на установке УС-11, максимальный световой поток которой был не менее $2 \cdot 10^3$ эрг/(см²·сек) во всем спектральном диапазоне (240–1000 мμ) при ширине выделяемой полосы спектра не более 10 мμ и не менее $3 \cdot 10^4$ эрг/(см²·сек) в интервале 300–760 мμ. Освещение красным светом раствора ПБЛК с введенным *n*-бензохиноном на воздухе приводило к генерации отрицательного фотопотенциала (рис. 1). Следует отметить, что иногда фотопотенциал появлялся и при освещении раствора *n*-бензохинона в буфере

без комплекса. Однако фотопотенциал в этом случае характеризовался незначительной величиной (единицы милливольт), большой инерционностью и меньшей обратимостью (рис. 1, 2). Добавка комплекса к раствору окислителя всегда приводила к существенному возрастанию абсолютной величины фотопотенциала и к уменьшению его инерционности. Освещение раствора ПБЛК без добавления бензохинона не приводило к генерации фотопотенциала. Фотопотенциал испытывает сильную зависимость от pH раствора (рис. 2). Как следует из рисунка, фотопотенциал существенно увеличивается при переходе от слабощелочной среды к слабокислой. На рис. 3, 2 приведен спектр действия фотопотенциала в растворе ПБЛК в присутствии *n*-бензохинона.

Спектральное распределение фотопотенциала, как видно из рисунка, характеризуется двумя пиками, соответствующими синей и красной полосе поглощения хлорофилла в составе ПБЛК. По сравнению со спектром поглощения спектр действия фотопотенциала имеет существенные отличия: пики значительно уширены и длинноволновая полоса интенсивнее коротковолновой. Кроме указанных полос в спектральном распределении фотопотенциала наблюдается размытый максимум в области 290–320 мμ (на рисунке показан пунктиром). Точное определение формы и интенсивности этой полосы было затруднительно, так как расширение спектрального диапазона в коротковолновую сторону приводило к существенному уменьшению интенсивности излучения ($4 \cdot 10^3$ эрг/см²·сек) и, соответственно, к уменьшению величины потенциала.

Полученные экспериментальные данные, без сомнения, свидетельствуют об обратимом фотохимическом взаимодействии ПБЛК на воздухе с окислителем — *n*-бензохиноном. Наличие в спектре действия фотопотенциала максимума в области 290–320 мμ, помимо двух полос в видимой области, соответствующих двум электронным переходам в молекуле хлорофилла, свидетельствует о том, что фотохимически активным является свет, поглощенный не только пигментной, но, по-видимому, и белковой частью молекулы.

Одно из объяснений светового изменения потенциала в отрицательную сторону заключается в том, что в растворе в результате прямой фотохимической реакции хлорофиллового комплекса с хиноном образуется восстановленный продукт последнего. Таким продуктом является, по всей вероятности, анион-радикал *n*-бензохинона $\cdot Q^-$ или восстановленные формы, являющиеся результатом дальнейших превращений $\cdot Q^-$. Генерация $\cdot Q^-$ может осуществляться в результате следующей элементарной окислительно-восстановительной реакции между возбужденным комплексом (ПБЛК*) и хиноном:



В этом случае следует предположить, что конфигурация комплекса исключает доступ и взаимодействие с электродом весьма электродно-активной положительно заряженной окисленной формы хлорофилла ($\cdot X^{+}$), которая при этой реакции должна образовываться (^{11, 13}). Подобное предположение было сделано ранее в работе (⁹), при объяснении механизма генерации отрицательного фотопотенциала в водных растворах хлорофилла, содержащих детергент, и в суспензиях хлоропластов. Другое возможное объяснение основано на предположении, что появление восстановленных продуктов в растворе обуславливается не прямой реакцией воз-

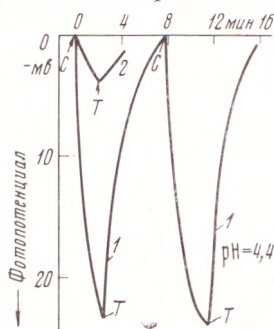


Рис. 1. Фотопотенциал в буферном растворе ПБЛК с добавкой *n*-бензохинона (10^{-4} M) (1) и в растворе *n*-бензохинона ($2 \cdot 10^{-4}$ M) в отсутствие комплекса (2). с — свет, т — темнота

бужденного хлорофилла с хиноном, а сенсibilизированным хлорофиллом, восстановлением последнего донором электрона, содержащимся в ПБЛК. Тесная связь пигмента с донором в комплексе может облегчить их взаимодействие, и первичной реакцией процесса фотосенсibilизации может быть в этом случае не фотоокисление, а фотовосстановление пигмента. Образовавшаяся лабильная восстановленная форма пигмента реагирует с хиноном.

Конечный результат, однако, не изменится, если в действительности фотосенсibilизация идет по «окислительному» пути, т. е. через первичное фотоокисление сенсibilизатора хиноном. В пользу возможности

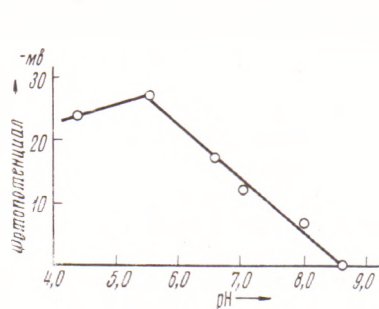


Рис. 2

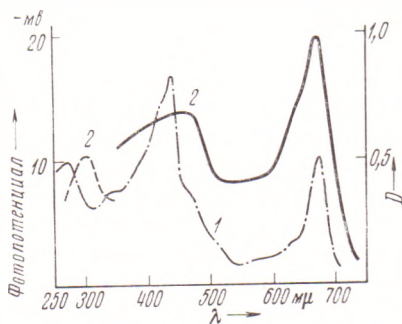


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость от pH фотопотенциала в растворе ПБЛК в присутствии *n*-бензохинона (10^{-4} M)

Рис. 3. Спектр поглощения (1) ПБЛК в буферном растворе (0,005 M трис-HCl, 0,05% тритон X-100) и спектр действия фотопотенциала в растворе ПБЛК в присутствии *n*-бензохинона (2). Часть кривой 2, обозначенная сплошной линией, снята при интенсивности светового потока $15,7 \cdot 10^3$ эрг/(см² · сек), пунктирной — при интенсивности $4 \cdot 10^3$ эрг/(см² · сек)

«окислительного» пути фотосенсibilизации говорит увеличение фотопотенциала при понижении pH среды до определенного предела, что, как правило, благоприятствует проявлению способности хлорофилла служить фотохимическим донором электрона ⁽¹²⁾. Этим же, следовательно, можно объяснить увеличение значений отрицательного фотопотенциала с уменьшением pH от ~9 до ~5, если исходить из первой точки зрения, предполагающей наличие только прямого взаимодействия хлорофилла с хиноном.

Увеличение концентрации H^+ в хлорофилловых растворах приводит к стабилизации положительно заряженной электродно-активной формы пигмента ⁽¹⁰⁾ и, соответственно, к увеличению положительного фотопотенциала.

Если реакция протонирования $\cdot Q^-$ имеет место и в случае пигмент-белковолипоидного комплекса, то, поскольку образовавшаяся в результате фотохимической реакции (1) положительно заряженная форма комплекса не действует на электрод, изменение потенциала в отрицательную сторону обусловлено взаимодействием с электродом форм $\cdot Q^-$ и $\cdot QH$. Подкисление раствора приводит к увеличению интенсивности окислительно-восстановительной реакции, т. е. к повышению концентрации этих форм и, как следствие, к увеличению фотопотенциала. Исчезновение фотопотенциала при более высоких pH свидетельствует, по-видимому, о прекращении взаимодействия хлорофилла и хинона, а не об изменении степени электродной активности восстановленных продуктов хинона. Как правило, способность к взаимодействию с электродом восстановленных продуктов при увеличении pH не уменьшается, а увеличивается.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Б. Евстигнеев, Окислительно-восстановительные свойства хлорофилла в связи с его ролью при фотосинтезе, Докторская диссертация, М., 1956.
- ² В. Б. Евстигнеев, Биофизика, 8, 664 (1963).
- ³ А. А. Красновский, Усп. хим., 29, 736 (1960); Ann. Rev. Plant Physiol., 11, 363 (1960).
- ⁴ Т. Ogawa, F. Obata, K. Shibata, Biochim. et biophys. acta, 112, 223 (1966).
- ⁵ J. P. Thornber, R. P. F. Gregory et al., Biochemistry, 6, 391 (1967).
- ⁶ J. T. Thornber, J. C. Stewart et al., Biochemistry, 6, 2006 (1967).
- ⁷ S. D. Kung, J. P. Thornber, Biochim. et biophys. acta, 253, 285 (1971).
- ⁸ O. Machold, A. Meister, K. Adler, Photosynthetic, 5, 160 (1971).
- ⁹ Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, ДАН, 207, 988 (1972).
- ¹⁰ В. Б. Евстигнеев, Сборн. Элементарные фотопроеессы в молекулах, «Наука», 1966, стр. 243.
- ¹¹ В. Б. Евстигнеев, Сборн. Молекулярная фотоника, «Наука», 1970, стр. 178.
- ¹² В. Б. Евстигнеев, Биофизика, 15, 239 (1970).
- ¹³ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, Биофизика, 11, 593 (1965).