



УДК 541.141.1 + 583.232

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ АКЦЕПТОРОВ ЭЛЕКТРОНА КЛЕТКАМИ СИНЕ-ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

МЕДИАТОРНЫЙ МЕХАНИЗМ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА
ЧЕРЕЗ БИОМЕМБРАНУ

*Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В., Белогурова Н. Г.,
Березин И. В., Никитина К. А., Гусев М. В.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический и биологический факультеты*

Исследована возможность фотовосстановления экзогенных акцепторов электрона с помощью фотосинтезирующих организмов на примере модельной системы феррицианид калия — бензохинон — клетки сине-зеленых водорослей *Anabaena variabilis* и *Anacystis nidulans*. Показано, что фотовосстановление феррицианида калия возможно в присутствии *n*-бензохинона. Реакция фотовосстановления ингибируется диуроном, что указывает на участие в механизме реакции системы разложения воды. Предположен механизм влияния *n*-бензохинона, который включает в себя стадии фотосинтетического восстановления бензохинона и перенос электронов через биомембрану на феррицианид калия. Рассмотрена кинетическая схема медиаторного механизма, согласующаяся с экспериментальными данными.

В последнее время растет интерес к проблеме синтеза энергоемких химических соединений с помощью световой энергии. Этот интерес обусловлен в первую очередь принципиальной возможностью разработки систем, преобразующих солнечную энергию в энергию химического топлива. Так, достаточно детальное обсуждение нашла идея получения водорода из воды на основе использования фотосинтетического аппарата растений, водорослей, фототрофных бактерий [1—4]. Нам представляется, что один из возможных путей реализации идеи искусственного фотосинтеза топлива заключается в использовании фотосинтетического аппарата микроскопических водорослей, способных фотохимически восстанавливать добавляемые в среду экзогенные акцепторы электронов. В том случае, если донором электронов в этих системах служит вода и окислительно-восстановительный потенциал восстанавливаемого соединения близок к потенциалу водородного электрода, появляется термодинамическая возможность выделения из этого соединения молекулярного водорода и осуществления, таким образом, реакции биофотолиза воды.

Известен ряд систем, в которых реализовано фотохимическое восстановление экзогенно добавляемых соединений с помощью фотосинтетического аппарата целых, неразрушенных клеток [5, 6]. Осуществлению такого рода

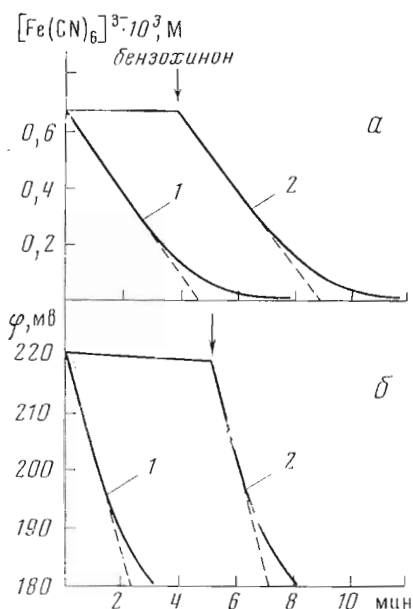


Рис. 1

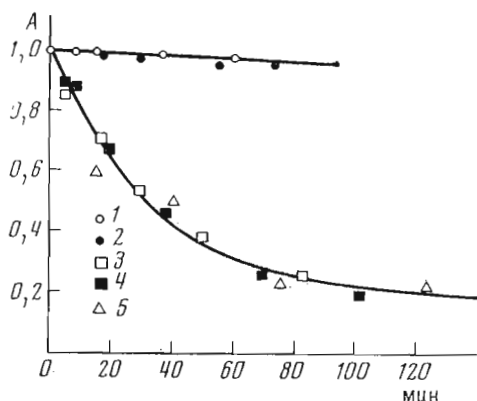


Рис. 2

Рис. 1. Кинетические кривые фотовосстановления феррицианида калия при освещении суспензии клеток *Anabaena variabilis*: 1 — при добавлении бензохинона в исходную смесь, 2 — стрелкой указан момент добавления бензохинона. а — концентрация феррицианид-иона измерялась с использованием спектрофотометрической методики; б — изменение потенциала раствора от времени освещения, измеряемое по потенциометрической методике

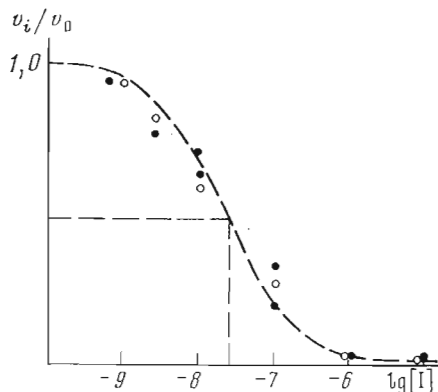
Рис. 2. Изменение активности клеток *Anabaena variabilis* (A) от времени инкубации их в присутствии бензохинона и (или) ферри-ферроцианида калия: 1 — контроль ($A = 1$). В среде присутствуют: 0,35 мМ $K_3Fe(CN)_6$, 0,01 мМ $K_4Fe(CN)_6$ (2), 0,26 мМ бензохинон (3), 0,26 мМ бензохинон, 0,35 мМ $K_3Fe(CN)_6$, 0,01 мМ $K_4Fe(CN)_6$ (4), 0,43 мМ бензохинон (5). В экспериментах 1—4 была использована потенциометрическая методика, в эксперименте 5 — спектрофотометрическая

реакций в большинстве случаев препятствует недоступность реакционных центров фотосинтеза для экзогенных акцепторов электрона. Клеточная мембрана непроницаема для обычных заряженных акцепторов электрона типа феррицианида, дихлорфенолиндофенола и т. п., что приводит к высокому кинетическому барьеру реакции. Данная работа посвящена анализу этой проблемы. В качестве модельной системы выбрана реакция фотопереноса электронов на феррицианид калия с использованием синне-зеленых водорослей [7].

Фотовосстановление классического акцептора электронов в реакции Хилла — феррицианида калия с помощью клеток синне-зеленых водорослей *Anabaena variabilis* и *Anacystis nidulans* происходит только в присутствии *n*-бензохинона (рис. 1). Нам представлялось интересным исследовать механизм этого эффекта, чтобы выяснить: 1) связано ли восстановление феррицианида калия непосредственно с функционированием электроно-транспортной цепи фотосинтеза. Альтернативен механизм, согласно которому восстановление происходит за счет вторичных процессов, стимулируемых действием света; 2) каков механизм влияния бензохинона, обеспечивающий возможность переноса электронов на феррицианид калия.

Чтобы ответить на эти вопросы, мы поставили ряд экспериментов, проведение которых осложнялось тем, что при инкубации клеток с раствором бензохинона происходила инактивация фотосинтетического аппара-

Рис. 3. Зависимость относительной скорости фотовосстановления феррицианида калия клетками *Anabaena variabilis* от концентрации диурана (I). Концентрации веществ в кювете: Na_2HPO_4 — 15, NaCl — 23, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ — 0,7, бензохинон — 0,37 мМ, этанол 3% (по объему), клетки — 0,46 (светлые кружки), 0,10 OE_{680} (темные кружки); рН 7,4; 25°. Кривая имеет теоретический характер при использовании величины K_i $2,5 \cdot 10^{-8}$ М



та клеток. Нами было показано, что именно бензохинон, а не феррицианид калия является инактивирующим веществом (рис. 2). Феррицианид калия практически не инактивирует клетки (рис. 2, 2), в то время как инкубация с бензохиноном приводит к потере ими фотосинтетической активности. В результате этих экспериментов были выбраны условия, в которых можно пренебречь инактивирующим действием бензохинона (время инкубации не должно превышать 5—9 мин).

Классическим тестом на участие электроно-транспортной цепи фотосинтеза в фотовосстановлении экзогенных акцепторов электрона является ингибирование реакции N-(3,4-дихлорфенил)-N',N'-диметилмочевинной (диуроном).

Диурон обратимо ингибирует электроно-транспортные процессы в высших растениях на стадии разложения воды [8] и (или) на стадии сопряжения фотосистемы II и фотосистемы I [9]. Можно думать, что диурон аналогично действует и в случае фотосинтеза сине-зелеными водорослями.

Нами было проведено исследование ингибирования диуроном реакции фотовосстановления феррицианида калия в системе бензохинон — клетки *Anabaena variabilis* (рис. 3). Полученные результаты достаточно строго описываются уравнением

$$v_i = \frac{v_0}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (1)$$

Статистическая обработка результатов даст величину константы ингибирования $K_i = (2,5 \pm 0,7) \cdot 10^{-8}$ М. Константа ингибирования в пределах ошибки эксперимента практически не зависит от концентрации клеток. Это свидетельствует о том, что в условиях опыта концентрация ингибитора много больше концентрации связывающих его центров.

По аналогии с системой хлоропластов высших растений [8, 9] на основании эффекта ингибирования реакции фотовосстановления феррицианида диуроном можно заключить, что реакция протекает непосредственно с участием электроно-транспортной цепи фотосинтеза и первичным донором электронов для восстановления феррицианида калия является вода.

Как было показано (рис. 1), реакция переноса электронов от воды на феррицианид калия в присутствии клеток сине-зеленых водорослей *Anabaena variabilis* и *Anacystis nidulans* протекает только в присутствии бензохинона. При этом скорость фотовосстановления зависит от концентрации бензохинона (см. ниже). Очевидно, действие бензохинона обусловлено проницаемостью для него внешней клеточной мембраны и мембран фотосинтетического аппарата [10].

Можно представить себе два принципиальных механизма влияния бензохинона на фотовосстановление феррицианида калия.

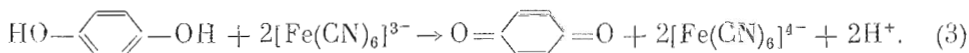
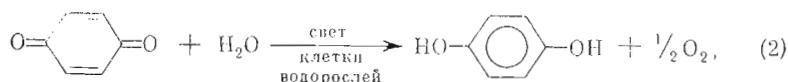
1) Бензохинон действует на мембрану клетки, необратимо «фиксируя» ее, в результате чего она становится проницаемой для феррицианид-иона. Таким же образом на мембраны клеток действуют некоторые альдегиды [11].

2) Бензохинон служит переносчиком электронов (медиатором) между реакционными центрами фотосинтеза и феррицианид-ионами.

Для выбора между этими возможными механизмами нами был поставлен следующий эксперимент. Клетки сине-зеленых водорослей инкубировали в среде, содержащей бензохинон (время инкубации клеток с бензохиноном соответствовало времени, затрачиваемому обычно на измерение фотосинтетической активности клеток, и равнялось ~ 9 мин), затем отделяли от раствора бензохинона и тщательно промывали буферным раствором, после чего измеряли способность клеток фотовосстанавливать феррицианид калия в отсутствие и в присутствии бензохинона.

Результаты эксперимента показывают, что в процессе инкубации клеток с бензохиноном не происходит необратимого увеличения проницаемости клеточных мембран для феррицианида калия. Так, клетки, обработанные бензохиноном, после удаления последнего не обнаруживают фотосинтетической активности по феррицианиду калия. Активность проявляется лишь в результате добавления в среду бензохинона, что говорит в пользу медиаторного механизма влияния бензохинона.

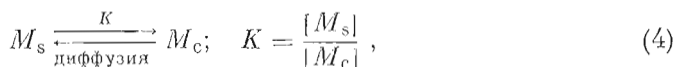
В случае медиаторного, «члнчного» механизма увеличения скорости реакции бензохиноном фотовосстановление феррицианида калия должно быть связано с протеканием следующих реакций:



Известно [5], что клетки микроскопических водорослей способны фотовосстанавливать бензохинон с образованием молекулярного кислорода (реакция (2)). С другой стороны, в отдельном эксперименте нами было установлено, что гидрохинон быстро при смешивании реагентов стехиометрически окисляется феррицианидом калия (реакция (3)).

В работе показано, что акцелирование электронов при фотовосстановлении феррицианида калия в системе клетки сине-зеленых водорослей — бензохинон происходит на уровне первичных электронно-транспортных процессов фотосинтеза. Поскольку электронно-транспортная цепь локализована в мембране клетки, можно думать, что бензохинон играет роль промежуточного переносчика электронов между мембранной гидрофобной фазой и водной фазой, содержащей феррицианид.

На основании изложенных выше фактов можно представить себе следующую модель организации электронного транспорта от реакционных центров фотосинтеза на феррицианид калия. Гидрофобный медиатор (в нашем случае бензохинон) способен проникать в клетку, и при этом, по видимому, устанавливается равновесное распределение медиатора между водной фазой и мембранной фазой клетки



где $[M_s^e]$ — концентрация медиатора в водной фазе, $[M_c]$ — концентрация медиатора в мембранной фазе. В процессе работы фотосинтетического аппарата клетки происходит индуцированный светом перенос электронов от воды в электронно-транспортную цепь фотосинтеза. Этот процесс про-

текает с участием пигментных систем и определенного числа переносчиков электрона. В электронно-транспортной цепи существует переносчик (C), взаимодействие которого с растворенным в фотосинтетической мембране бензохиноном обеспечивает восстановление последнего. Схематично эти процессы могут быть представлены в виде



где C и C^* — соответственно окисленная и восстановленная формы переносчика;



где M_c и M_c^* — окисленная и восстановленная формы медиатора в мембранной фазе. Предполагается, что скорость реакции (5) прямо пропорциональна концентрации переносчика C (коэффициент пропорциональности α), реакция (6) протекает по бимолекулярному механизму. Восстановленный медиатор M_c^* способен диффундировать сквозь клеточную мембрану (реакция (7)), и при этом взаимодействие его с добавленным экзогенным акцептором электрона в водной фазе приводит к восстановлению последнего (стадия 8).



Здесь A и A^* — окисленная и восстановленная формы акцептора (в нашем случае пара ферри-ферроцианид калия).

Нам представляется, что кинетическая схема (4) — (8) достаточно детально описывает механизм, обеспечивающий фотовосстановление акцепторов, не проникающих в фотосинтетическую мембрану. Анализ схемы (4) — (8) позволяет получить уравнение скорости восстановления акцептора A , которое может быть проведено экспериментально.

Схему (4) — (8) описывает система уравнений:

$$v_b = \frac{d[A^*]}{dt}, \quad (9)$$

$$\frac{d[C^*]}{dt} = \alpha[C] - k_1[M_c][C^*], \quad (10)$$

$$\frac{d[M_c^*]}{dt} = k_1[M_c][C^*] - v_{II}, \quad (11)$$

$$\frac{d[M_s^*]}{dt} = v_{II} - v_b, \quad (12)$$

где v_b и v_{II} — соответственно скорости восстановления медиатора и переноса восстановленного медиатора из клетки в раствор. Приняв, что степень восстановления медиатора невелика, уравнения материального баланса можно представить в следующем виде:

$$[M]_0 = [M_s] + [M_c], \quad (13)$$

$$[C]_0 = [C] + [C^*]. \quad (14)$$

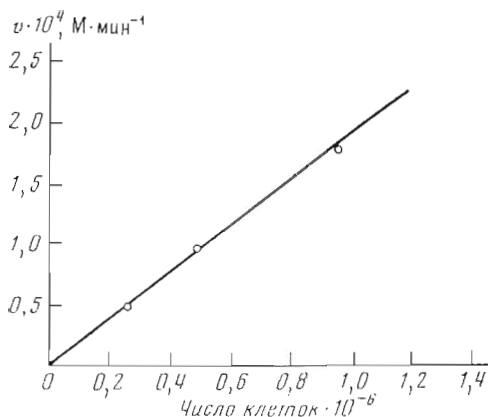


Рис. 4

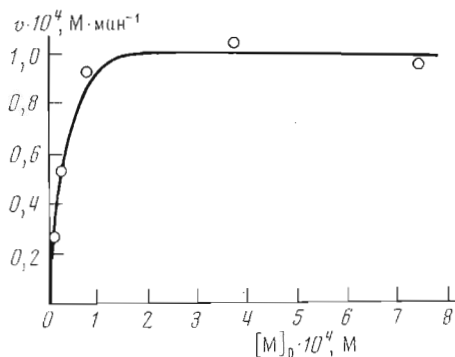


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость скорости фотовосстановления феррицианида калия клетками *Anabaena variabilis* от концентрации клеток

Рис. 5. Зависимость скорости фотовосстановления феррицианида калия клетками *Anabaena variabilis* от концентрации бензохинона

В условиях стационарности $d[C^*]/dt$, $d[M_c^*]/dt$, $d[M_s^*]/dt$ равны нулю, что приводит к уравнению

$$v_v = k_1 [C^*] [M_c]. \quad (15)$$

Использование уравнений материального баланса, а также уравнения (4) позволяет найти скорость реакции как функцию общей, измеряемой на опыте концентрации медиатора $[M]_0$ и общей концентрации переносчика C , которая пропорциональна количеству клеток:

$$v_v = \frac{\alpha [C]_0 [M]_0}{[M]_0 + K_{\text{эфф}}}, \quad (16)$$

где

$$K_{\text{эфф}} = \frac{\alpha(1 + K)}{k_1}. \quad (17)$$

Из уравнения (16) следует, что скорость восстановления экзогенного акцептора линейно зависит от концентрации клеток, а зависимость скорости реакции от концентрации медиатора должна иметь вид кривой с «насыщением». Исследование системы феррицианид — бензохинон — клетки сине-зеленых водорослей (рис. 4 и 5) показывает, что экспериментальные данные достаточно удовлетворительно описываются уравнением (16). В условиях опыта (при данной интенсивности света и концентрации клеток) максимальная скорость реакции равна 10^{-4} M · мин⁻¹. Величина $K_{\text{эфф}}$, найденная из спрямления экспериментальных данных рис. 5 в координатах $1/v$ от $1/[M]_0$, равна $2,3 \cdot 10^{-5}$ M.

Необходимо отметить, что соответствие экспериментальных данных кинетической модели не является однозначным доказательством предложенного механизма. Однако предположения, на основе которых построена кинетическая модель медиаторного механизма влияния бензохинона, не противоречат экспериментально полученным кинетическим результатам.

Таким образом, проведенное экспериментальное исследование системы феррицианид — бензохинон — клетки сине-зеленых водорослей показывает, что в данной системе удается искусственно организовать транспорт электронов от реакционных центров фотосинтеза на экзогенный акцептор электрона, используя гидрофобный мембранорастворимый медиатор.

Экспериментальная часть

Сине-зеленые водоросли *Anabaena variabilis* и *Anacystis nidulans* выращивали по методике, описанной в работе [7]. Перед началом эксперимента клетки отделяли от раствора центрифугированием, дважды промывали буфером, содержащим 20 мМ Na_2HPO_4 , 30 мМ NaCl (рН 7,4) и использовали в течение 3 сут. Клетки хранили в холодильнике при 4° и непосредственно перед экспериментом предварительно освещали лампой мощностью 150 Вт на расстоянии 10 см при 25°. Как было показано специальными опытами, при таком способе хранения фотосинтетическая активность клеток не меняется.

В работе использовали *n*-бензохинон, очищенный возгонкой; *N*-(3,4-дихлорфенил)-*N'*,*N'*-диметилмочевину (диурон) фирмы Gee Lausch Chemicals; феррицианид калия марки х.ч., предварительно перекристаллизованный из воды; ферроцианид марки х.ч., $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ марки х.ч. и NaCl марки ос.ч. До нужного значения рН растворы доводили соляной кислотой марки х.ч. При этом растворы *n*-бензохинона и ферри-ферроцианида для каждой отдельной серии готовили растворением точной навески вещества в воде и хранили в темноте в холодильнике при 4°. Все эксперименты проводили при 25°.

Измерение скорости фотовосстановления феррицианида калия с помощью клеток сине-зеленых водорослей. Спектрофотометрическая методика (рис. 1, а). В кювету спектрофотометра вносили 0,35 мл суспензии клеток в буфере, содержащем 20 мМ Na_2HPO_4 и 0,1 М NaCl (рН 7,4), затем 2,6 мл того же буфера, 0,4 мл 5 мМ феррицианида калия и 0,18 мл 7,4 мМ бензохинона в воде. Концентрация клеток в среде соответствовала 0,35 OE_{680} . Освещение кюветы (здесь и далее) проводили направленным пучком белого света лампы мощностью 400 Вт с системой конденсоров.

Стандартное время от момента добавления бензохинона в кювету до начала освещения составляло 7 мин. Изменение концентрации феррицианида калия регистрировали с помощью спектрофотометра Hitachi-356 с поправкой на рассеяние света клетками микроорганизмов. Спектры снимали в диапазоне 380—480 и 660—700 нм до и после фиксированного времени освещения. Изменение концентрации феррицианида определяли по разности оптических плотностей при 420 нм ($\epsilon_{420} 1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Потенциометрическая методика (рис. 1, б). В потенциометрическую ячейку, содержимое которой непрерывно перемешивалось магнитной мешалкой, вносили 1 мл суспензии клеток в буфере, содержащем 20 мМ Na_2HPO_4 , 30 мМ NaCl (рН 7,4), затем 4 мл того же буфера, 1 мл воды, 0,5 мл 5 мМ феррицианида калия, 0,08 мл 1 мМ ферроцианида калия и 0,5 мл 3,7 мМ бензохинона. Концентрация клеток в среде составляла 0,5 OE_{680} .

Окислительно-восстановительный потенциал раствора измеряли с помощью золотого электрода с использованием цифрового интегрирующего вольтметра EMG-1363 (TR-1653) (электрод сравнения — насыщенный каломельный электрод). Потенциометрическую ячейку освещали лампой мощностью 150 Вт, расположенной на расстоянии 10 см от кюветы.

Инактивация фотосинтетического аппарата клеток при инкубации их с бензохиноном и феррицианидом калия (рис. 2). Инкубацию клеток с бензохиноном и (или) феррицианидом калия проводили в темноте при 25° (специальными опытами было показано, что инкубация клеток на свету или в темноте при 25° не влияет на их начальную активность). Концентрация реагентов в инкубируемой смеси составляла 16 мМ Na_2HPO_4 , 24 мМ NaCl (рН 7,4), концентрация клеток 3,5 OE_{680} (контроль). К отдельным порциям раствора добавляли феррицианид, ферроцианид или бензохинон (см. рисунок). В процессе инкубации отбирали аликвоты и измеряли фотосинтетическую активность клеток с помощью спектрофотометрической или потенциометрической методики по отношению к активности клеток в контрольном опыте, принимаемой за единицу.

Зависимость скорости фотовосстановления феррицианида калия от концентрации бензохинона (1) и клеток (2) в инкубационной среде (спектрофотометрическая методика). 1. В кювету спектрофотометра вносили 0,3 мл суспензии клеток в 20 мМ фосфатном буфере, содержащем 30 мМ NaCl (рН 7,4). Затем добавляли 2 мл того же буфера, 0,4 мл 5 мМ феррицианида калия. Содержимое кюветы перемешивали, после чего добавляли 0,3 мл раствора бензохинона. Концентрацию бензохинона в кювете варьировали в диапазоне $7,4 \cdot 10^{-6}$ — $7,5 \cdot 10^{-4}$ М. Концентрация клеток в среде соответствует 0,8 ОЕ₆₈₀ (рис. 5). 2. Условия эксперимента по изучению зависимости скорости фотовосстановления от концентрации клеток те же; концентрация бензохинона в системе 0,3 мМ, концентрацию клеток варьировали от 0,25 до 1 ОЕ₆₈₀ (рис. 4, в указанном на рисунке диапазоне концентраций клеток поглощение их при 680 нм пропорционально числу клеток с эффективным коэффициентом поглощения, равным $5 \cdot 10^{-7}$ ОЕ на клетку).

Обратимость влияния бензохинона на проницаемость клеточной мембраны. В пробирку для центрифугирования внесли 0,9 мл клеток (7 ОЕ₆₈₀) в буфере, содержащем 20 мМ Na₂HPO₄, 30 мМ NaCl (рН 7,4), 6 мл этого же буфера, 1,2 мл воды и 0,9 мл 3,7 мМ бензохинона. Сразу же после добавления бензохинона содержимое пробирки перемешивали 1,5 мин и ставили центрифугироваться. Отделенные от раствора клетки дважды промывали буфером и окончательно суспендировали в 0,9 мл этого же буфера. Время от момента добавления бензохинона к клеткам до добавления первой порции буфера 9 мин (время, обычно затрачиваемое на измерение активности клеток). Клетки, подвергнувшиеся воздействию бензохинона, были исследованы на их способность к фотовосстановлению феррицианида калия в отсутствие и в присутствии бензохинона. Параллельно определялась фотосинтетическая активность клеток, не обработанных бензохиноном.

ЛИТЕРАТУРА

1. An Inquiry into Biological Energy Conversion (1972) Workshop, Gatlinburg, Tennessee.
2. Benemann J. R., Berenson J. A., Kaplan N. O., Kamen M. D. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 2317—2321.
3. Варфоломеев С. Д., Гусев М. В., Зайцев С. В., Никитина К. А. (1974) Тезисы I Всесоюзного симпозиума по получению и применению иммобилизованных ферментов, с. 32, Таллин.
4. Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. (1976) Докл. АН СССР, 229, № 1.
5. Aronoff S. (1946) Plant Physiol., 21, 393.
6. Warburg O., Luettgens W. (1946) Arch. Microbiol., 71, 303—307.
7. Kratz W. A., Myers J. (1955) Amer. J. Bot., 42, 282—287.
8. Renger G. (1973) Biochim. et biophys. acta, 314, 113—116.
9. Bennoun P., Joliot A. (1969) Biochim. et biophys. acta, 189, 85—94.
10. Leo A., Hansch C., Elkins D. (1971) Chem. Revs, 71, 526—616.
11. Morrison M., Steele W., Danner D. G. (1969) Arch. Biochem. and Biophys., 134, 515—521.

Поступила в редакцию
18.XI.1975

После переработки
6.IV.1976

PHOTOREDUCTION OF EXOGENEOUS ELECTRON ACCEPTORS
BY BLUE-GREEN ALGAE. MEDIATOR MECHANISM OF ELECTRON
TRANSFER PROCESS THROUGH BIOMEMBRANE

VARFOLOMEYEV S. D., ZAITSEV S. V., BELOGUROVA N. G.,
BEREZIN I. V., NIKITINA K. A., GUSEV M. V.

*Chemical and Biological Departments, M. V. Lomonosov State
University, Moscow*

The possibility of photoreduction of exogenous electron acceptors by cells of photosynthetic microorganisms was examined in a model system of potassium ferricyanide-*p*-benzoquinone-cells of blue-green algae *Anabaena variabilis* and *Anacystis nidulans*. The photoreduction of potassium ferricyanide was shown to take place only in the presence of *p*-benzoquinone. The photoreduction reaction is inhibited by 3-(3,4-dichlorophenyl 1,1-dimethylurea), this fact being indicative of the water splitting system participation in the process. A mechanism is suggested to account for *p*-benzoquinone effects, which involves the stages of photoreduction of *p*-benzoquinone and electron transport through a biomembrane onto potassium ferricyanide. The kinetic scheme which agrees with the experimental data is proposed for a mediator mechanism.
