

УДК 541.14+547.979.4

БИОФИЗИКА

А. В. УМРИХИНА, Н. В. БУБЛИЧЕНКО, В. Н. БЕГИЧЕВ,
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ФОТООБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В СИСТЕМЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА — *n*-БЕНЗОХИНОН

В настоящее время обоснована гипотеза о том, что первичный акт фотосинтеза бактерий связан с фотопереносом электрона от бактериохлорофилла в активном центре к первичному акцептору электрона, при этом возможно образование пары ион-радикалов.

Обратимое фотоокисление бактериохлорофилла хинонами было обнаружено и исследовано в нашей лаборатории (^{1, 2}). Окисленная форма с максимумом поглощения 430 нм была приписана продукту одноэлектронного окисления пигмента. Мы описали возникновение синглетного сигнала э.п.р. при фотохимическом взаимодействии бактериохлорофилла с *n*-бензохиноном, что объяснили образованием радикала бактериохлорофилла (³). Образование радикала бактериохлорофилла показано измерениями э.п.р. при фотоокислении (^{4, 5}) и при химическом и электрохимическом окислении (^{6, 7}) этого пигмента.

В настоящей работе изучены свойства радикальной формы бактериохлорофилла, наблюдаемой при освещении красным светом системы бактериохлорофилл — *n*-бензохинон, в сравнении со свойствами семихинона, возникающего при действии белого света на спиртовые растворы *n*-бензохинона, так как было неясно, почему в системе бактериохлорофилл — *n*-бензохинон на свету наблюдается сигнал э.п.р., принадлежащий радикальной форме пигмента, и не наблюдается сигнал э.п.р. семихинона.

Измерения проводили на радиоспектрометре типа РЭ 1301 в стеклянных ампулах диаметром 3—4 мм, которые освещали в резонаторе радиоспектрометра фокусированным светом ксеноновой лампы ДКСШ-200 через светофильтры. Термостатирующее устройство позволяло проводить измерения в пределах от —196 до 100°. Бактериохлорофилл выделяли из фотосинтезирующих бактерий *Rhodospirillum rubrum* по принятому в лаборатории методу. В качестве растворителя использовали 96% этиловый спирт (ректификат); *n*-бензохинон — дважды возогпанный.

Освещение растворов бактериохлорофилла (10^{-4} М) с *n*-бензохиноном (10^{-2} — 10^{-3} М) в этаноле в вакууме через красный светофильтр КС-19, пропускающий спектральную область поглощения бактериохлорофилла, приводило к возникновению синглетного сигнала э.п.р. с $\Delta H=12$ э и $g=2,0025$. Этот сигнал наблюдается при температуре от —160 до 0°. В диапазоне —160÷—70° синглетный сигнал длительное время (часы) сохраняется в темноте после выключения света, а при —70÷0° медленно исчезает в темноте после светового импульса. При этом не удается регистрировать отчетливого сигнала семихинона (пентет, $\Delta H=5$ э).

На рис. 1 приведены сигналы э.п.р., появляющиеся при действии красного света (светофильтр КС-19) на растворы бактериохлорофилла и хинона в этаноле (а) и при действии желтого света (светофильтр ЖС-17) на растворы *n*-бензохинона в этаноле (б) при температуре —70°. Из рис. 1а видно, что на свету возникает синглетный сигнал, амплитуда которого незначительно уменьшилась после 30 мин. темпового периода, причем это уменьшение сигнала э.п.р. произошло за первые 2—3 мин. темноты, после чего синглетный сигнал долгое время остается без изменения. На рис. 1б.

напротив, видно, что действие возбуждающего света ($\lambda < 400$ нм) на растворы *n*-бензохинона в этаноле приводит к возникновению при той же температуре сигнала э.п.р. со сверхтонкой структурой (квartet с $\Delta H = 5$ э,

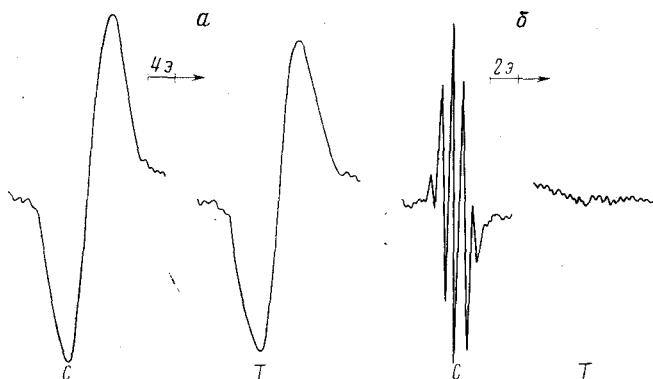


Рис. 1. Спектры э.п.р., наблюдаемые при действии красного света (светофильтр КС-19) на растворы бактериохлорофилла и *n*-бензохинона в этаноле (а) и при действии желтого света (светофильтр КС-17) на растворы *n*-бензохинона в этаноле (б) при -70° . С — свет; Т — темнота после действия света

$g = 2,0048$), т. е. хорошо известного сигнала э.п.р. семихинона. Этот сигнал, в отличие от синглетного, сразу же исчезал после выключения света. Действие красного света (светофильтр КС-19) на растворы одного бактериохлорофилла в этаноле или на растворы одного *n*-бензохинона в этаноле даже при длительном освещении не приводило к появлению измеримых сигналов э.п.р.

Из приведенных данных следует, что синглетный сигнал э.п.р., возникающий в результате фотохимического взаимодействия пигмента с *n*-бензохиноном, принадлежит окисленной радикальной форме бактериохлорофилла, а не радикалу семихинона. Из этих данных следует также, что радикальная окисленная форма пигмента довольно стабильна и при низкой температуре может долгое время сохраняться в темноте, тогда как сигнал семихинона обладает малой длительностью жизни. Можно предположить, что именно нестабильность, т. е. крайне малая длительность жизни радикала семихинона, служит условием стабилизации синглетного сигнала бактериохлорофилла.

Мы исследовали зависимость формы и ширины линии э.п.р. этих радикалов от температуры. Оказалось, что оба радикала наблюдаются во всем исследованном диапазоне температур от -160 до 0° . Однако форма и ширина линии э.п.р. синглетного сигнала практически не изменялась в этом интервале температур (это синглет с $\Delta H = 12$ э). В противоположность этому сигнал семихинона существенно зависел от температуры (рис. 2). Так, при температуре -80° и выше — это квartet с хорошо разрешенной сверхтонкой структурой и $\Delta H = 5$ э. При понижении температуры ниже -80° сверхтонкая структура семихинона постепенно сглаживается, пока, наконец, при температуре -100° и ниже спектр семихинона

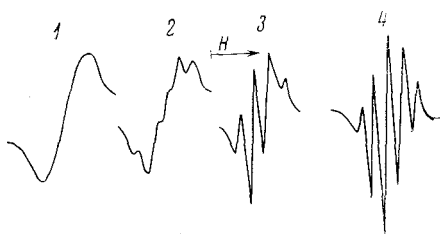


Рис. 2. Изменение структуры спектра э.п.р. семихинона в зависимости от температуры. 1 — -115° ; 2 — -100° ; 3 — -85° ; 4 — -70°

не приобретает вид синглетной линии с $\Delta H=8-10$ э (рис. 2, спектр 2). Такое изменение структуры спектра э.п.р. семихинона известно (8).

Однако остается неясным, почему мы регистрируем в системе бактериохлорофилл — *n*-бензохинон на свету только один, синглетный сигнал и не наблюдаем сигнала семихинона, хотя очевидно, что синглетный сигнал, принадлежащий радикальной форме пигмента, возникает в результате фотохимического взаимодействия фотовозбужденной молекулы пигмента с *n*-бензохиноном и это взаимодействие должно приводить к образованию пары ион-радикалов, а не одного радикала пигмента или радикала окислителя.

Ответ на этот вопрос может быть получен при сопоставлении длительности жизни обоих радикалов — пигмента и семихинона.

Выше уже указывалось, что синглетный сигнал в значительном диапазоне температур долгое время сохраняется в темноте после выключения света, а сигнал семихинона крайне неустойчив и сразу же исчезает после выключения света. Однако при температуре -100° и ниже, когда спектр семихинона приобретает форму синглетной линии, длительность жизни радикала семихинона несколько увеличивается и становится измеримой. Это позволило сравнить скорость исчезновения обоих сигналов э.п.р. На рис. 3б приведены кривые нарастания на свету и падения в темноте сигналов э.п.р. в растворах бактериохлорофилла и *n*-бензохинона (кривая 1) и растворах одного *n*-бензохинона (кривая 2) в этаноле при -115° .

Из рис. 3б видно, что синглетный сигнал ($\Delta H=12$ э) после небольшого падения в темноте за первые 2–3 мин. при дальнейшем стоянии в темноте практически не изменяется, тогда как синглетный сигнал семихинона ($\Delta H=10$ э) полностью исчезает за первые 2–3 мин. темноты. Из этих данных можно было сделать предположение, что (при -115°) в системе бактериохлорофилл — хинон на свету мы наблюдаем суммарный спектр сигналов э.п.р. обоих компонентов системы: окисленной формы пигмента и восстановленного *n*-бензохинона (семихинона), однако из-за близости *g*-факторов происходит наложение обеих линий э.п.р. После выключения света в первые 2–3 мин. темноты сигнал семихинона исчезает, так как он обладает меньшей длительностью жизни по сравнению с радикалом пигмента.

Исчезновение радикала семихинона происходит, по-видимому, в результате реакции диспропорционирования, идущей в этих условиях быстрее рекомбинации образующихся радикалов. Отсутствие в спектре э.п.р. сигнала семихинона при температуре выше -70 – -80° можно объяснить тем, что в этих условиях стационарная концентрация семихинона благодаря малой длительности его жизни слишком низка, чтобы внести изменения в форму светового сигнала э.п.р. в системе бактериохлорофилл — хинон. Однако следует отметить, что в ряде опытов мы наблюдали наложение на синглетный сигнал с $\Delta H=12$ э сигнала семихинона, который сразу исчезал после выключения света. В суммарном спектре на свету и особенно в темноте из-за малой длительности жизни радикала семихинона в обычных условиях опыта мы регистрируем только сигнал окисленного пигмента.

Исследование температурной зависимости показало, что в диапазоне температур от -20 до -155° (рис. 4а) скорость нарастания и величина амплитуды синглетного сигнала э.п.р. увеличиваются с повышением температуры. Они минимальны при -20° и максимальны при -155° . Однако, если сравнить кривые роста амплитуды синглетного сигнала на свету с соответствующими кривыми падения этого сигнала в темноте, то, как можно видеть из сравнения рисунков 4а и 4б, минимальной скорости увеличения амплитуды синглетного сигнала соответствует максимальная скорость ее падения.

Приведенные данные показывают, что с повышением температуры скорость обратной реакции увеличивается. Это приводит к уменьшению

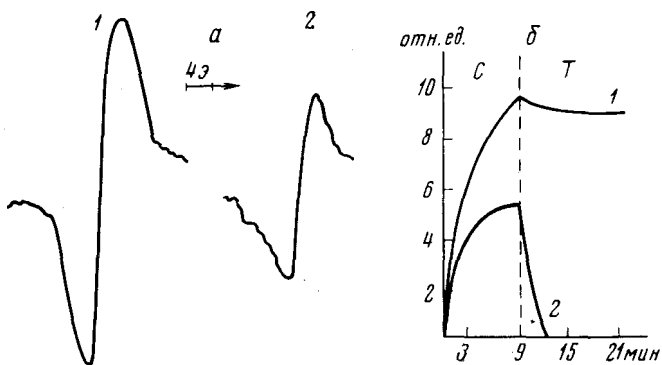


Рис. 3. Вид спектра сигнала э.п.р. на свету (а) и изменение амплитуды сигнала э.п.р. на свету и в темноте после действия света (б) для растворов бактериохлорофилла и *n*-бензохинона (кривая 1, спектр 1) и растворов одного *n*-бензохинона (кривая 2, спектр 2) в этаноле при -120°

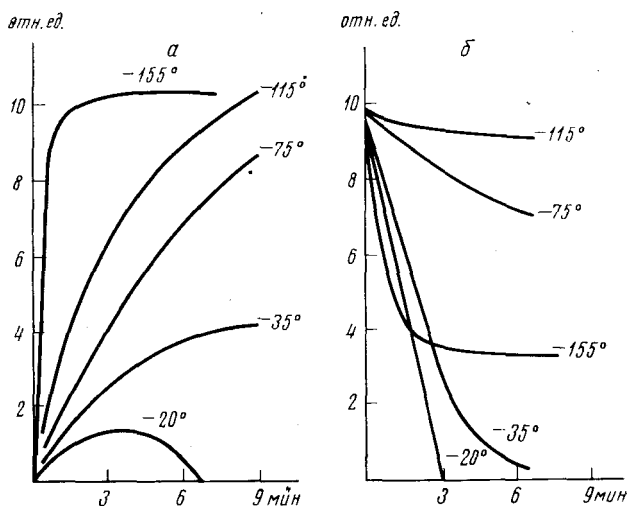


Рис. 4. Изменение амплитуды синглетного сигнала э.п.р. ($H=12$ э) на свету (а) и в темноте после действия света (б) в зависимости от температуры

стационарной концентрации синглетного сигнала на свету, в результате чего суммарная скорость накопления и общий выход синглетного сигнала на свету падают.

Таким образом, в результате взаимодействия возбужденного бактериохлорофилла с *n*-бензохиноном (в температурном диапазоне от -160 до -10°) удается наблюдать долгоживущий радикал окисленного бактериохлорофилла.

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

Поступило
31 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, т. 158, 730 (1964). ² Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, т. 30, 605 (1965). ³ А. В. Умригина, Н. В. Бубличенко, А. А. Красновский, Биофизика, т. 18, 565 (1973). ⁴ А. П. Бобровский, В. Е. Холмогоров, Журн. прикл. спектроскоп., т. 18, 712 (1973). ⁵ J. R. Harbour, G. J. Tollin, Photochemistry and Photobiology, v. 19, 163 (1974). ⁶ J. D. McElroy, G. Feher, D. C. Mauzerall, Biochim. et biophys. acta, v. 172, 180 (1969). ⁷ J. Fajer, D. C. Borg et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 71, 994 (1974). ⁸ Д. Ингрэм, Электронный парамагнитный резонанс в биологии, М., 1972, стр. 107.