

3. Фотосинтетический аппарат

Фотосинтетический аппарат — это та часть клетки листа или водоросли, которая содержит все компоненты, необходимые для поглощения света и использования энергии возбужденных молекул пигментов в последовательных фотохимических и ферментативных реакциях. Опыты Энгельмана (гл. 2) показали, что пигментами, обеспечивающими поглощение квантов света, являются хлорофиллы. Сведения о субклеточных структурах, содержащих хлорофилл, были получены методами обычной и электронной микроскопии и методами фракционирования компонентов клетки. У зеленых водорослей и у высших

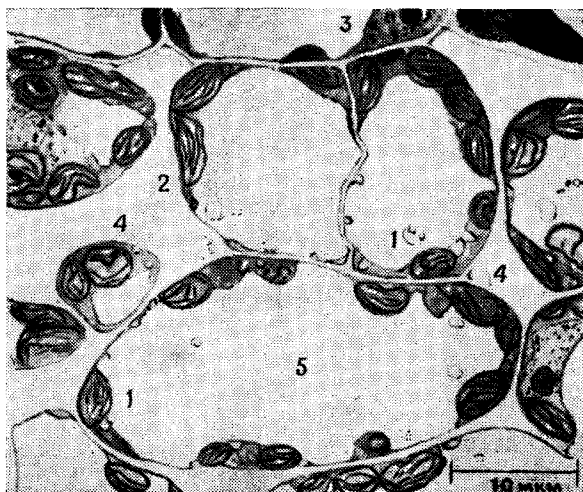
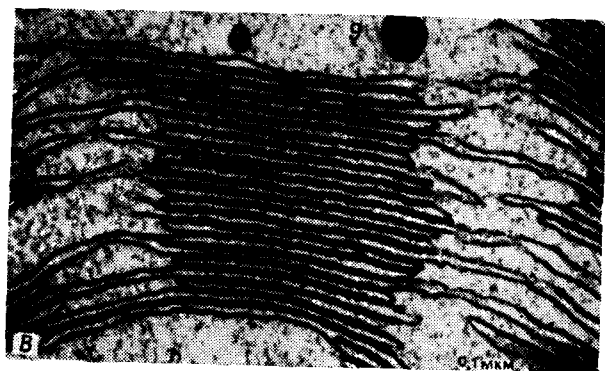
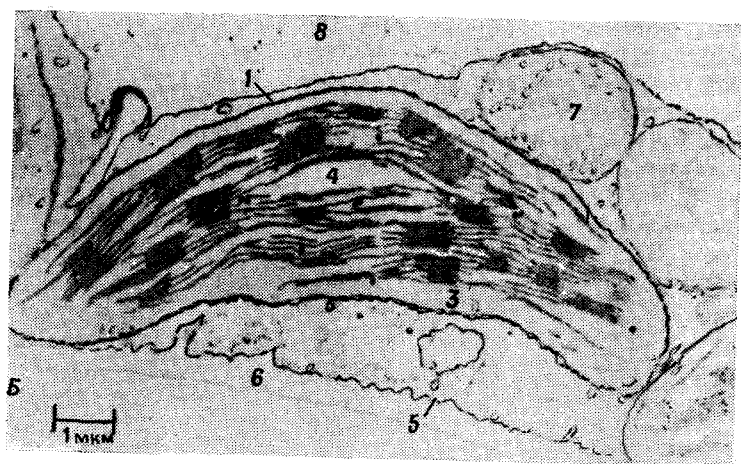
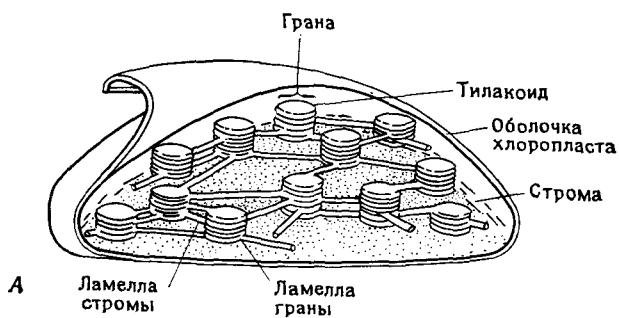


Рис. 3.1. Тонкий срез клеток мезофилла шпината. Видны хлоропласты (1) в цитоплазме, расположенные вдоль клеточных стенок (2); 3 — ядра клеток; 4 — межклеточные полости, заполненные воздухом, в которых происходит свободная диффузия газов к хлоропластам; 5 — вакуоли. [Печатается с любезного разрешения А. Гринвуда (A. D. Greenwood), Department of Botany, Imperial College, London.]



растений хлорофилл содержится во внутриклеточных пластидах, называемых *хлоропластами*. На фотографиях, полученных с помощью электронного микроскопа, видно, что хлоропласты высших растений, например шпината или табака, — это тельца, напоминающие по форме блюдце диаметром от 4 до 10 мкм и толщиной 1 мкм (1 мкм = 10^{-6} м). Наружная мембрана (оболочка) отделяет хлоропласт от остальной цитоплазмы (рис. 3.1). В зависимости от вида данного растения и условий роста число хлоропластов в клетке высших растений может очень сильно различаться — от одного хлоропласта до сотни и более. У многих растений хлоропласты способны воспроизводиться путем простого деления.

Внутри хлоропласта находится система ламелл, или уплощенных *тилакоидов*, сгруппированных в стопки в темно-зеленых участках хлоропласта, называемых *гранами* (рис. 3.2). В каждой ламелле хлоропласта можно различить две двуслойные мембраны. Граны погружены в бесцветный матрикс, называемый *стромой*, а весь хлоропласт окружен двуслойной мембраной, или оболочкой *хлоропласта*. Внутри хлоропласта граны связаны между собой свободно расположенными мембранами — ламеллами стромы. Строение тилакоидов подробно показано на рис. 3.3 и 3.4. Приведенные на этих рисунках модели основаны на данных электронной микроскопии, полученных способом замораживания — скалывания, суть которого вкратце изложена в подписи к рис. 3.3. На поверхностях мембран, наблюдаемых под электронным микроскопом, видно распределение хлорофилл-белковых комплексов, которые погружены в двойной слой липидов, образующих структурный каркас мембраны, или связаны

←

Рис. 3.2. А. Схематическое изображение внутренней трехмерной структуры хлоропласта. Б. Сечение хлоропласта в цитоплазме клетки листа шпината. 1 — оболочка хлоропласта; 2 — граны, состоящие из стопок тилакоидов; 3 — строма; 4 — зернышко крахмала в хлоропласте; 5 — цитоплазматическая мембрана; 6 — клеточная стенка; 7 — митохондрия; 8 — вакуоль. В. Отдельная грана внутри хлоропласта. Видны стопки мембран тилакоидов в гране, а также ламеллы стромы, соединяющие разные граны. 9 — капля липидов в строме.

[Печатается с любезного разрешения А. Гринвуда.]

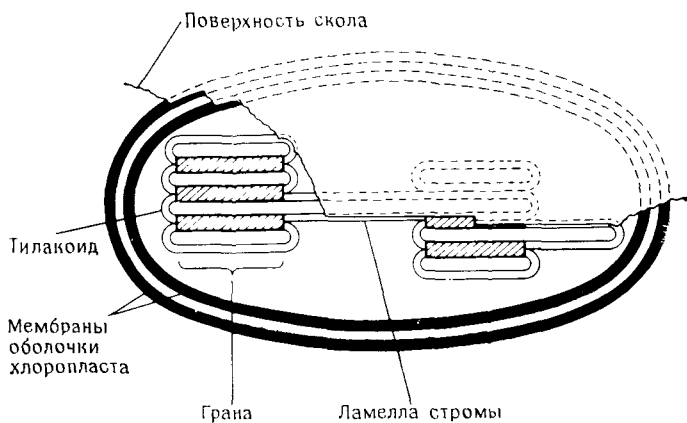


Рис. 3.3. Схематическое изображение строения хлоропласта, наблюдаемого под электронным микроскопом. При приготовлении образца используется метод замораживания — скальвания, благодаря которому удастся увидеть внутреннее устройство хлоропласта. [По Стейлину (Stahelin), *J. Cell Biol.*, 71, 136 (1976).]

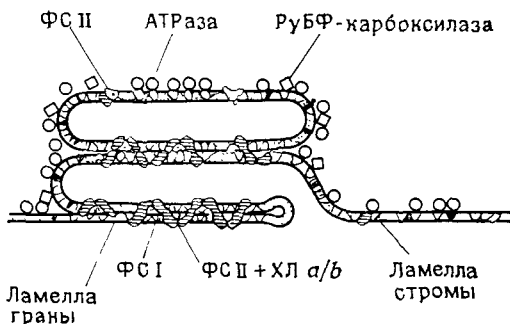


Рис. 3.4. Модель молекулярной организации мембран тилакоидов. Обратите внимание на различие состава ламелл стромы и граны. [По Стейлину и Арнцену (Stahelin, Arntzen), *CIBA Fndn. Symp.*, 61, 147 (1979).]

с ним. Организация комплексов, обнаруживаемых в электронном микроскопе в виде отдельных частиц, различна в области упакованных стопкой мембран гран и в тех участках, где находятся не образующие стопок мембраны стромы. Различие это объясняется тем, что

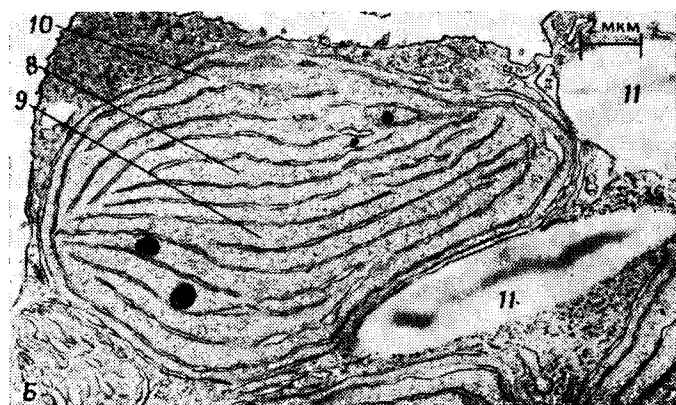
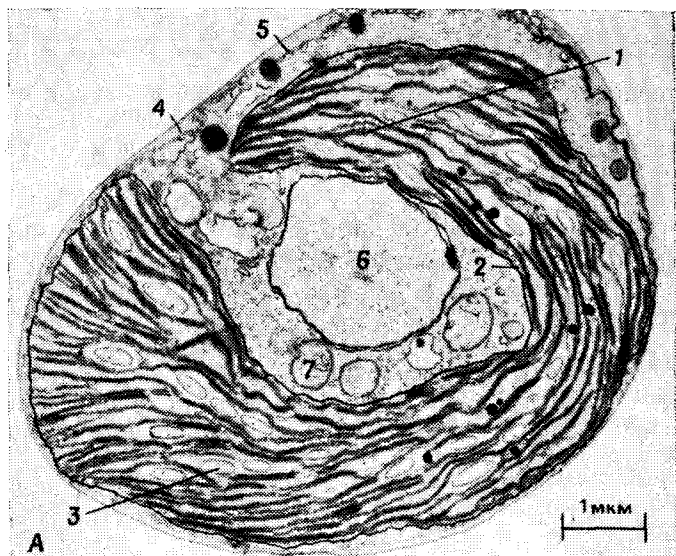


Рис. 3.5 А. Клетки зеленой водоросли *Coccolithus* sp., симбионта, входящего в состав лишайника, имеют чашевидные хлоропласты. 1—тилакоиды, сгруппированные по три; 2—оболочка хлоропласта; 3—зернышко крахмала в хлоропласте; 4—клеточная стенка; 5—цитоплазматическая мембрана; 6—ядро; 7—митохондрия. [Печатается с любезного разрешения Г. Гриффитса (Griffiths), Department of Botany, Imperial College, London].] Б. Хлоропласт красной водоросли *Seramium* sp. с отдельными тилакоидами (8), лежащими почти параллельно друг другу в строме (9). 10—оболочка хлоропласта; 11—зернышки крахмала вне хлоропласта. Темные пятнышки—капли липидов в хлоропласте. [Печатается с любезного разрешения А. Гринвуда (Greenwood).]

фотосистема II, т. е. комплексы, осуществляющие выделение кислорода, находится преимущественно в гранах, а частицы фотосистемы I связаны в основном с ламеллами стромы (см. рис. 5.2).

Ламеллярная структура хлоропластов обнаружена не только у высших растений, но и у водорослей. Форма хлоропластов у водорослей может быть весьма причудливой. На рис. 3.5 показаны хлоропласты зеленой и красной водорослей. Самые древние водоросли, сине-зеленые (их называют также цианобактериями), вообще не содержат хлоропластов как таковых. Фотосинтез у этих организмов происходит в расположенных параллельными слоями ламеллярных мембранах, пронизывающих всю цитоплазму.

Хлоропласты высших растений можно фракционировать, отделив зеленые ламеллы от бесцветного матрикса (стромы). Мембраны ламелл, в которые входит хлорофилл, состоят из белков и липидов в соотношении примерно один к одному. Белки катализируют ферментативные реакции и обуславливают механическую прочность мембран. Большинство светособирающих молекул хлорофилла *a* и хлорофилла *b* связаны со специфическими мембранными белками. Присутствие липидов облегчает запасание энергии и обеспечивает избирательную проницаемость для сахаров, солей, субстратов и т. п. Липиды хлоропластов играют важную роль в сохранении структуры и функции мембраны. Одной из причин разрушения хлоропластов под влиянием тепла или света является выход липидов из мембран и окисление липидов.

Процесс преобразования световой энергии и связанный с ним транспорт электронов при фотосинтезе происходят в ламеллах. Строма содержит много растворимых белков, в том числе ферменты цикла Кальвина — Бенсона (Calvin, Benson) (гл. 6), катализирующие темновые реакции восстановления CO_2 до углеводов.

3.1. Выделение хлоропластов из листьев

Фотосинтетически активные хлоропласты впервые выделил из клетки Хилл. Активность его препаратов ограничивалась выделением O_2 и сопряженным восстановлением нефизиологических акцепторов электрона (см.

гл. 2). Арнон и Уотли (Arnon, Whatley) выделили хлоропласты в изотоническом растворе хлористого натрия (концентрация составляла около 0,35 М, или 2%). Полученные ими препараты были способны к фотовосстановлению NADP^+ и фотофосфорилированию, но фиксировали CO_2 очень медленно, хотя и содержали все ферменты цикла Кальвина — Бенсона (цикла фиксации CO_2). Под световым микроскопом такие хлоропласты казались неповрежденными, но микрофотографии, полученные с помощью электронного микроскопа, показывали, что у этих хлоропластов отсутствует наружная оболочка и что они представляют собой обнаженные системы ламелл. Такие хлоропласты называют хлоропластами «типа С» (разрушенными, broken) (рис. 3.6). Уолкер (Walker) разработал способ выделения хлоропластов «типа А» (целые, complete), у которых наружная оболочка сохраняется и которые могут фиксировать CO_2 со скоростью, достигающей 90% скорости фиксации в целых листьях. Более подробные сведения о типах можно найти в статье Холла (Hall, Nature 235, 125, 1972).



Рис. 3.6. Хлоропласты бобов в забуференном растворе сахарозы. Внутренние мембраны хлоропластов интактны, но наружной оболочки нет. По классификации, приведенной в гл. 3, хлоропласты принадлежат к типу С. [Печатается с любезного разрешения А. Гринвуда и Р. Лича (Greenwood, Leech).]

Ниже описаны два способа выделения хлоропластов, которыми пользуются в нашей лаборатории. Все растворы и аппаратуру следует заранее охладить на льду. Выделение необходимо проводить как можно быстрее (см. также гл. 5).

Способ 1. Методика Уотли и Арнона (видоизмененная)

Среда для измельчения листьев:

NaCl	0,35 М
трис-НСl-буфер, рН 8,0	0,04 М

25 г листьев шпината нарезать на мелкие кусочки длиной 0,5—1 см. Полученный материал поместить в гомогенизатор M. S. E. Atomix (или в бытовой миксер) и залить 50 см³ среды для измельчения. Гомогенизировать 10 с на малой скорости и 20 с на большой скорости. Профильтровать гомогенат через нейлоновый мешочек (или через 4 слоя марли) в центрифужную пробирку. Центрифугировать 4 мин при 2000 g. Отбросить надосадочную фракцию. Ресуспендировать осадок в 2 мл 0,35 М раствора NaCl, пользуясь небольшим кусочком гигроскопичной ваты, намотанным на стеклянную палочку. Полученный препарат состоит из хлоропластов типа С (разрушенных). Фрагменты хлоропластов (тип Е) получают при разведении суспензии 10-кратным объемом воды, доводя концентрацию NaCl до 0,035 М.

Способ 2. Методика Уолкера

Среда для измельчения

Сорбитол	0,33 М
MgCl ₂	0,005 М
Na ₄ P ₂ O ₇ · 10H ₂ O	0,01 М

Довести рН смеси до 6,5 добавляя HCl. Непосредственно перед употреблением добавить изоаскорбат натрия до конечной концентрации 0,002 М.

Среда для ресуспендирования:

Сорбитол	0,33 М
MgCl ₂	0,001 М
MnCl ₂	0,001 М
ЭДТА (этилендиаминтетраацетат)	0,002 М
HEPES (буфер гидроксиэтилпиперазин — этансульфоновая кислота)	0,05 М

Довести рН до 7,6, добавляя NaOH

Гомогенизировать в бытовом миксере 50 г охлажденных листьев шпината в 200 см³ свежеприготовленной среды для измельчения, включая миксер на 3—5 с. Отжать полученную массу через два слоя марли и профильтровать через 8 слоев марли в пластмассовые центрифужные пробирки емкостью 50 см³. Сразу центрифугировать при 0°C так, чтобы общее время для разгона центрифуги от 0 до 4000 г и последующей остановки составило примерно 90 с. Осторожно ресуспендировать осадок с помощью стеклянной палочки и небольшого кусочка гигроскопичной ваты в 1 см³ среды для ресуспендирования (см. выше). В результате получается суспензия хлоропластов, состоящая на 50—80% из хлоропластов типа А (полных), способных к фиксации CO₂ с высокой скоростью.

3.2. Пигменты хлоропластов

Все фотосинтезирующие организмы содержат один или несколько органических пигментов, способных поглощать видимый свет, запуская тем самым фотохимические реакции фотосинтеза. Из большинства листьев эти пигменты можно экстрагировать спиртом или другими органическими растворителями. Выделить индивидуальные пигменты из спиртового экстракта можно методом хроматографии на колонке с сахарной пудрой. Впервые это сделал русский ботаник М. С. Цвет в 1906 г. В растениях и водорослях встречаются пигменты трех основных классов — *хлорофиллы*, *каротиноиды* и *фикобилины*. Хлорофиллы и каротиноиды нерастворимы в воде, а фикобилины растворимы. Каротиноиды и фикобилины называют *вспомогательными*, или *сопровождающими, пигментами*, поскольку энергия квантов света, поглощенных этими пигментами, может передаваться на хлорофилл. В табл. 3.1 приведены характеристики поглощения света этими пигментами. Пигменты фотосинтезирующих бактерий описаны в гл. 7.

Хлорофиллы придают растениям характерный зеленый цвет. Они нерастворимы в воде, но хорошо растворяются в органических растворителях. Хлорофилл *a* имеет голубовато-зеленый цвет, хлорофилл *b* — желтовато-зеленый. Хлорофилл *a* имеется у всех фотосинтези-