

Более детальное исследование эффекта Эмерсона показало, что наряду с максимумами  $\epsilon(\lambda)$ , соответствующими вспомогательным пигментам, в полосе поглощения  $\text{Chl } a$  имеется максимум при 6800 Å (рис. 7.8) [38]. Этот результат показал, что эффект Эмерсона определяется поглощением одного кванта одной формой хлорофилла  $a$  и второго кванта — другой его формой. Максимумы на кривой спектра действия связаны не с поглощением вспомогательных пигментов, но с резонансным переносом энергии возбуждения с этих пигментов на активную форму  $\text{Chl } a$ .

Из изложенных фактов следует гипотеза о двух фотохимических системах, действующих в фотосинтезе —  $\text{ФС } I$  и  $\text{ФС } II$  [1, 39]. Система  $II$  флуоресцирует сильно, система  $I$  — слабо. В зеленых растениях  $\text{ФС } II$  содержит хлорофилл  $a$  с максимумами поглощения 6700 и 6800 Å, но не 6950 Å.  $\text{ФС } I$  содержит все эти три формы  $\text{Chl } a$ . Кванты, поглощенные  $\text{Chl } a$  6700 и  $\text{Chl } a$  6800, переносятся в  $\text{ФС } I$  на  $\text{Chl } a$  6950 и энергия их диссипирует, чем и объясняется низкий выход флуоресценции. Появление пика при 6700 Å на кривой  $\epsilon(\lambda)$  объясняется тем, что  $\text{ФС } II$  содержит большую долю  $\text{Chl } a$  6700, чем  $\text{ФС } I$ .

Если две фотохимические системы сенсibiliзируют две последовательные фотохимические реакции, то они должны действовать с одинаковой скоростью. Свет поглощается одновременно в обеих системах, но в неодинаковой степени. При  $\lambda > 6500$  Å в красных водорослях и при  $\lambda > 6800$  Å в зеленых водорослях система  $I$  получает избыточную, а система  $II$  недостаточную энергию, чем и объясняется красное падение. Нарушается баланс, необходимый для совместной работы двух систем. Баланс этот улучшается при одновременном освещении более коротковолновым светом [1].

### § 7.3. ДВЕ ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Если световые реакции, сенсibiliзированные двумя фотохимическими системами, происходят последовательно, то можно определить спектр поглощения каждой системы, измерив спектры действия фотосинтеза при сильном, но не насыщающем воздействии светом, поглощаемым другой системой. Скорость общей реакции в этом случае определяется лимитирующим

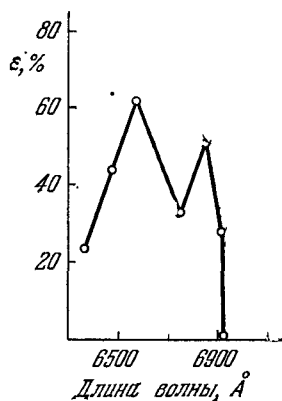


Рис. 7.8. Спектр действия эффекта Эмерсона для хлореллы.

процессом. Если избыточный свет поглощается системой *I*, то скорость реакции, а значит, и спектр действия, лимитируется системой *II* и наоборот. Соответствующие измерения привели к установлению спектров поглощения обеих систем (рис. 7.9) [40]. ФС *II* несколько богаче Chl *b* и Chl *a* 6700, ФС *I* содержит больше Chl *a* 6800 и Chl *a* 6950. Нельзя, следовательно, считать, что Chl *a* 6700 служит сенсibilизатором одной фотохимической реакции, Chl *a* 6800 — другой. Обе реакции связаны друг с другом относительно медленным темновым процессом. Это доказывается тем, что эффект Эмерсона наблюдается и при вхождении в реакционный сосуд под прямым углом друг к другу двух лучей

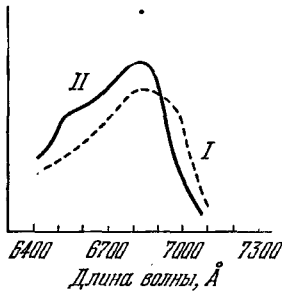


Рис. 7.9. Спектры поглощения ФС *I* и ФС *II* в хлорелле.

По оси ординат — оптическая плотность.

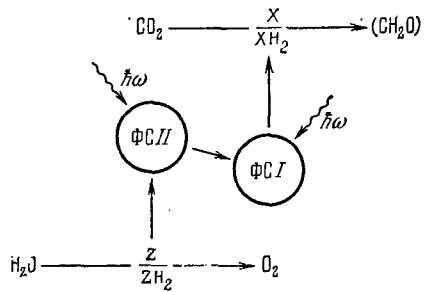


Рис. 7.10. Схема фотосинтеза с двумя фотохимическими стадиями, сенсibilизированными ФС *I* и ФС *II*.

света разной длины волны. При таких условиях коротко- и длинноволновый свет поглощается клетками водорослей в разное время. Эффект Эмерсона обнаруживается при прерывистом воздействии света с разной длиной волны с интервалом между вспышками, достигающим нескольких секунд [41]. В красных водорослях *Porphyridium* выделение  $O_2$  при вспышке зеленого света усиливается, если ей предшествует вспышка красного света, поглощаемого Chl *a* в ФС *I*. Отсюда следует, что при этом получается долгоживущее промежуточное соединение. Время его полураспада оценивается в 18 с. Напротив, выделение  $O_2$  при вспышке красного света не усиливается, если ей предшествует вспышка зеленого; таким образом, зеленый свет, поглощаемый ФС *II*, не создает долгоживущих промежуточных соединений.

Из сказанного следует, что общую схему фотосинтеза можно представить рис. 7.10. Мы пришли к уточнению схемы, показанной на рис. 7.1 [1].

Каким образом поглощенные кванты распределяются между двумя системами так, что они работают с одинаковой скоростью? Здесь предложены две гипотезы. Согласно первой из

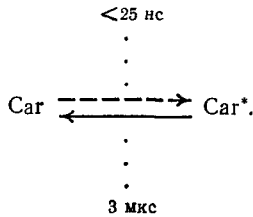
них, избыточная световая энергия, поглощенная  $\text{ФС II}$ , «переливается» в  $\text{ФС I}$ , но не наоборот, так как переход энергии возбуждения с  $\text{Chl } a$  6950 на хлорофиллы  $a$  6800 и 6700 затруднен высоким барьером. «Переливание» приводит к сбалансированному возбуждению обеих систем в области спектра, в которой больше света поглощается  $\text{ФС II}$ , чем  $\text{ФС I}$ . Оно объясняет красное падение при  $\lambda > 6800 \text{ \AA}$ , где свет поглощается главным образом  $\text{Chl } a$  6950 в  $\text{ФС I}$ . В водорослях, содержащих фикобилин,  $\text{Chl } a$  в основном содержится в  $\text{ФС I}$ , и красное падение начинается при 6500  $\text{ \AA}$ .

Вторая гипотеза исходит из пространственного разделения  $\text{ФС I}$  и  $\text{ФС II}$ , находящихся в «отдельных пакетах» (см. [42]). Эта гипотеза более правдоподобна, так как пространственное разделение систем подтверждается опытами по фракционированию вещества хлоропластов. Сбалансированное возбуждение определяется в этом случае не переносом энергии от  $\text{ФС II}$  к  $\text{ФС I}$ , но наличием в обеих системах одинаковых пигментов, хотя и в разных пропорциях. Квантовый выход фотосинтеза должен при этом иметь минимумы в областях, в которых одна из систем поглощает свет сильнее, чем другая. Соответствующая тонкая структура спектра действия была действительно обнаружена.

Изучение дифференциальных спектров поглощения дало богатую информацию о двух фотохимических системах. Дифференциальные спектры исследуются при одновременном поглощении света, возбуждающего фотосинтез. Возбуждающий пучок направлен перпендикулярно к аналитическому. Исследуются изменения в дифференциальном поглощении слабого света при наличии сильного монохроматического освещения (в частности вспышечного) по сравнению с темнотой. Дифференциальный спектр дает сведения о пигментах, испытывающих обратимые изменения при фотосинтезе. Варьируя длину волны возбуждения, удается получить спектр действия и определить пигменты, сенсibiliзирующие изменения в поглощении. Этот метод был развит Дейзенсом [42], вспышечная техника — в работах Кока [43] и Витта [44]. Именно при помощи вспышечной техники, подробно описанной в [44], была получена наиболее детализированная информация о молекулярных событиях при фотосинтезе. Эта техника дает возможность измерять времена жизни  $\tau$  возникающих промежуточных соединений и времена их появления и исчезновения в интервале от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$  с. Времена эти широко варьируют для разных процессов.

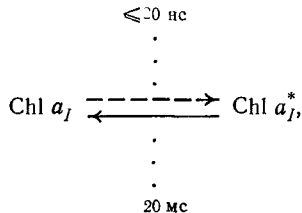
В клетках хлореллы и в хлоропластах зеленых растений при освещении обнаружены изменения поглощения с временем жизни  $\tau = 3$  мкс и временем появления промежуточных соединений, меньшим 25 нс [45, 46]. Дифференциальный спектр этих изменений имеет три отрицательных пика при 4300, 4600 и 4900  $\text{ \AA}$  и

положительный при 5200 Å. Таким образом, в синей области происходит выцветание. Оно интерпретируется как переход некоего каротиноида в метастабильную форму



Это доказывается рядом фактов. Спектр исследуется при температурах, меньших — 160 °С, при которых заблокированы все химические реакции. Он наблюдается при блокировке фотосинтеза добавленным ядом 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевинной (ДХММ) и исчезает полностью в присутствии парамагнитных тушителей (O<sub>2</sub>). В гексане метастабильные состояния каротиноидов характеризуются полосой 5140 Å, близкой к 5200 Å. Возникновение Car\* имеет очевидный биологический смысл. При избыточном освещении энергия должна диссипировать, что и осуществляется через посредство Car\*. Каротиноиды защищают хлорофилл от фотоокисления при избытке света.

Изучение ФС I показало, что содержащийся в ней Chl a, обозначаемый Chl a<sub>I</sub>, окисляется на свету. Этот процесс, представляемый схемой



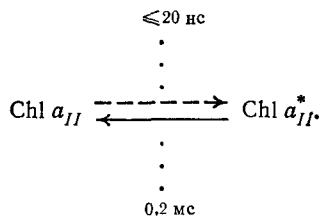
обнаруживается по появлению в дифференциальном спектре отрицательных полос при 4380, 6600, 6820 и 7000 Å [47]. Первая и последняя полосы сильные. При добавлении феррицианида к суспензиям хлоропластов амплитуды этих изменений сильно убывают. Chl a<sub>I</sub> окисляется феррицианидом в темноте и восстанавливается в темноте N-метилфеназонимсульфатом (МФС). В бутаноле фотоокисление чистого Chl a сопровождается появлением отрицательных полос при 4320 и 6660 Å [48], что согласуется с результатами, полученными Красновским [11, 49].

Очень быстрое окисление хлорофилла Chl a<sub>I</sub> показывает, что это первичный продукт. Электрон переходит с Chl a<sub>I</sub> на НАДФ<sup>+</sup>.

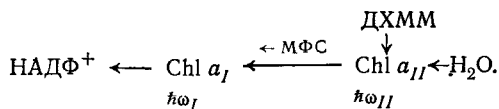
Установлена стехиометрия 1 : 1 окисления  $\text{Chl } a_I$  и восстановления  $\text{НАД}\Phi^+$  [43]. Восстановление  $\text{Chl } a_I$  полностью блокируется ядом ДХММ. Так как этот яд специфически блокирует окисление воды, то конечным донором электрона для  $\text{Chl } a_I^*$  служит вода.

Свет с  $\lambda < 7000 \text{ \AA}$  вызывает обратимые изменения поглощения  $\text{Chl } a_I$ . За окислением следует восстановление в течение 20 мс. Однако в далекой красной области 7000—7300  $\text{ \AA}$  происходит лишь окисление хлорофилла  $a_I$ . Как уже сказано, свет с энергией кванта  $\hbar\omega_I$  вызывает окисление  $\text{Chl } a_I$ , свет с энергией кванта  $\hbar\omega_{II}$  поглощается в ФС II, в результате чего электроны  $\text{H}_2\text{O}$  могут быть использованы для восстановления  $\text{Chl } a_I$ . Пигмент в ФС II может возбуждаться лишь при  $\lambda < 7000 \text{ \AA}$ . Это, по-видимому, также  $\text{Chl } a$ , обозначаемый  $\text{Chl } a_{II}$ . Различие  $\text{Chl } a_I$  и  $\text{Chl } a_{II}$ , возможно, сводится к различию в их окружении. Первый — «длинноволновый», второй — «коротковолновый» хлорофилл.

Время жизни  $\text{Chl } a_{II}$  в 100 раз меньше, чем  $\text{Chl } a_I$ . Тем не менее, удалось выделить реакцию  $\text{Chl } a_{II}$  на свету, характеризующую отрицательными пиками при 4350 и 6820  $\text{ \AA}$  [50]. Схема реакции имеет вид



Как связаны ФС I и ФС II, т. е.  $\text{Chl } a_I$  и  $\text{Chl } a_{II}$ ? Окисление  $\text{H}_2\text{O}$  блокируется ДХММ. Следовательно, этот яд должен вызывать исчезновение обратимых изменений  $\text{Chl } a_I$  и  $\text{Chl } a_{II}$ , если они связаны последовательно. В присутствии ДХММ искусственный донор электронов МФС может снабдить  $\text{Chl } a_I$  электронами вместо  $\text{H}_2\text{O}$ . Если оба хлорофилла связаны, то МФС может реактивировать  $\text{Chl } a_I$ , но не  $\text{Chl } a_{II}$ . Это и наблюдается в соответствии со схемой [44]:



Приведенная схема следует из результатов, полученных с помощью импульсной методики. Не следует, однако, думать, что эта методика дает исчерпывающие данные. Если какой-либо из доноров и акцепторов электрона, участвующий в фотосин-

тетической системе, не имеет соответствующей полосы поглощения, то он может быть не замечен. Так, перенос электрона с  $\text{Chl } a_I$  на НАДФ идет в действительности через ферредоксин (см. далее стр. 353).

Приводимые здесь схемы (они заимствованы у Витта [44]) нельзя считать окончательными. По мере улучшения методики и увеличения точности результатов экспериментов картина все более усложняется. Ясно, что в исследованиях сложных проблем фотосинтеза должны применяться (и применяются) различные методы, дополняющие друг друга.

Свойства  $\text{Chl } a_I$  и  $\text{Chl } a_{II}$  представлены в табл. 7.2 [44].

Таблица 7.2

Свойства хлорофиллов I и II

Свойства	$\text{Chl } a_I$	$\text{Chl } a_{II}$
Тип реакции	Донор электрона	Сенсибилизатор ?
Характеристические изменения поглощения	4380, 6600, 6820—7030 Å	4350, 6400, 6820 Å
Время появления	Расщепление полос	Нет расщепления
Время жизни (20 °С)	≤ 20 нс	≤ 20 нс
Потенциал	20 мс	0,2 мс
Область возбуждения	+ 0,45 В	—
Область рН	< 7300 Å	< 7000 Å
Температура инактивации	3—11	?
Время старения (0 °С)	65 °С	55 °С
Действующая концентрация ДХММ	Нет	τ ≈ 95 час c ≈ 10 <sup>-7</sup> М/л

Связь  $\text{ФС I}$  и  $\text{ФС II}$  осуществляется посредством пластохинонов (ПХ). При экстрагировании петролейным эфиром хлоропласты утрачивают способность окислять воду, но эта способность восстанавливается при добавлении ПХ [51]. ПХ участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. Возбужденный  $\text{Chl } a'_I$  восстанавливает ПХ до гидрохинона,  $\text{Chl } a'_I$  окисляет его вновь. ПХ расположены в виде «пула», содержащего около пяти молекул, между  $\text{ФС I}$  и  $\text{ФС II}$ . (Подробности, относящиеся к кинетическому поведению ПХ, см. в [44], а также далее, см. стр. 372).

Этим дело, однако, не ограничивается. В окислительно-восстановительной цепи две молекулы  $\text{Chl } a_{II}$  находятся в контакте с двумя молекулами неидентифицированного пока что вещества X — возможно также пластохинона, но находящегося в другом окружении. Вещество X восстанавливается  $\text{Chl } a_{II}$  и служит переносчиком электрона. Максимальные изменения в

дифференциальном спектре X — положительная полоса при 3350 Å. Таким образом, получаем схему

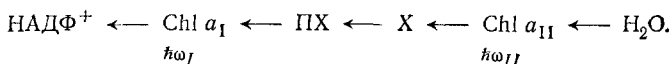


Схема эта не полна — между ПХ и Chl  $a_I$  имеются промежуточные переносчики электронов, равно как между Chl  $a_I$  и НАД $\Phi^+$  (ферредоксин).

Ранее было известно, что в хлоропластах содержатся по крайней мере два цитохрома — цитохром  $b_6$  с окислительно-восстановительным потенциалом, близким к 0,0 В, и цитохром  $f$  с потенциалом, близким к +0,42 В. Позднее был найден еще и цитохром  $b_3$  с потенциалом около -0,15 В. Дифференциальные спектры показывают, что цитохромы (прежде всего цитохром  $f$ ) испытывают обратимое окисление в освещенных фотосинтезирующих клетках. Дифференциальный спектр цитохромов, полученный Дейзенсом и сотрудниками [52], показан на рис. 7.11.

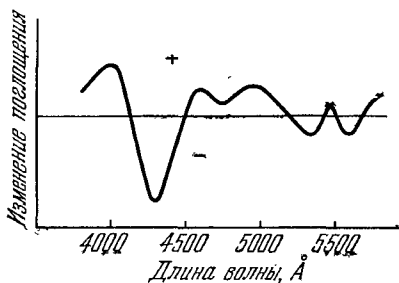
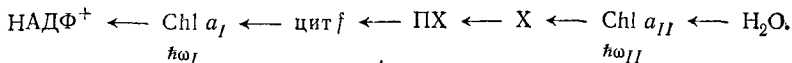


Рис. 7.11. Дифференциальный спектр цитохромов в фотосинтезирующих системах.

Потенциалы цитохромов промежуточны между потенциалами  $\Phi C I$  и  $\Phi C II$ , соответственно цитохромы занимают промежуточное положение между  $\Phi C I$  и  $\Phi C II$ . Фотоокисление цитохрома  $f$  происходит только на свету, поглощаемом  $\Phi C I$ , т. е. Chl  $a_I$  в красных водорослях. Свет, поглощаемый  $\Phi C II$ , т. е. фикоэритрином в красных водорослях, вызывает усиленное восстановление окисленного цитохрома  $f$ . Другие факты, характеризующие роль цитохромов, приведены в [44]. Получается схема



По-видимому, один из цитохромов — цитохром  $b_3$  — функционирует в окисленной форме как первичный окислитель в  $\Phi C II$  [53]. Он служит акцептором электронов, происходящих из  $\text{H}_2\text{O}$ . Цитохром  $f$  может служить в восстановленной форме донором электронов в  $\Phi C I$ , передающим электрон на пиридиннуклеотид. После этого цитохромы  $b_3$  и  $f$  взаимодействуют, причем снова возникает окисленное состояние первого и восстановленное второго. При этом освобождается свободная энергия,

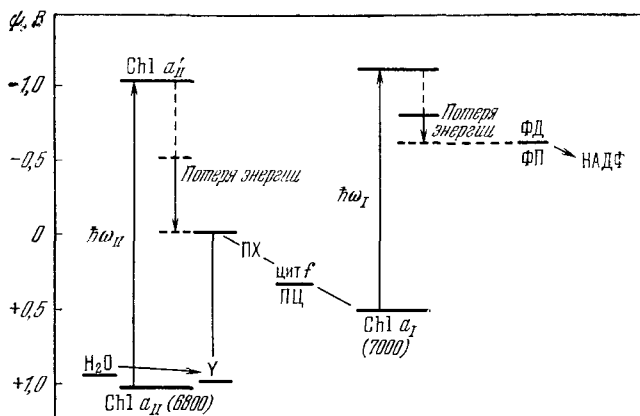


Рис. 7.12. Энергетическая схема событий, происходящих в ФС I и ФС II.  
ПЦ—пластоцианин, ПХ—пластохинон, ФД—ferredоксин, ФП—флавопротеид.

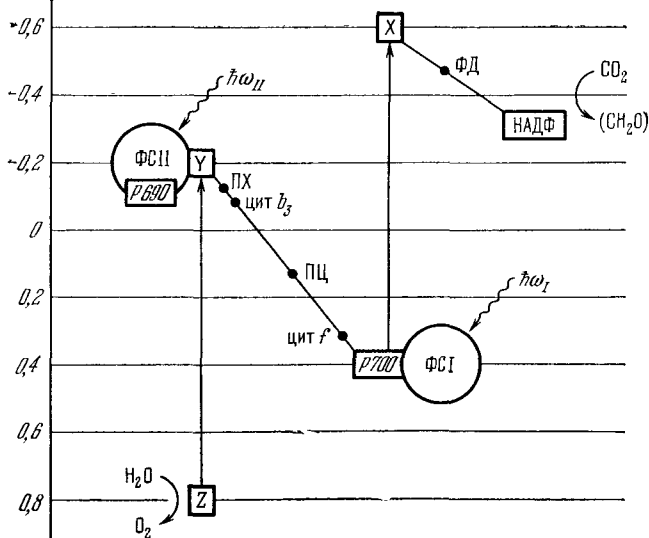


Рис. 7.13. Схема фотосинтеза.

Z и Y—первичные доноры и акцепторы электронов световой реакции II, P 700 и X—первичные доноры и акцепторы электронов реакции I, P 690—реакционный центр ФС II, P 700—реакционный центр ФС I, ПХ—пластохинон, ПЦ—пластоцианин, ФД—ferredоксин.  
По оси ординат отложены окислительно-восстановительные потенциалы в вольтах.



равная 0,4 эВ, которая может быть использована для синтеза АТФ. На рис. 7.12 показана энергетическая диаграмма событий в ФС I и ФС II [44], а на рис. 7.13 — общая схема фотосинтеза (ср. рис. 7.10 и 7.1). Наконец, на рис. 7.14 приведена весьма детализированная схема переноса электронов от  $H_2O$  к  $НАДФ^+$  в хлоропластах [44]. На схеме указаны временные и спектроскопические характеристики соответствующих процессов. Время окисления ПХ 20 мс является лимитирующим. Одновременно функционируют две цепи переноса электронов. Это доказывается следующими соображениями: образование пластогидроксинона за одну вспышку, в которой переносится только один

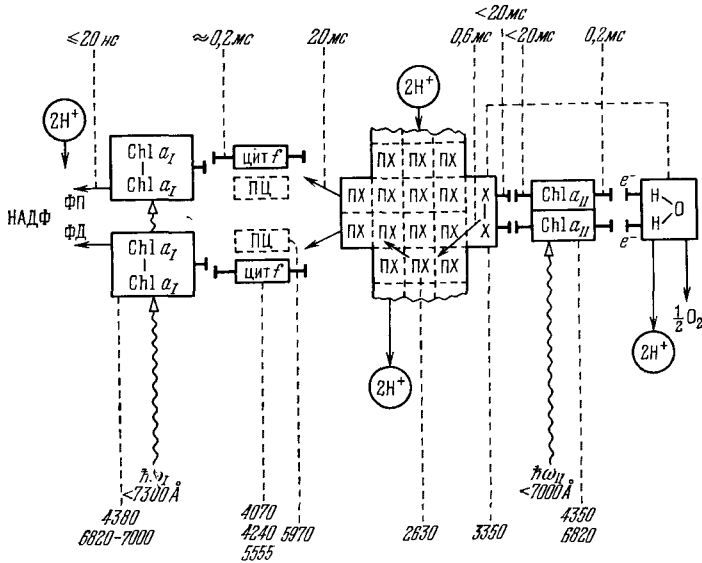


Рис. 7.14. Схема переноса электронов от  $H_2O$  к  $НАДФ^+$  в хлоропластах [44].

электрон, можно понять, лишь если две цепи действуют параллельно; первый порядок реакции исчезновения  $X^-$  3350 (донор электрона для ПХ) можно объяснить лишь наличием двух цепей; кооперация двух  $Chl a_{II}$  доказывается блокированием двух центров  $Chl a_{II}$  одной молекулой ДХММ.

§ 7.4. ИССЛЕДОВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Изучение спектров флуоресценции фотосинтезирующей системы дает ценную информацию о ФС I и ФС II, несмотря на трудности интерпретации получаемых данных. Флуоресцирующая фотосинтезирующая система состоит из различных форм