

УДК 582.132.1

БИОХИМИЯ

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

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

(Представлено академиком А. А. Баевым 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 дeterгента (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 (рН 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/ксантонфильтры=4,3). По биохимическому составу данный комплекс аналогичен ПБЛК, выделенному ранее методом электрофореза в полиакриламидном геле и идентифицированному как комплекс фотосистемы I (⁴⁻⁷).

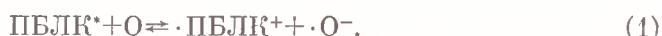
В настоящей работе использовали буферный раствор ПБЛК с содержанием хлорофилла ~0,04 мг/мл. Исследование фотопотенциала проводили при комнатной температуре по методике, описанной ранее (^{1, 10}). Спектры действия фотопотенциала регистрировали на установке УС-11, максимальный световой поток которой был не менее $2 \cdot 10^3$ эрг/(см²·сек) во всем спектральном диапазоне (240–1000 ми) при ширине выделяемой полосы спектра не более 10 ми и не менее $3 \cdot 10^4$ эрг/(см²·сек) в интервале 300–760 ми. 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 м μ (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/см 2 ·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 м μ , 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 окисительно-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 ($\cdot X\text{L}^+$), 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 обусловливается не прямой реакцией воз-

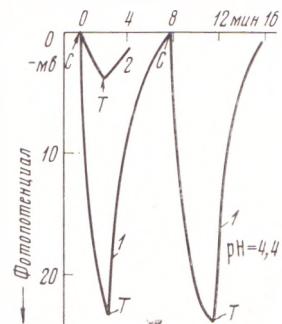


Рис. 1. Фотопотенциал в буферном растворе ПБЛК с добавкой *n*-бензохинона (10^{-4} M) (1) и в растворе *n*-бензохинона ($2 \cdot 10^{-4}$ M) в отсутствие комплекса (2). *c* — свет, *T* — температура

бужденного хлорофилла с хиноном, а сенсибилизированным хлорофиллом, восстановлением последнего донором электрона, содержащимся в ПБЛК. Тесная связь пигмента с донором в комплексе может облегчить их взаимодействие, и первичной реакцией процесса фотосенсибилизации 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 фотосенсибилизация идет по «окислительному» пути, т. е. через первичное фотоокисление сенсибилизатора хиноном. В пользу возможности

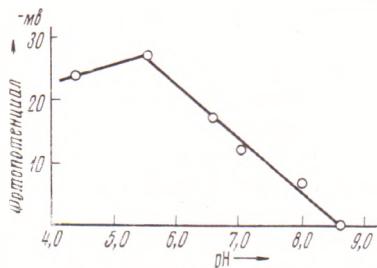


Рис. 2

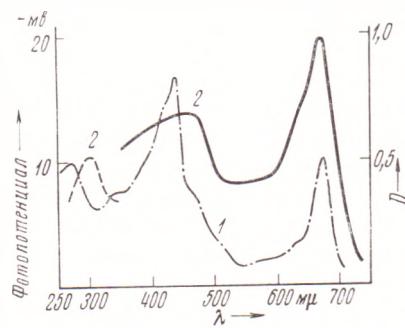


Рис. 3

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/($\text{см}^2 \cdot \text{сек}$), пунктиром — при интенсивности $4 \cdot 10^3$ эрг/($\text{см}^2 \cdot \text{сек}$)

«окислительного» пути фотосенсибилизации 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 $\cdot\text{Q}^-$ имеет место и в случае пигмент-белковолипидного 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 $\cdot\text{Q}^-$ и $\cdot\text{QH}$. 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.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
18 X 1973

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, Photosynthetica, 5, 160 (1971). ⁹ Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, ДАН, 207, 988 (1972). ¹⁰ В. Б. Евстигнеев, Сборн. Элементарные фотопроцессы 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).