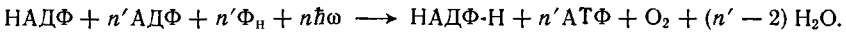


происходит фотофосфорилирование АДФ. Суммарная реакция имеет вид



Эта реакция реализуется в полной системе с участием пигментных систем и цепи переноса электронов. Главные физические

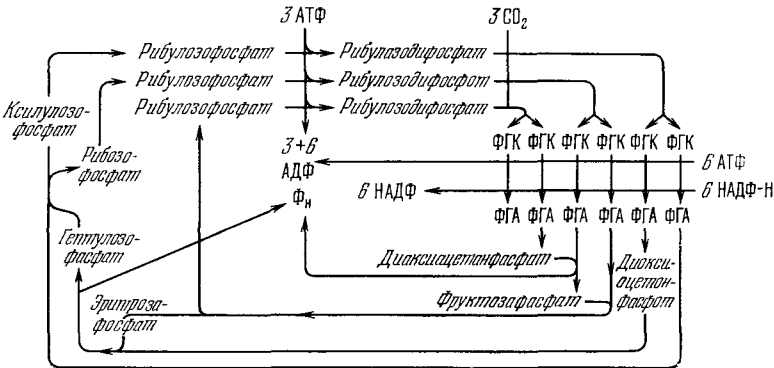


Рис. 7.18. Путь углерода в фотосинтезе.
ФГК—3-фосфоглицерат, ФГА—глицеральдегид-3-фосфат.

проблемы фотосинтеза относятся к механизму фотофосфорилирования, т.е. превращения световой энергии в химическую энергию макроэрга. Эти проблемы рассматриваются в следующих двух параграфах.

§ 7.6. ХЛОРОПЛАСТЫ

Как уже сказано, фотосинтез происходит в органоидах растительных клеток, именуемых *хлоропластами*. На рис. 7.19 приведена электронная микрофотография среза хлоропласта из листа кукурузы [57]. Хлоропласты имеют диаметры, варьирующие от 3 до 10 мкм, и толщину от 1,5 до 3 мкм. Таким образом, хлоропласт заполняет почти всю клетку зеленой водоросли. На рис. 7.19 в хлоропласте видны примерно параллельные *ламеллы*, погруженные в более светлую строму. У высших растений ламеллы плотно упакованы параллельно друг другу и образуют стопки, называемые *гранами*. Ламеллы представляют собой сечения уплощенных замкнутых мешочков — *тилакоидов*, имеющих диаметр около 5000 Å. Число тилакоидов в хлоропласте порядка 1000. Модель структуры хлоропласта, предложенная Вейером [58], показана на рис. 7.20 [57]. Мембрана тилакоида имеет толщину около 100 Å.

Ряд фактов показывает, что все процессы фотосинтеза локализованы в тилакоидных мембранах. Именно в них содержатся активные пигменты, прежде всего хлорофилл. Фрагменты тилакоидов реализуют реакцию Хилла и фотофосфорилирование.

Из фактов, изложенных выше, следует, что молекулы хлорофилла в хлоропластах действуют независимо друг от друга, но



Рис. 7.19. Электронная микрофотография среза хлоропласта.

согласованно, что обуславливается, по-видимому, наличием определенных функциональных единиц, локализованных в тилакоидах. Установлено, что некоторая доля молекул $Chl a$, поглощающих свет вблизи 7000 \AA , ориентирована в хлоропласте определенным образом. Об этом свидетельствуют измерения дихроизма [59, 60]. Цитохром f , по-видимому, расположен близко к этим ориентированным молекулам хлорофилла. При освещении зеленых листьев поглощение в цитохроме f при 5530 \AA уменьшается, т. е. он окисляется. Это происходит и при низких температурах. Одновременно наблюдаются и изменения в спектре $Chl a$. Отметим, что при низких температурах затруднен транспорт электрона на большие расстояния. Отсюда можно заключить, что цитохром f каким-то образом ассоциирован с $Chl a$ или с $P 700$ [57, 61] (см. также § 7.7).

Как указывалось выше, фотосинтез происходит в двух фотохимических системах. Проблема пространственной локализации этих систем в хлоропластах очень актуальна.

При деструкции хлоропластов ультразвуком было установлено, что частицы с константой седиментации 38S, имеющие диаметр порядка 300 Å, сохраняют способность к реакции Хилла [62]. Частицы объемом менее $15 \cdot 10^5 \text{ Å}^3$ уже не активны [63]. Отсюда следует, что наименьшее число молекул хлорофилла, активных в фотосинтезе, равно 40—120 [57].

При освещении хлоропластов или целостных фотосинтезирующих организмов (водорослей) наблюдаются два сигнала ЭПР. Первый сигнал (*R*) представляет собой резкий пик, быстро возникающий и быстро исчезающий. Второй сигнал (*S*) — широкий, медленно возрастающий и еще медленнее исчезающий. *R*-сигнал приписывается Chl *a* и, возможно, P 700, т. е. ФС I, *S*-сигнал — ФС II [64]. *R*-сигнал генерируется наименьшими частицами, получающимися при разрушении хлоропластов, напротив, *S*-сигнал исчезает уже у гораздо больших фрагментов [65].

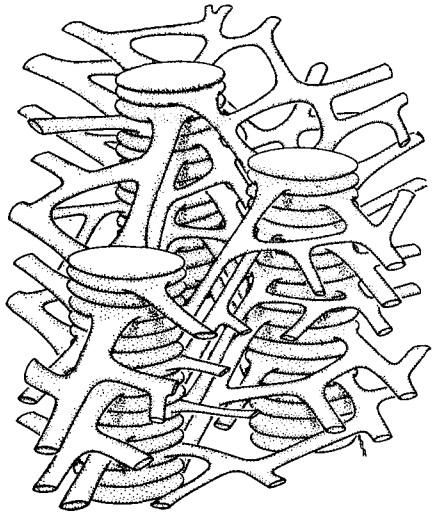


Рис. 7.20. Модель структуры хлоропласта.

Опыты по сегментации хлоропластов показывают, что фотосинтетическая активность действительно присуща отдельным тилакоидам (см. [57, 66]). Более точная локализация пигментных систем пока не установлена. Для этого нужно было бы провести опыты по реконструкции фотосинтетической системы из неактивных фрагментов.

Структурные исследования тилакоидов методом электронной микроскопии показывают, что тилакоиды содержат регулярные, кристаллоподобные системы плотно упакованных гранул [66, 67]. На рис. 7.21 показана электронная микрофотография среза тилакоида из листа шпината. На ней хорошо видны гранулы, размером $185 \times 155 \times 100 \text{ Å}^3$. На некоторых микрофотографиях удается увидеть, что эти частицы в свою очередь построены из четырех или большего числа субъединиц. Молекулярный вес

гранулы оценивается в $2 \cdot 10^6$. Зная состав ламелл, можно, исходя из этой оценки, определить число молекул различных веществ в грануле. Соответствующие данные приведены в табл. 7.4 [67].

Число молекул хлорофилла, равное 230, находится в разумном согласии с независимой оценкой для фотосинтетической единицы (см. стр. 337).



Рис. 7.21. Электронная микрофотография среза тилакоида.

Значение этих гранул снижается тем обстоятельством, что их упаковка варьирует в зависимости от условий роста растения. Частицы, обладающие размерами, близкими к указанным, способны реализовать реакцию Хилла, но не полный фотосинтез, даже если к ним добавлены растворимые компоненты хлоропластов [57].

Рассеяние рентгеновых лучей под малыми углами дает информацию о размерах ламелл [69]. Каждый тилакоид состоит из корпускулярного слоя, построенного из частиц диаметром 31—36 Å. Внутри слоя находится непрерывный элемент толщиной в 42 Å. Общая толщина тилакоида, состоящего из замкнутого корпускулярного слоя, окружающего замкнутый же двойной непрерывный слой, равна 178 Å. Корпускулы диаметром

Т а б л и ц а 7.4

Состав гранулы из тилакоида шпината

Липидная фракция (числа молекул)	Молекулярный вес	Белковая фракция	Молекулярный вес
230 хлорофиллов	206 400	Белок	928 000
48 каротиноидов	27 400	2 атома марганца	110
48 хинонов	31 800	12 атомов железа, в том числе содер- жащиеся в двух ци- тохромах	
		6 атомов меди	672 218
116 фосфолипидов	90 800		
144 дигалактозилдн- глицеридов	134 000		
366 моногалактозил- диглицеридов	268 000		
48 сульфоллипидов	41 000		
Стероиды	15 000		
Неидентифицирован- ные липиды	175 000		
Итого	988 400	Итого	929 000

31 Å соответствуют $\frac{1}{4}$ гранулы. Таким образом, результаты исследования рассеяния рентгеновых лучей в какой-то мере согласуется с построением гранул из субъединиц. Однако нет полного соответствия между данными электронной микроскопии и результатами изучения рассеяния рентгеновых лучей.

Два факта заслуживают особого внимания — кристаллоподобная структура, показанная на рис. 7.20, и отсутствие полной фотосинтетической активности у частиц, имеющих размеры гранул. Возможно, что для такой активности необходим именно упорядоченный коллектив гранул, достаточно большой «кристалл». Высокая упорядоченность и периодичность структуры, не наблюдаемая в других мембранах, заставляет думать о возможности применения представлений физики твердого тела к механизму фотосинтеза (см. § 7.7). Это пока лишь гипотетические соображения. Вместе с тем, нельзя считать исключенными артефакты, создаваемые оттенением посредством OsO_4 или KMnO_4 , применяемым в электронной микроскопии [69] (ср. стр. 290).

Обработка детергентами (дигитонином) с последующим центрифугированием и электрофорезом позволяет определить содержание и состав белков в хлоропластах [171, 172]. Более детальная информация о расположении и ориентации белковых молекул в мембранах получена иммунологическими и

другими методами. Установлено, что в хлоропластах имеются частицы двух сортов: легкие диаметром 70—110 Å и тяжелые диаметром 150—180 Å. Легкие частицы содержат больше $\text{Chl } a$, они способны к циклическому фосфорилированию и к восстановлению НАДФ⁺ в присутствии аскорбата [173]. Тяжелые частицы содержат больше $\text{Chl } b$, они способны восстанавливать на свету феррицианид (реакция Хилла) и проводить нециклическое фосфорилирование. На этих основаниях легкие частицы отождествляются с ФС I, тяжелые — с ФС II. На квадратном микрометре поверхности тилакоида содержится около 4000 легких частиц и около 2000 тяжелых [174]. Из изложенного следует, что число ФС I и ФС II должно быть примерно одинаково. Отсюда можно заключить, что в каждой тяжелой частице содержится две ФС II.

В работающих хлоропластах наблюдаются медленные изменения поглощения при 4750 и 5150 Å, происходящие за секунды [70]. В этих же спектральных областях наблюдаются быстрые изменения поглощения со временем появления полос, меньшим 10^{-5} с, и временем исчезновения 20 мс [71]. Быстрые изменения являются индикаторами окислительно-восстановительных реакций. Установлено, что они происходят параллельно с фосфорилированием. Они отражают изменения электрического поля поперек мембраны, их исчезновение связано с транспортом протонов и других ионов. Действительно, при увеличении проницаемости мембраны для ионов в результате осмотического шока изменения исчезают быстрее. Это происходит и при действии разбавителей фосфорилирования, увеличивающих проницаемость для протонов. Наконец, монофоры, такие как грамицидин D, увеличивающие проницаемость к щелочным ионам, также ускоряют исчезновение спектральных изменений [44], причем имеется четкая зависимость от концентрации грамицидина. Были проведены опыты со слоями $\text{Chl } a$, $\text{Chl } b$ и каротиноидов на стеклянных пластинках. Слои подвергались действию электрических полей с напряженностью до 10^6 В/см и измерялись изменения поглощения. Они оказались совпадающими с изменениями в хлоропластах, индуцированными светом [44]. Изменение поглощения $\Delta I/I = \Delta A$ линейно зависит от изменения потенциала $\Delta\psi$

$$\Delta\psi = q/C = a \Delta A. \quad (7.8)$$

Здесь q — заряд, перенесенный через мембрану, C — емкость мембраны, примерно равная 1 мкФ, $a \approx 50$ мВ/ΔA. Кроме того, работает «молекулярный амперметр», и ток через него равен

$$i = C \frac{d \Delta\psi}{dt} = Ca \frac{d \Delta A}{dt}. \quad (7.9)$$

При вспышке, вызывающей один оборот, через мембрану переносится два элементарных заряда e на одну электронную цепь. Из экспериментальных данных следует, что при этом $\Delta\psi \approx \approx 50$ мВ, при длительных вспышках $\Delta\psi_{\max} \approx \approx 200$ мВ, а при стационарном освещении $\Delta\psi \approx 100$ мВ. Исследование световых реакций показывает, что поле создается наполовину реакцией в ФС I и наполовину — реакцией в ФС II [44].

С помощью стеклянного электрода и индикаторов обнаружены и изменения рН, сопровождающие фотосинтез. При убывании электрического поля одновременно нарастает рН [72]. Согласно оценке отношение числа поглощенных протонов к числу перенесенных электронов равно 2 (дальнейшие подробности см. в [44]).

Эти результаты качественно согласуются с хемиосмотической теорией Митчелла (см. § 6.4), согласно которой перенос электронов дает свободную энергию для фосфорилирования в форме градиентов ψ и рН (см. также [73]).

При вспышке, вызывающей один оборот, $\Delta\psi \approx 50$ мВ, но $\Delta\text{рН}$ очень мало, значительно меньше единицы. Значит, в этих условиях фотосинтез протекает независимо от $\Delta\text{рН}$. Показано, что при единичной вспышке фосфорилирование действительно происходит за счет $\Delta\psi$ с выходом АТФ 0,30 на вспышку и независимо от интервала между вспышками. Фосфорилирование блокируется грамицидином D . При значениях $\Delta\psi$, больших 50 мВ, количество возникающего АТФ пропорционально $\Delta\psi$. Отсюда следует, что электрическая энергия используется для продукции АТФ [74].

На рис. 7.22 показана общая схема сопряжения различных процессов в фотосинтезе, предложенная Виттом [44]. На рисунке показан участок тилакоидной мембраны. При фотосинтезе происходят следующие события, перенумерованные на рисунке:

1. Миграция и диссипация энергии. Энергия запасается и затем диссипирует в Ca^{2+} , а также в результате флуоресценции.

2. Световые реакции, описанные выше (см. стр. 366).

3. Образование электрического поля вследствие направленного переноса электронов перпендикулярно к мембране, определяемого анизотропной ориентацией молекул.

4. Перенос электрона и втекание в мембрану протонов в соответствии с теорией Митчелла (см. §§ 6.4, 6.5): два электрона на внешней стороне мембраны замещаются двумя ионами OH^- , а две дырки (+) на внутренней стороне мембраны — двумя протонами. Возможный механизм — протеолитические реакции, сопряженные с переносом электрона от H_2O к НАДФ^+ .

5. Образование ΔpH . Связанные OH^- и H^+ могут замещаться Cl^- и K^+ . OH^- и H^+ диффундируют соответственно во внешнюю и внутреннюю фазы, что создает разность ΔpH .

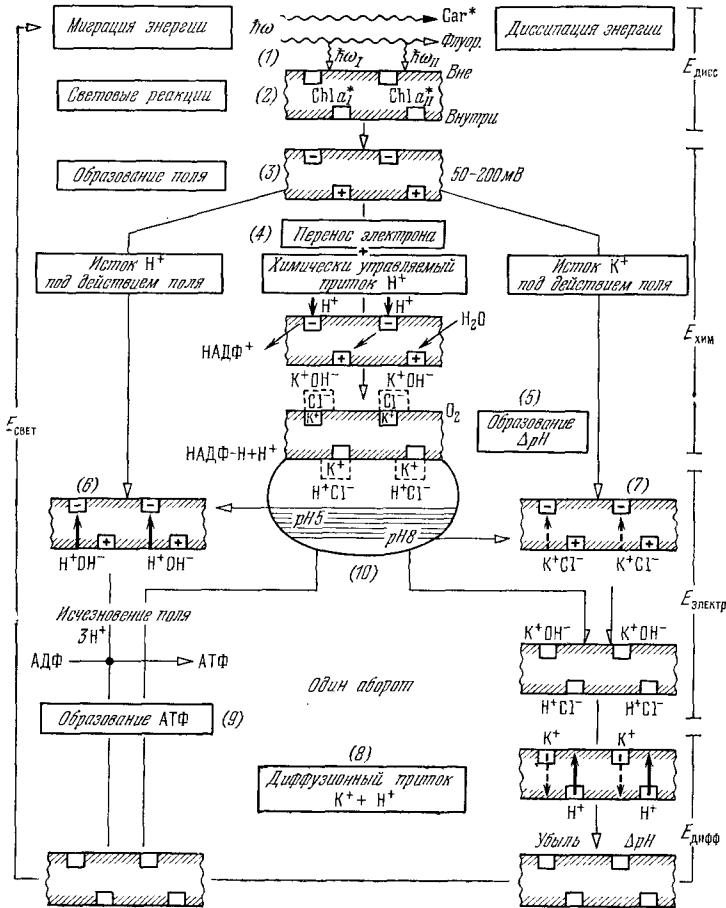


Рис. 7.22. Схема сопряжения молекулярных процессов в фотосинтезе по Витту.

- 6. Управляемое полем истечение протонов и убывание ΔpH .
- 7. Управляемое полем истечение K^+ .
- 8. Диффузионная убыль ΔpH .

9. Фосфорилирование, сопряженное с разрядкой электрически энергизованной мембраны в соответствии с теорией Митчелла.

10. Регуляция внутреннего значения pH^i . При $pH^i \approx 8$ K^+ -проводимость мембраны больше, чем H^+ -проводимость. При генерации H^+ (п. 4) возрастание $[H^+]^i$ замедляет поток электронов, что, в свою очередь, замедляет генерацию H^+ . Возрастание $[H^+]^i$ увеличивает вытекание H^+ , что происходит за счет вытекания K^+ . $[H^+]^i$ поддерживается на определенном уровне. Она возрастает с увеличением частоты вспышек или интенсивности света. В свою очередь, ускоряется процесс б и фосфорилирование (процесс 9).

Таким образом, энергия световых квантов заряжает мембрану. В правой части рис. 7.22 показано, как используется эта энергия.

Положения, суммированные в приведенной схеме, подтверждаются многочисленными и разнообразными опытными фактами. Однако механизмы соответствующих процессов еще не установлены, и эту схему следует пока считать гипотетической.

Вместе с тем, как подчеркивается в монографии [170], применение теории Митчелла к фотосинтезу встречается с трудностями при количественных оценках. В этой теории свободная энергия протонов должна превышать энергию фосфорилирования

$$n_H G_H \geq G_{\Phi}. \quad (7.10)$$

Здесь $G_{\Phi} \approx 0,5 \text{ эВ} \approx 11,5 \text{ ккал/моль}$, n_H — число протонов, перемещение которых приводит к фосфорилированию. В естественных условиях при $\Delta\psi = 50 \text{ мВ}$ и $\Delta pH \approx 2-2,5$ имеем

$$G_H = e \Delta\psi + k_B T \cdot 2,3 \Delta pH \approx 0,18 \text{ эВ}. \quad (7.11)$$

Следовательно, n_H должно быть не менее трех [175, 176]. В работе [177] дается близкая оценка — утверждается, что для синтеза 1 моля АТФ нужны 4 протона. С другой стороны, из соотношения $АТФ/e^- = 2$ и $H^+/e^- = 2$ следует, что на 1 моль АТФ расходуются 2 протона. В условиях импульсного освещения по-прежнему $\Delta\psi = 50 \text{ мВ}$, а $\Delta pH = 0$. Число протонов составляет $0,5/0,005 = 10$. Но отношения $АТФ/e^-$ и H^+/e^- те же и, значит, не хватает энергии восьми протонов.

Таким образом, для применения теории Митчелла к фосфорилированию при фотосинтезе необходим дальнейший анализ, прежде всего уточнение количественных характеристик процесса.

Вместе с тем феноменологическая картина, следующая из всех имеющихся данных, хорошо согласуется с теорией Митчелла.