

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, В. В. НИКАНДРОВ,
Г. П. БРИН, И. Н. ГОГОТОВ, В. П. ОЩЕПКОВ

ФОТООБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА В РАСТВОРАХ ХЛОРОФИЛЛА, НАД-Н И ХЛОРОПЛАСТАХ

В нашей лаборатории найдены фотобиохимические системы, в которых наблюдалось прямое и фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена. К числу таких систем относятся: фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена хлорофиллом и его аналогами в органических растворителях (¹⁻⁴), в водных растворах детергентов (^{5, 6}), хлоропластами при нарушении их структуры растворителями (⁴), а также фотовосстановление метилвиологена (¹) и ферредоксина (⁷) возбужденными светом молекулами НАД-Н и НАДФ-Н.

В изученных реакциях за счет энергии света, поглощенного фоторецептором, достигалось повышение окислительно-восстановительного потенциала (E_0') до величины потенциала водородного электрода. Поэтому в таких системах следовало ожидать выделения молекулярного водорода, при введении катализатора, способствующего реакции $2e + 2H^+ \rightarrow H_2$.

В согласии с этим целью настоящей работы было изучение фотовыделения водорода некоторыми из описанных систем с введением в них препаратов фермента гидрогеназы.

Гидрогеназа была выделена из фототрофных пурпурных бактерий *Thiocapsa rescopersicina*, штамм BBS. Бактерии выращивались на среде Пфеннига (⁸), содержащей 0,2% ацетата, 0,1% тиосульфата и 0,1% хлористого аммония. Выращивание культуры и выделение гидрогеназы проведено по методу (⁹). Для опытов использовали препарат гидрогеназы с удельной активностью 9,0 мкл H_2 на 1 мл (из раствора восстановленного метилвиологена).

Измерение выделения водорода осуществлялось на газохроматографической установке, описанной ранее (¹⁰). Водный раствор исследуемой системы (1 мл) продували аргоном до полного удаления кислорода, после чего к нему добавляли 0,1 мл водного раствора гидрогеназы (0,62 мг в расчете на белок). Опыты проводили при комнатной температуре ($20 \pm 2^\circ$). Кювету освещали видимым светом лампы накаливания или ультрафиолетовым светом в максимуме поглощения НАД-Н (линиями ртути 365 нм). Хлоропласты выделяли из листьев гороха по методу (¹¹); эти опыты ставили в среде выделения: фосфатный буфер 0,05 М рН 6,5; сахароза 0,5 М; NaCl 0,035 М, $MgCl_2$ 0,002 М. Источники действующего света — осветители ОИ-24, ОИ-28, ртутная лампа ДРШ-250. Линию 365 нм выделяли светочувствительными УФС-1 и СЗС-23.

Фотосенсибилизированное выделение водорода в водных растворах детергентов. В растворе тритона X-100 (0,5%) хлорофилл а+b (оптическая плотность при 670 нм 2,5) при освещении видимым светом сенсибилизирует выделение водорода при использовании доноров электрона, обладающих разной величиной окислительно-восстановительного потенциала: НАД-Н ($E_0' - 0,32$ в), цистеина ($E_0' - 0,22$ в) и аскорбата ($E_0' + 0,05$ в). Без освещения реакция не идет.

Как видно из табл. 1, НАД-Н является наиболее эффективным донором электрона в реакции выделения водорода. Добавление метилвиологена приводит к значительному увеличению выделения водорода в опытах с цистеином и НАД-Н. Аскорбат натрия оказался малоэффективным.

Таблица 1

Фотовыделение водорода, сенсibilизированное хлорофиллом в водных растворах тритона X-100 (0,5%) в присутствии гидрогеназы и разных доноров электрона ($1,4 \cdot 10^{-3} M$) с метилвиологеном ($1,4 \cdot 10^{-3} M$) при освещении белым светом (400–750 нм) $1 \cdot 10^6$ эрг/см²·сек и красным светом (600–750 нм) $7 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек

Системы	Водород, мкл/мин		Системы	Водород, мкл/мин	
	красный свет	белый свет		красный свет	белый свет
НАД-Н	0,070	0,100	Цистеин + MB ²⁺	0,125	0,200
НАД-Н + MB ²⁺	0,150	0,260	Аскорбат натрия	— *	0,001
Цистеин	0,006	0,010	Аскорбат натрия + MB ²⁺	— *	0,001

* Не удалось зарегистрировать в пределах чувствительности метода.

Фотовыделение водорода в водных растворах НАД-Н. Освещение водных растворов восстановленных пиридиннуклеотидов и их синтетического аналога бензилникотинамида (БНА-Н) ультрафиолетовым светом (365 нм) в присутствии гидрогеназы приводило к выделению водорода. Добавление метилвиологена во всех случаях активировало реакцию.

Таблица 2

Выделение водорода при освещении водных растворов НАД-Н и НАДФ-Н и БНА-Н ($1,4 \cdot 10^{-3} M$) в присутствии гидрогеназы и метилвиологена ($1,4 \cdot 10^{-3} M$). Свет (365 нм) $2 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек

Системы	Водород, мкл/мин	Системы	Водород, мкл/мин
НАД-Н	0,12	НАДФ-Н + MB ²⁺	0,62
НАД-Н + MB ²⁺	0,40	БНА-Н	0,10
НАДФ-Н	0,07	БНА-Н + MB ²⁺	0,27

Фотовыделение водорода хлоропластами. В опытах американских исследователей (¹²) описано выделение водорода в суспензии хлоропластов в присутствии гидрогеназы и кислородпотребляющей системы.

В наших опытах при освещении хлоропластов наблюдалось фотовыделение водорода в присутствии экзогенных доноров водорода НАД-Н или НАДФ-Н и гидрогеназы. Результаты этих опытов согласуются с наблюдениями (¹³) о световом выделении водорода бесклеточными препаратами зеленых водорослей *Chlamydomonas eugametos* и цианобактерий *Anabaena variabilis* при использовании в качестве донора водорода НАД-Н-генерирующей системы. Введение диурана (до $10^{-5} M$) не подавляло выделение водорода, что указывает на неактивность II фотосистемы в этом процессе.

Итак, эффективность фотовыделения водорода оказалась близкой в водных растворах детергентов и в суспензиях хлоропластов. Предварительные измерения указывают на величину квантового выхода, достигающего 0,1%.

Описанные наблюдения дают возможность высказать предположение о механизме фотовыделения водорода клетками фотосинтезирующих организмов. Результаты опытов по фотосенсибилизированному хлорофиллом восстановлению метилвиологена с использованием НАД-Н как донора электрона (^{1, 7}) дали возможность предположить наличие такой реакции при фотовыделении водорода водорослями (¹⁴).

Установленное в настоящей работе фотовыделение водорода в присутствии НАД-Н и НАДФ-Н в растворах хлорофилла и суспензиях хлоропластов подтверждает это предположение. Так, при катаболизме (цикл Кребса) углеводов и других продуктов фотосинтеза происходит образование НАД-Н или НАДФ-Н, которые, поступая в I фотосистему, могут быть

Таблица 3

Выделение водорода на красном (600–750 нм) и на белом (400–700 нм) свете хлоропластами, содержащими 0,05 мг/мл хлорофилла в присутствии НАД-Н (10^{-3} М) и метилвиолена (10^{-3} М).
Интенсивность света дана в табл. 1

Системы	Водород, мкл/мин	
	красный свет	белый свет
Без НАД-Н	0,000	0,000
НАД-Н	0,007	0,015
НАД-Н + MB ²⁺	0,072	0,152

донорами водорода при реакции выделения молекулярного водорода с помощью гидрогеназы, находящейся в клетках водорослей. Этот метаболический путь не исключает возможность переноса электрона за счет фотофосфорилирования.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва
Институт фотосинтеза Академии наук СССР
Пущино Московской обл.

Поступило
16 VII 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, т. 163, 761 (1965). ² Г. П. Брин, А. Н. Луганская, А. А. Красновский, ДАН, т. 174, 221 (1967). ³ Г. П. Брин, Сб.: Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, «Наука», 1965, стр. 302. ⁴ Г. П. Брин, А. А. Красновский, ДАН, т. 204, 1253 (1972). ⁵ А. А. Красновский, А. Н. Луганская, ДАН, т. 178, 1441 (1968). ⁶ А. Н. Луганская, А. А. Красновский, Молек. биол., т. 4, 848 (1970). ⁷ А. А. Красновский, Г. П. Брин, В. В. Никандров, ДАН, т. 220, 1214 (1975). ⁸ N. Pfennig, Zbl. Bacteriol. I, Abt. Orig., Suppl. v. 1, 179 (1965). ⁹ И. Н. Гогогов, Н. А. Зорин, Л. В. Богоров, Микробиология, т. 43, 5 (1974). ¹⁰ В. П. Ощепков, А. А. Красновский, Прикладная биохимия и микробиология, т. 10, 760 (1974). ¹¹ D. A. Walker, In: Methodes in Enzymology, v. 23, 217 (1971). ¹² J. R. Benemann, J. A. Berenson et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 2317 (1973). ¹³ F. B. Abels, Plant Physiol., v. 39, 169 (1964). ¹⁴ В. П. Ощепков, А. А. Красновский, Физиол. раст., т. 19, 1090 (1972).