

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. М. ПУШКИНА,
Н. Н. ДРОЗДОВА, Н. В. БУБЛИЧЕНКО, А. В. УМРИХИНА

ПЕРВИЧНЫЕ СТАДИИ ОБРАТИМОГО ФОТООКИСЛЕНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА b

Способность бактериохлорофилла к обратимому фотоокислению кислородом воздуха и хинонами была обнаружена и исследована в нашей лаборатории (¹⁻³). Более глубокое необратимое окисление бактериохлорофилла приводит к образованию устойчивых фотопродуктов, обладающих характерными спектрами поглощения и люминесценции, аналогичных хлорофиллу и протохлорофиллу (⁴).

Мы описали обратимое и необратимое фотоокисление бактериохлорофилла b, выделенного из культуры *Rhodospseudomonas viridis* (⁵). Этот пигмент является наиболее «длинноволновым» фотосинтетически активным пигментом, что определяет интерес к исследованию его свойств.

При сравнительном изучении фотохимических свойств бактериохлорофиллов a и b обнаружены различия в реакционной способности и фотохимическом поведении этих бактериальных хлорофиллов. Однако имеются лишь единичные сведения о появлении фотоиндуцированного сигнала э.п.р. в клетках бактерий *Rhodospseudomonas viridis*, содержащих бактериохлорофилл b (⁶), тогда как образование свободных радикалов при фотореакциях этого пигмента в растворе не изучено.

В настоящей работе поставлена задача обнаружить радикальную окисленную форму бактериохлорофилла b и сравнить ее свойства со свойствами катион-радикала бактериохлорофилла a, обнаруженного и исследованного в наших предыдущих работах (^{7, 8}).

Методика. Растворы бактериохлорофилла b (10^{-4} M) и хинона ($5 \cdot 10^{-4}$ M) в этаноле в вакуумированных стеклянных ампулах освещали красным светом (светофильтр КС-19) непосредственно в резонаторе э.п.р. спектрометра. Условия измерения сигналов э.п.р. описаны ранее (⁸). Бактериохлорофилл b выделяли из культуры бактерий *Rhodospseudomonas viridis* (⁹); *n*-бензохинон — дважды возогнапный; этанол — ректификат (96%).

Результаты. Ранее показано, что освещение в резонаторе э.п.р. спектрометра системы бактериохлорофилла a — *n*-бензохинон в этаноле в вакууме приводило к появлению в диапазоне температур $-150 \div -10^\circ$ сигнала э.п.р., представляющего синглетную линию с $g=2,0025$ и шириной $\Delta H=12$ э. Этот сигнал был обусловлен радикальной окисленной формой бактериохлорофилла a. Он отличался по своим характеристикам от сигнала семихинона, образование которого также показано в этой системе и который отчетливо можно было наблюдать при действии желтого или белого света на растворы *n*-бензохинона в этаноле (пентет $\Delta H=5$ э и $g=2,005$).

Установлено, что освещение растворов бактериохлорофилла b и *n*-бензохинона в этаноле в вакууме также приводило к возникновению синглетного сигнала э.п.р. со сходными характеристиками: сигнал представлял собою синглетную линию с $g=2,0025$ и $\Delta H=13$ э, наблюдался при температуре $-160-0^\circ$. Очевидно, при фотоокислении бактериохлорофилла b, как и при окислении бактериохлорофилла a, образуется стабильная катион-радикальная форма пигмента. Однако несмотря на общее сходство окисленных форм обоих бактериальных пигментов, имеются и различия в свойствах их радикальных продуктов окисления.

На рис. 1 приведены спектры э.п.р., наблюдаемые при действии крас-

ного света на растворы бактериохлорофилла *b* и *n*-бензохинона в этаноле в сравнении с соответствующими данными для бактериохлорофилла *a*. Сопоставлен ход исчезновения синглетного сигнала э.п.р. при -120° . На рис. 1 видно, что оба бактериальных пигмента дают сходные сигналы э.п.р., однако длительность жизни этих сигналов существенно различает-

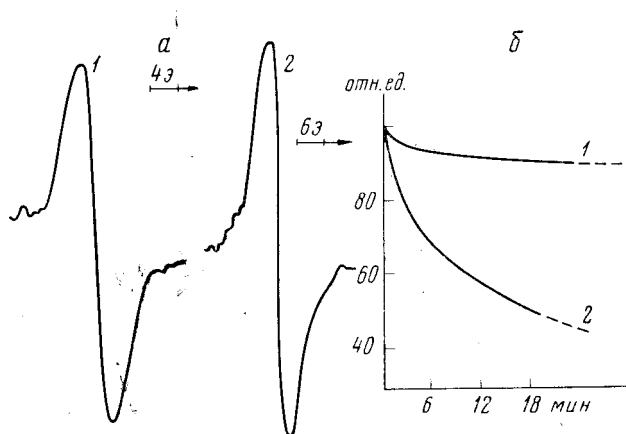


Рис. 1. Спектры синглетного сигнала э.п.р., наблюдаемого при освещении красным светом растворов бактериохлорофилла *a* и *b* ($10^{-4} M$) и *n*-бензохинона ($5 \cdot 10^{-4} M$) в этаноле (а) и кривые исчезновения этого сигнала в темноте при -120° (б). 1 — бактериохлорофилл *a*, 2 — бактериохлорофилл *b*

ся. Если сигнал бактериохлорофилла *a* часами сохраняется в темноте при температуре ниже -70° , то окисленная форма бактериохлорофилла *b* при -70° исчезает в течение нескольких минут и даже при -120° исчезает довольно быстро в темноте после выключения света. Более быстрое исчезновение синглетного сигнала э.п.р. бактериохлорофилла *b* по сравнению с

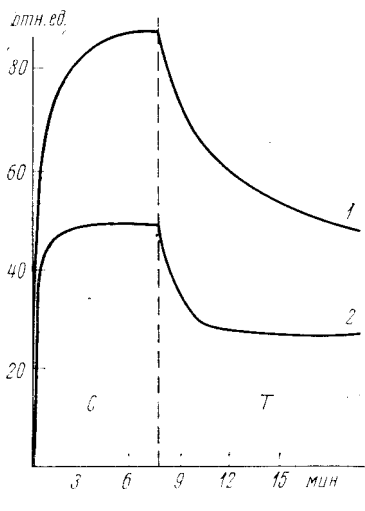


Рис. 2. Кривые нарастания на свету и исчезновения в темноте синглетного сигнала э.п.р. в растворах бактериохлорофилла *b* ($10^{-4} M$) и *n*-бензохинона ($5 \cdot 10^{-4} M$) в этаноле. 1 — при -120° , 2 — при -150° . Здесь и на рис. 3 С — свет, Т — темнота

синглетом бактериохлорофилла *a* можно наблюдать во всем диапазоне температур. Только при температуре ниже -135° , т. е. в замороженной матрице, удается стабилизировать окисленную радикальную форму бактериохлорофилла *b* (рис. 2). Частичное уменьшение амплитуды синглетного сигнала после выключения света при -150° (рис. 2) можно объяснить дисмутацией семихинона, который также образуется в этой системе (см. (8)).

Полученные данные указывают на то, что оба бактериальных пигмента характеризуются разной реакционной способностью их окисленных радикальных форм, при этом радикальные свойства продуктов окисления соответствуют фотохимическим свойствам бактериохлорофиллов (9).

При концентрации *n*-бензохинона равной или меньшей концентрации пигмента ($10^{-4} M$) интенсивность синглетного сигнала э.п.р. была невелика. Увеличение концентрации окислителя приводило к увеличению скорости нарастания и интенсивности сигнала, однако при этом увеличивалась и скорость обратной реакции. Так,

при концентрации *n*-бензохинона $2,5 \cdot 10^{-3}$ М синглетный сигнал удается наблюдать с бактериохлорофиллом *b* только на свету, тогда как после выключения света сигнал исчезал практически мгновенно. Из-за большей устойчивости синглетного сигнала э.п.р. бактериохлорофилла *a* его можно наблюдать в более широком интервале концентраций *n*-бензохинона. Однако при получении сравнимых результатов была выбрана оптимальная концентрация *n*-бензохинона, равная $5 \cdot 10^{-4}$ М, при которой в отчетливой форме наблюдали как световой, так и темновой (после действия света) сигналы э.п.р. бактериохлорофилла *a* и *b*.

Известно, что глицерин оказывает замедляющее действие на ход прямой и обратной фотохимической реакции, увеличивая вязкость среды (аналогично понижению температуры). Добавляя глицерин к раствору бактериохлорофилла и *n*-бензохинона в этаноле в количестве 20; 40; 50%, удалось повысить температурный предел наблюдения синглетного сигнала э.п.р. (до 20°), а также замедлить ход обратной реакции — исчезновения синглетного сигнала э.п.р. Полученные результаты также соответствуют фотохимическим свойствам бактериохлорофиллов (3).

Ранее установлено, что синий свет значительно ускоряет регенерацию до исходного состояния окисленной формы бактериохлорофилла с максимумом поглощения при 430 нм, которая, по-видимому, ответственна за появление синглетного сигнала э.п.р. Мы проверили действие синего света на светоиндуцированный красным светом синглетный сигнал э.п.р. Оказалось, что в области температур $-150 \div -90^\circ$ синглетный сигнал не только не исчезал на синем свету, но значительно увеличивался по интенсивности. Однако наблюдаемый после действия синего света синглетный сигнал э.п.р. сразу же исчезал после выключения света и по ширине и *g*-фактору соответствовал светоиндуцированному белым или желтым светом сигналу э.п.р. семихинона. Принадлежность сигнала э.п.р., возникающего при действии синего света семихинону доказывается опытами при температуре -90° . В этих условиях при действии синего света стабильный (светоиндуцированный красным светом) синглетный сигнал э.п.р. исчезал и появлялся отчетливый сигнал семихинона (пентет, $\Delta H = 5$ э). Такой же сигнал семихинона появляется при действии синего света на растворы одного *n*-бензохинона в отсутствие бактериохлорофилла. По-видимому, синий свет, оказывая прямое активирующее действие на *n*-бензохинон (в системе с бактериохлорофиллом), приводит к образованию избыточного количества радикалов семихинона, которые участвуют как в реакции рекомбинации, так и в реакции с окисленной формой бактериохлорофилла, приводя к ее исчезновению. Возможно и прямое активирующее действие синего света на форму 430, однако присутствие в системе *n*-бензохинона не позволяет разграничить действие синего света на *n*-бензохинон и окисленную форму бактериохлорофилла.

Полученные данные по свойствам стабильного синглетного сигнала э.п.р. бактериохлорофиллов *a* и *b* позволяют предположить, что наблюдаемый ранее продукт окисления бактериохлорофилла с максимумом поглощения при 430 нм (3, 5) является свободным радикалом и ответствен за появление синглетного сигнала э.п.р.

Необратимое окисление бактериальных пигментов приводит к образованию устойчивых фотопродуктов, подобных хлорофиллу и протохлорофиллу.

Мы исследовали способность хлорофиллоподобного продукта к обратному окислению хиноном на примере бактериохлорофилла *b*. С этой целью бактериохлорофилл *b* был окислен предварительно кислородом воздуха на свету с образованием хлорофиллоподобного продукта с максимумом поглощения при 680 нм. Освещение растворов этого пигмента с *n*-бензохиноном в этаноле в вакууме (светофильтр КС-13) не приводило к возникновению устойчивого синглетного сигнала э.п.р., характерного для окисленных бактериохлорофиллов. Вместо этого на свету мы наблюдали синг-

нал семихинона, который сразу же исчезал после выключения света (рис. 3). Эти данные соответствуют результатам Толллина по фотоокислению хлорофилла *n*-бензохиноном, который наблюдал лишь сигнал семихинона при действии света на растворы хлорофилла и феофитина с хиноном в этаноле (¹⁰). Полученные результаты подтверждают предположение,

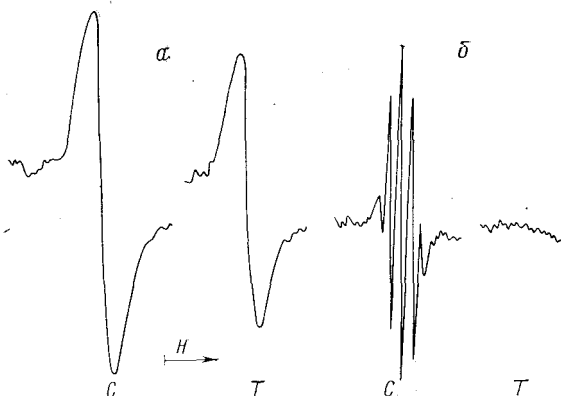


Рис. 3. Сигналы э.п.р., наблюдаемые на свету и в темноте для растворов бактериохлорофилла *b* и *n*-бензохинона в этаноле (*a*) и продукта окисления бактериохлорофилла *b* (П«680») с *n*-бензохиноном в этаноле (*б*)

что продукт окисления бактериохлорофилла с максимумом при 680 нм представляет собой хлорофиллоподобное соединение и что переход от структуры бактериохлорофилла к структуре хлорина в результате отнятия двух атомов водорода в положении 3—4 от молекулы бактериохлорофилла существенно изменяет окислительно-восстановительные свойства пигмента. Так, катион-радикальная форма бактериохлорофилла *b* и *a* стабильна по сравнению с семихиноном, сохраняясь длительное время в темноте после выключения

света, тогда как сигнал семихинона исчезает сразу же после выключения света. В отличие от этого, катион-радикальная форма хлорофиллоподобного продукта, так же как и хлорофилла, менее стабильна, чем семихинон.

Итак, фотоокисление бактериохлорофилла *b* протекает аналогично фотоокислению бактериохлорофилла *a* и приводит к образованию радикальной формы, менее стабильной (более активной), чем соответствующая форма бактериохлорофилла *a*. Окисленная форма дает синглетный сигнал э.п.р. с $\Delta H = 13$ э и $g = 2,0025$, который наблюдается при $-160-0^\circ$, стабильный в замороженной матрице, скорость исчезновения синглетного сигнала э.п.р. бактериохлорофилла *b* больше соответствующей скорости исчезновения сигнала э.п.р. окисленного бактериохлорофилла *a*. Стационарная концентрация данного типа свободного радикала зависит от соотношения скорости обратной реакции, диспропорционирования семихинона (*a*, возможно, и Bx^+) и реакции с растворителем или содержащимися в нем примесями. Меньшая устойчивость Bx^+ в может указывать на большую скорость его обратного взаимодействия с семихиноном (или гидрохиноном), растворителем, так как скорость превращения семихинона в опытах с бактериохлорофиллом *a* и *b* не должна изменяться.

Можно предположить, что реакция, подобная описанной выше, моделирует первичную фотореакцию в бактериях *Rhodospseudomonas viridis*.

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

Поступило
31 XII 1974

ЦИТИРОВАНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, т. 81, 879 (1951).
- ² А. А. Красновский, П. Н. Дроздова, ДАН, т. 158, 730 (1964).
- ³ Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, т. 30, 605 (1965).
- ⁴ А. А. Красновский, П. Н. Дроздова, Е. М. Бокучава, ДАН, т. 190, 464 (1970).
- ⁵ Е. М. Бокучава, Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, т. 39, 188 (1974).
- ⁶ D. Fleischman, J. Cooke, Photochem. Photobiol., v. 14, № 1 (1971).
- ⁷ А. В. Умрихина, Н. В. Бубличенко; А. А. Красновский, Биофизика, т. 18, 565 (1973).
- ⁸ А. В. Умрихина, Н. В. Бубличенко и др., ДАН, т. 221, № 4 (1975).
- ⁹ А. А. Красновский, Е. М. Бокучава, Н. Н. Дроздова, ДАН, т. 241, 981 (1973).
- ¹⁰ G. Tollin, G. Grin, Biochim. et biophys. acta, v. 60, 524 (1962).