

Е. Н. ЦЕНОВА, И. ФЕДИНА, С. ВАКЛИНОВА

## ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ФОТООКИСЛЕНИЕМ ГИДРОКСИЛАМИНА И ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ХЛОРОПЛАСТАХ

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 II 1971)

В последние годы при изучении обнаруженной в нашей лаборатории новой фотохимической реакции, происходящей в изолированных хлоропластах, нами было установлено, что гидроксиламин является искусственным донором электронов в электрон-транспортной цепи фотосинтеза. При этом гидроксиламин (ГА) окисляется до нитрита (<sup>1</sup>), что сопровождается интенсивным поглощением молекулярного кислорода, который является конечным акцептором электронов из ГА (<sup>2</sup>). В последнее время этот наш вывод был подтвержден другими исследователями (<sup>3</sup>, <sup>4</sup>), которые показали также, что ГА является донором электронов для второй пигментной системы.

Исследованиями Арнона и ряда других авторов установлено, что ферредоксин катализирует фотофосфорилирование в изолированных хлоропластах. Кроме того, что он выполняет роль катализатора переноса электронов при циклическом и нециклическом фотофосфорилировании, ферредоксин является также катализатором так называемого «псевдоциклического фотофосфорилирования» (<sup>5</sup>, <sup>6</sup>). Этот тип фотофосфорилирования осуществляется, когда конечным акцептором электрона является молекулярный кислород. По данным Чанса и Сан-Пиетро (<sup>7</sup>) восстановленный ферредоксин быстро отдает свои электроны кислороду как в присутствии, так и в отсутствие никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ). Установленная нами реакция фотоокисления гидроксиламина является моделью фотосинтетического переноса электронов от искусственного донора — ГА до молекулярного кислорода. Нами было установлено, что эта реакция стимулируется прибавлением экзогенного ферредоксина, что показывает, что и здесь ферредоксин является посредником в переносе электронов от ГА к молекулярному кислороду (<sup>8</sup>). Исходя, в частности, из того, что ферредоксин катализирует как фотофосфорилирование так и фотоокисление ГА, мы попытались в настоящей работе выяснить, является ли фотоокисление гидроксиламина реакцией, сопряженной с фотофосфорилированием.

В опытах использовались хлоропласты из шпината и гороха, выделенные в сахарозо-трис HCl буфере pH 7,8 однократным промыванием. Полученные хлоропласты ресуспендировались в 0,5 M трис-pH 7,8; реакционная среда содержала в конечном объеме 2,5 мл следующие компоненты (в микромолях): глюкоза 150,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14, NaCl 170,  $\text{MgCl}_2$  10, ФМС 0,1, АДФ 5, витамин  $\text{K}_3$  0,3, АТФ 1, гексокиназа — 0,5 мг, суспензия хлоропластов с содержанием хлорофилла 0,06–0,1 мг. Реакционная смесь экспонировалась 5 мин. при интенсивности освещения 40 000 лк и температуре 18°. Пробы фиксировались 5% трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация). Об активности фотофосфорилирования судили по убыли неорганического фосфата (Фн), который определялся по методу Кондрашовой (<sup>9</sup>). Ферредоксин выделяли в нашей лаборатории из листьев шпината по Сан-Пиетро и Ланга (<sup>10</sup>). Одновременно определялась степень фотоокисления ГА

по количеству образовавшегося нитрита. Содержание хлорофилла в суспензиях определяли по Арнону (11).

Использованная нами реакционная среда позволила получить весьма высокие интенсивности фотофосфорилирования. Как видно из рис. 1, это зависит в большей степени от концентрации хлорофилла в реакционной среде. При высокой концентрации хлорофилла количество астерифицированного фосфата находится в пределах от 160 до 230  $\mu\text{мол}$ . Самая высокая

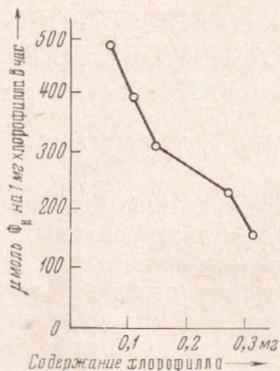


Рис. 1. Интенсивность фотофосфорилирования в зависимости от концентрации хлорофилла в реакционной среде

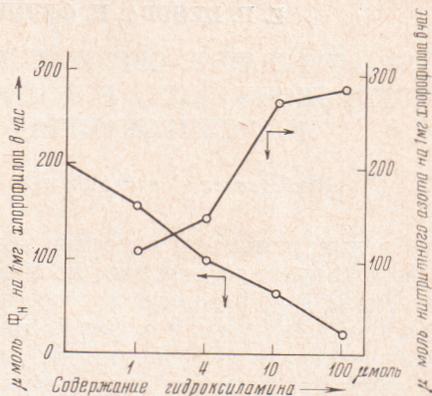


Рис. 2. Зависимость фотофосфорилирования и фотоокисления ГА от его концентрации

степень фотофосфорилирования (480  $\mu\text{мол} / \text{мг} \cdot \text{час}$ ) была получена при концентрации хлорофилла от 0,06 до 0,10 мг. Результаты изучения влияния ферредоксина на фотофосфорилирование в хлоропластах показали, что экзогенно добавленный ферредоксин значительно стимулирует этот процесс.

	Интенсивность фосфорилирования ( $\mu\text{мол. Фн на 1 мг хлорофилла в час}$ )			
Без ферредоксина (контроль)	75	112	160	314
При добавлении ферредоксина	111	204	195	330
В процентах к контролю	148	182	125	105

Интересно, что в вариантах без добавления ферредоксина, когда фотофосфорилирование протекает слабо, эффект добавки выявлен очень хорошо, фотофосфорилирование повышается до 182%. Наоборот, когда в реакционной среде не присутствует ферредоксин и фотофосфорилирование идет интенсивно, добавленный ферредоксин не оказывает такого эффекта, фотофосфорилирование повышается только на 5—22%. Низкая фотохимическая активность хлоропластов может быть обусловлена качеством исходного материала, из которого они были выделены. Добавленный ферредоксин повышает эту активность. В случаях, когда эффект добавления ферредоксина небольшой, можно допустить, что в хлоропластах содержится в достаточном количестве собственный ферредоксин.

На рис. 2 представлены результаты влияния разных концентраций ГА на фотофосфорилирование. Эти данные показывают, что фотофосфорилирование в присутствии ГА ингибируется, причем при концентрации 1  $\mu\text{моль}$  этот эффект слабо выражен, с повышением концентрации ГА торможение процесса усиливается, и при концентрации 100  $\mu\text{моль}$  наступает почти полное подавление его (90%). На том же рисунке приведена кривая изменения количества нитрита, образующегося в процессе фотоокисления ГА, из хода которой видно, что с повышением концентрации ГА увеличивается количество образованного нитрита. Из данных рис. 2

видно, что кривые зависимости фотофосфорилирования и фотоокисления ГА от концентрации последнего имеют противоположный характер.

Представленные результаты показывают, что в условиях наших опытов фотоокисление ГА не было сопряжено с фотофосфорилированием. В физиологических условиях, когда вода является донором электронов и в системе участвует НАДФ, фотофосфорилирование идет по нециклическому пути. Молекулярный кислород может служить конечным акцептором электронов в экспериментально созданной системе, когда вода, как донор электронов, блокируется ингибитором, или вместо воды добавляется искусственный донор (<sup>5</sup>). В нашей модельной реакции ГА ингибирует естественную донорную систему — воду и сам становится донором электронов. При низких концентрациях ГА — от 1 до 10 мкмоль, поток электронов от воды все еще продолжается и фотофосфорилирование протекает с пониженной интенсивностью, при высоких концентрациях ГА вода, как донор электронов, вполне блокируется, в результате чего фотофосфорилирование приостанавливается. По всей вероятности, для того чтобы фотофосфорилирование протекало, необходимо наличие в системе и другого донора электронов. Так, исследованиями Элстнера и Ваклиновой (<sup>12</sup>) было установлено, что когда в одной открытой системе в качестве доноров электронов участвуют диаминодуриол (ДАД), и дихлорфенолиндифенол (ДХФИФ), ГА не ингибирует фотофосфорилирования и оно протекает вместе с транспортом электронов. Если же донорами электронов являются вода и аскорбат, ГА ингибирует как фотосинтетический перенос электронов, так и образование АТФ. Было установлено также, что не каждый перенос электронов от искусственных доноров сопряжен с фотосинтетическим фотофосфорилированием (<sup>13</sup>). Так, при донорной системе аскорбат — тетраметилпарафенилдиамин (ТМРД) электронный транспорт протекает без образования АТФ (<sup>12</sup>).

Институт физиологии растений им. М. Попова  
Болгарской Академии наук  
София

Поступило  
26 X 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> S. Vaklinova, C. R. Acad. Bulg. Sci., 17, № 3, 283 (1964). <sup>2</sup> S. Vaklinova, N. Tomova et al., Ibid., 17, № 11, 1051 (1964). <sup>3</sup> P. Bennoun, A. Joliot, Biochem. et biophys. acta, 189, 1, 85 (1969). <sup>4</sup> S. Isawa, R. L. Heath, G. Hind, Biochem. et biophys. acta, 180, 388 (1969). <sup>5</sup> Д. И. Арнон, Тр. V Международн. биохим. конгр. Механизм фотосинтеза, симпоз. VI, Изд. АН СССР, 1962, стр. 208. <sup>6</sup> D. I. Arnon, In Biological Oxidations, N. Y.—London—Sydney, 1968, p. 123. <sup>7</sup> Цит. по Н. М. Сисакян, Р. М. Бекина, Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 257 (1964). <sup>8</sup> S. Vaklinova, E. Nikolova-Tsenova, S. Angelova, C. R., Acad. Bulg. Sci., 19, № 12, 1191 (1966). <sup>9</sup> М. Н. Кондрашова, М. Н. Лесогорова, С. Э. Шноль, Биохимия, 30, в. 3, 567 (1965). <sup>10</sup> A. San Pietro, H. M. Lang, J. Biol. Chem., 231, 211 (1958). <sup>11</sup> D. I. Arnon, Plant Physiol., 24, 1 (1949). <sup>12</sup> E. F. Elastner, A. Heupel, S. Vaklinova, Zs. Pflanzenphysiol., 62, 173 (1970). <sup>13</sup> A. Trebst, Zs. Naturforsch., 19b, 418 (1964).