

А. Ю. БОРИСОВ, Р. А. ГАДОНАС, Р. В. ДАНЕЛИУС,
А. С. ПИСКАРСКАС, А. П. РАЗЖИВИН

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМЫ МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

Природный фотосинтез прямо или косвенно снабжает энергией все живое на Земле. С ним в квазиравновесии по O_2 , CO_2 , P, N и другим соединениям и элементам находится весь живой мир. Каковы же его глобальные характеристики?

За год на Землю поступает солнечная радиация с энергией $\sim 3 \cdot 10^{24}$ Дж. Для сравнения отметим, что энергия всех земных полезных ископаемых (газ, нефть, уголь, уран) оценивается как $2-3 \cdot 10^{22}$ Дж. Это энергия солнечной радиации, приходящая на Землю всего лишь за неделю. Благодаря фотосинтезу биомасса всей планеты запасает за год примерно $3 \cdot 10^{21}$ Дж. Это лишь 0,1% от энергии солнечной радиации, но, с другой стороны, в 10 раз больше той энергии, которая использована человечеством в 1970 году [1, 2].

В природных условиях у наиболее перспективных растений эффективность запасаения солнечной энергии не превышает 1%, а в специальных реакторах, где суспензия водорослей постоянно перемешивается, эта эффективность достигает 3—5%. Поэтому изучение этого фундаментального природного процесса приобретает теперь, на фоне углубляющегося энергетического кризиса, все большую актуальность.

За последнее десятилетие благодаря ярким успехам биохимии и биофизики сложились довольно четкие представления об организации энергопреобразующего аппарата фотосинтеза. Из фотосинтезирующих бактерий, водорослей и растений удалось выделить мельчайшие, размерами всего лишь в десятки-тысячи ангстрем, хлорофилл-белковые комплексы и фрагменты белково-липидных мембран, которые сохраняют способность преобразовывать световую энергию в электрохимическую. Это было засвидетельствовано специально разработанными оптическими дифференциальными спектрофотометрами. С их помощью было показано, что в выделяемых биохимическими методами фрагментах (напр., в хроматофорах из пурпурных бактерий) на свету по различным сторонам белково-липидной мембраны накапливаются сильно восстановленные хиноны и окисленные ионы, т. е. возникает свободная электрохимическая энергия или, иначе, некий фотоаккумулятор. Спектры действия четко показали, что активным для этого фотоэффекта является свет, поглощаемый хлорофиллами. Естественно, встал вопрос о механизмах преобразования солнечной энергии и о трехмерной молекулярной архитектуре соответствующего аппарата.

К настоящему времени установлены следующие факты:

1. Фотоэлектрический аппарат локализован в тонких белково-липидных мембранах фотосинтезирующих организмов. Локальная концентрация хлорофиллов и сопровождающих пигментов в них доходит до долей моля. На пигменты приходится порядка 10% веса биомембран.
2. Молекулы хлорофиллов встроены в белковые глобулы биомембран скорее хаотично, чем упорядоченно.

3. Фотоэлектрическое преобразование порожденных светом электронно-возбужденных состояний (ЭВС) в хлорофилле происходит в специализированных хлорофилл-белковых комплексах — т. н. реакционных центрах (РЦ), которые обычно имеют вес $\sim 50\text{--}100$ килодальтонов и включают в себя четыре молекулы хлорофилла и две молекулы его предшественника феофитина [3].

4. В среднем на каждый РЦ приходится 100—300 молекул т. н. антенного хлорофилла, который лишь поглощает световую энергию [3].

5. Перенос энергии ЭВС от антенного хлорофилла на РЦ осуществляется в основном бестоковым механизмом индуктивного резонанса.

6. Квантовый выход этой доставки энергии составляет для различных представителей мира фотосинтеза 80—95% [2].

Первым, кто экспериментально обосновал механизм индуктивного резонанса в фотосинтезе, был голландский биофизик Л. Н. М. Дэйсенс [4]. Однако в то время в литературе по фотосинтезу бытовали неверные данные о времени жизни ЭВС ($\tau_{\text{ф.л}}$) в хлорофилле $\sim 10^{-8}$ с, что привело ряд авторов к обоснованию медленного, индуктивного резонанса при фотосинтезе. Первые экспериментальные данные, полученные в 60-х годах рядом лабораторий мира методом фазовой флуорометрии, дали значения $\tau_{\text{ф.л}} \sim 1\text{--}2$ нс (см. обзор [2]). Однако наши последующие работы [5, 6] показали, что эти времена ассоциируются с небольшими фракциями хлорофиллов, утерявшими связь с фотосинтетическими процессами. С помощью специально разработанного метода временного рычага нами было установлено [6], что у основной массы антенного хлорофилла $\tau_{\text{ф.л}}$ по крайней мере в 15 раз меньше, чем ранее измеренные, — не более 30—100 пс. Следовательно, если на один РЦ приходится около 100 молекул антенного хлорофилла, то для доставки кванта ЭВС на РЦ требуется не менее 100 актов миграции и время одного акта миграции составляет не более 0,3—1,0 пс [5—8] (подробнее этот вопрос рассмотрен в [2, 7]).

Из вышеуказанных данных по пикосекундным $\tau_{\text{ф.л}}$ нами было сделано несколько принципиальных выводов: а) квантовый выход доставки ЭВС на РЦ высок потому, что время доставки (≤ 100 пс) существенно короче, чем время тривиальных процессов дезактивации ЭВС в антенном хлорофилле в тепло, флуоресценцию и тушение на паразитных центрах и ассоциатах хлорофиллов ($\sim 10^{-9}$ с); б) квантовый выход заселения триплетных уровней антенного хлорофилла не превышает нескольких процентов, так как *in vivo* не имеется факторов, способных увеличить константу интеркомбинационной конверсии, которая у различных хлорофиллов бывает порядка 10^8 с⁻¹ [5]; в) столь короткая активация хлорофилла светом исключает возможность осуществления первичной реакции фотосинтеза механизмом лимитируемой диффузией химической реакции; г) субпикосекундные времена актов миграции по антенному хлорофиллу свидетельствуют о том, что доставка энергии на РЦ осуществляется экситонным механизмом индуктивного резонанса при умеренном диполь-дипольном взаимодействии молекул, оцененном нами как 10^{-2} эВ [5, 6, 2]. Однако все эти выводы базировались на наших данных, полученных с помощью модифицированной техники фазовой флуорометрии. Несомненно, они нуждались в серьезной проверке более прямыми и информативными методами.

Такая возможность возникла с появлением пикосекундных лазеров и соответствующей техники обработки и регистрации пикосекундных процессов. Правда, первые флуорометрические исследования фотосинтезирующих объектов дали артефактные значения $\tau_{\text{ф.л}}$ хлорофилла порядка 10—30 пс. Выяснилось, что адекватный задаче прибор должен обязательно работать в режиме одиночных импульсов с энергией, не превышающей $10^{13}\text{--}10^{14}$ фотон/см² (см. подробнее [9]). Последующие

корректные измерения дали значения $\tau_{\text{фл}} \sim 100 \text{ пс}$ [10^{-12}] (см. обзоры [13, 14]).

В 1973 году начались параллельные исследования фотосинтезирующих объектов методом пикосекундной абсорбционной спектроскопии [15]. Этот метод, в отличие от флуоресцентного, которым могли исследоваться лишь наиболее сильно флуоресцирующие фракции хлорофиллов, оказался значительно информативнее. В частности, именно с его помощью была впервые выявлена кинетика первичной конверсии ЭВС в РЦ пурпурных бактерий [16–18]. В этих же работах было открыто короткоживущее состояние P^F , которое за 120–250 пс превращалось в относительно стабильное (до секунд) состояние с разделением разноименных зарядов по различные стороны белковой глобулы РЦ [16, 17]. Но все эти работы приходилось выполнять на препаратах РЦ, экстрагированных биохимиками из биомембран и лишенных тем самым всей антенной фракции хлорофилла. Работа же на нативных биомембранах требовала существенного повышения чувствительности приборов — вплоть до 10^{-3} – 10^{-4} ед. оптической плотности при собственном поглощении объекта порядка 0,5 ед. Реализация в нашем приборе режима дифференциального спектрофотометра позволила впервые поставить пикосекундные абсорбционные эксперименты на нативных биомембранах — хроматофорах из пурпурной фотобактерии *Rh. rubrum*. Ниже как пример приводятся результаты опытов, выявивших в антенне этих частиц небольшую фракцию хлорофилла В905, фокусирующую ЭВС из антенны на РЦ.

Методы

Эксперименты проводились на многоцелевом пикосекундном спектрометре, созданном на кафедре астрономии и квантовой электроники Вильнюсского государственного университета (ВГУ) [19]. Он оснащен пикосекундным параметрическим генератором света и микро-ЭВМ в схеме *on line*, а также имеет два оптических канала, что позволило впервые реализовать дифференциальный спектрофотометр с пикосекундным временным разрешением и применить его для исследования фотосинтезирующих объектов. Перечислим основные принципиальные особенности прибора: 1) из пикосекундного пуга выделяется один импульс; 2) оптический диапазон перекрывается от 400 до 1500 нм; 3) при накоплении до 120 импульсов на каждой длине волны или в каждой точке кинетики чувствительность по изменениям абсорбции достигает $2 \cdot 10^{-4}$ ед. оптической плотности; 4) благодаря автоматизации эксперимента значительно ускоряется получение заданного массива

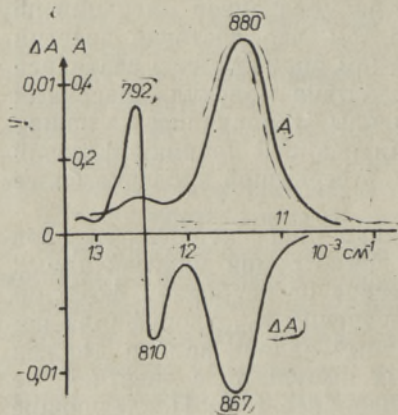


Рис. 1. A — Спектр поглощения суспензии хроматофоров, выделенных из пурпурной фотобактерии *Rh. rubrum*. Полосы при 880 и 800 нм принадлежат переходу $S_0 \rightarrow S_1$ соответственно для антенного хлорофилла и небольшой фракции хлорофилла реакционного центра — Р800. ΔA — Разностный спектр «свет минус темнота», полученный для того же препарата на дифференциальном спектрофотометре, где две идентичные кюветы с суспензией хроматофоров помещались в оба оптических канала прибора и затем один из них освещался постоянным, насыщающим фотосинтез светом.

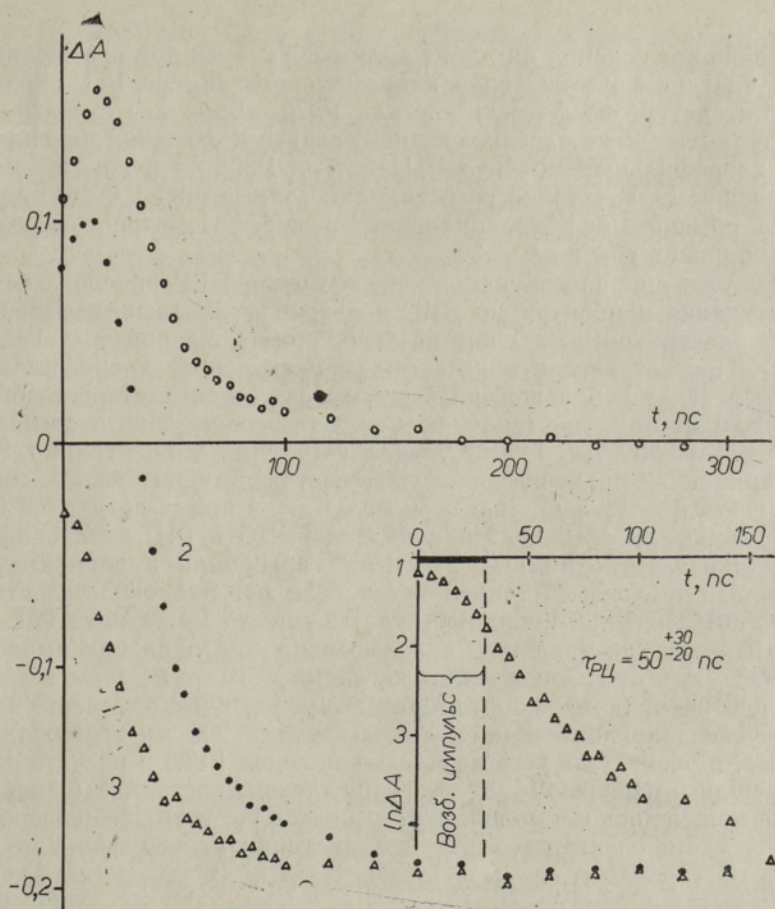


Рис. 2. Кинетика пикосекундных изменений абсорбции суспензии хроматофоров *Rh. rubrum* под действием пикосекундного возбуждающего импульса с длиной волны 900 нм. Оптическая плотность образца при 900 нм составляла 0,4 ед. Длительность импульса 30 нс, энергия — порядка $3 \cdot 10^3$ фотон·см⁻² на засвечиваемой площади кюветы, равной примерно 2 мм². Накопление по 120 импульсов в каждой точке. Кривая 1 — кинетика исчезновения электронных возбужденных состояний антенного хлорофилла В880, снятая по поглощению этих молекул $S_1 \rightarrow S_n$ при 800 нм, где электрохромные изменения абсорбции пигмента РЦ Р800 отсутствуют; кривая 2 — суммарная кинетика исчезновения электронных возбужденных состояний антенного хлорофилла и электрохромных изменений абсорбции пигмента Р800 в РЦ, зарегистрированная при 810 нм; кривая 3 — получена вычитанием кривой 1 из кривой 2 и построена в линейном и логарифмическом (на вставке) масштабах.

информации, что очень важно при изучении недостаточно стабильных биообъектов.

Такие характеристики прибора позволили впервые провести исследования быстрой миграции энергии по хлорофильной антенне и внутри РЦ у фотосинтезирующих бактерий [19-21].

Экспериментальные данные и их обсуждение

В спектре поглощения суспензии хроматофоров из *Rh. rubrum* доминирует полоса абсорбции при 880 нм антенного хлорофилла (рис. 1).

Уменьшение поглощения на длине волны 867 ± 3 нм при освещении происходит за счет фотоокисления хлорофильного димера РЦ, обозначаемого в литературе по фотосинтезу как Р870. «Бабочка» с центром при 800 нм есть следствие электрохромного сдвига полосы поглощения двух других хлорофильных молекул РЦ — т. н. Р800 — в локальном поле образовавшегося электрического диполя. Данные рис. 1 были получены нами на обычном дифференциальном спектрофотометре с постоянной времени порядка секунды.

Затем уже на пикосекундном спектрометре ВГУ прослежены кинетика затухания концентрации ЭВС в антенном хлорофилле В880 и появление электрохромных сдвигов абсорбции в хлорофилле РЦ Р800 (рис. 2). Просветление в полосе фракции антенного хлорофилла В880 означает переход небольшой доли его молекул в синглетное возбужденное состояние под действием возбуждающего лазерного импульса с длиной волны 900 нм. Последующее затухание концентрации ЭВС в В880 (кривая 1) практически отслеживает форму возбуждающего импульса света с длительностью ≈ 30 пс. Отсюда время затухания ЭВС в В880 оценено как ≤ 10 пс. Но появление ЭВС в РЦ, прослеживаемое по кинетике электрохромных изменений абсорбции в пигменте Р800* (кривая 3), происходит только через ≈ 50 пс. Это свидетельствует о том, что ЭВС из В880 попадают куда-то еще до их захвата РЦ. Предпринятый нами спектральный поиск выявил еще один пик выцветания около 905 нм, который появлялся за время ≤ 10 пс и затем исчезал за 60 ± 15 пс. Рис. 3 (кривая А) отображает мгновенные изменения абсорбции в суспензии хромофоров под действием 900 нм возбуждающего импульса, в результате чего несколько молекул В880 в расчете на один РЦ перешли в первое синглетное возбужденное состояние (сходные изменения получались и при действии импульса 532 нм). Небольшое плечо в правой части спектра говорит о выцветании некоей фракции хлоро-

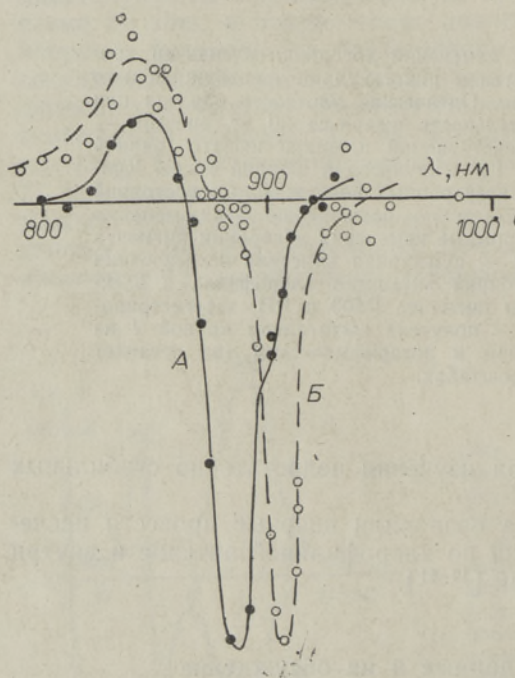
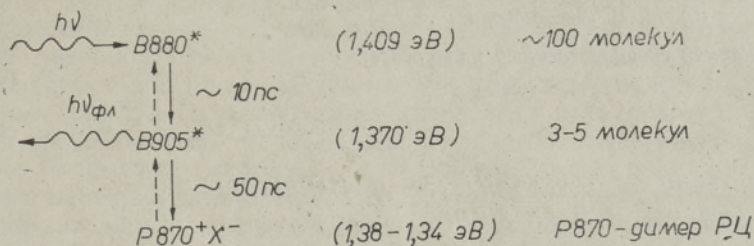


Рис. 3. Спектры пикосекундных изменений абсорбции под действием возбуждающих импульсов (все данные, как на рис. 2). А — Спектр снят при низкой интенсивности возбуждающих импульсов (менее 10^{15} фотон·см $^{-2}$), совпадающих по времени с зондирующими импульсами. Б — Спектр снят также при нулевой задержке зондирующих импульсов относительно возбуждающих, но при высокой интенсивности последних (более 10^{17} фотон·см $^{-2}$).

* Наблюдать изменения в основной полосе димера РЦ при 867 нм затрудняет наложение эффектов выцветания полос В880* и В905*.

филла с $S_0 \rightarrow S_1^*$ -переходом в более длинноволновую область спектра. Эта гипотетическая фракция хлорофилла четко выявлялась в спектре, снятом при низкой интенсивности возбуждающего импульса. При этом ЭВС в 880 полностью исчезали и оставалось лишь выцветание около 905 нм (кривая Б, по амплитуде соответствующая возбуждению примерно 4 ± 1 молекул хлорофилла). Впрочем, с этим выводом не следует спешить, поскольку попадание сразу нескольких ЭВС в небольшую группу молекул может вызывать в ней различные нелинейные взаимодействия. С другой стороны, при сильном взаимодействии молекул даже одно ЭВС в них, по-видимому, может приводить к сильному выцветанию абсорбции в основной полосе. По-видимому, такая группа молекул находится рядом с каждым РЦ, поскольку времена затухания ЭВС в 905 и появление электрохромных сдвигов у Р800 в пределах погрешности совпадают. Поэтому нам представляется логичной следующая схема переноса энергии светоиндуцированных ЭВС от антенны к РЦ:



На фракцию 905 как на ловушку «скатываются» ЭВС из ~100 антенных молекул 880, так как их энергии отличаются примерно на 40 мэВ, а затем они захватываются РЦ, по-видимому, сразу же порождая в них состояние P^F с разделением зарядов ($P870+X^-$). Миграция ЭВС от 905* на РЦ, приводящая к возникновению синглетного возбужденного состояния димера Р870, представляется менее вероятной из-за энергетического барьера между ними порядка 55 мэВ. Наблюдаемая у хроматофоров *Rh. rubrum* флуоресценция с максимумом при 915 ± 5 нм (по литературным данным) испускается, очевидно, фракцией 905, поскольку время жизни в ней ЭВС по крайней мере в несколько раз больше, чем в 880. По-видимому, часть этой флуоресценции является пикосекундным послесвечением за счет обращения процесса $P870+X^- \rightleftharpoons P870X \rightleftharpoons P905^*$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bolton, J. R., Hall, D. O., Ann. Rev. Energy, 4, 353—401 (1979).
2. Borisov, A. Yu., In: Topics in Photosynthesis (ed. J. Basler), 3, Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979, p. 1—26.
3. Blankenship, R. E., Parson, W. W., the same as ref. 2, p. 71—114.
4. Duysens, L. N. M., Thesis, Utrecht, 1952.
5. Борисов А. Ю., Ильина М. Д., Биохимия, 36, № 4, 822—825 (1971).
6. Borisov, A. Yu., Godik, V. I., J. Bioenerget., 3, 211—220 (1972).
7. Борисов А. Ю., Молекуляр. биология, 12, вып. 2, 267—275 (1978).
8. Borisov, A. Yu., Godik, V. I., Biochim. Biophys. Acta, 301, 227—248 (1973).
9. Campillo, A. J., Kollman, V. H., Shapiro, S. L., Science, 193, 227—229 (1976).
10. Campillo, A. J., Hyer, R. G., Monger, T. G., Parson, W. W., Shapiro, S. L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 1997—2001 (1977).
11. Searle, J. F., Barber, J., Harris, L., Porter, G., Tredwell, C. J., Biochim. Biophys. Acta, 459, 390—401 (1977).
12. Paschenko, V. Z., Kononenko, A. A., Protasov, S. P., Rubin, A. B., Rubin, L. B., Uspenskaja, N. Y., Biochim. Biophys. Acta, 461, 403—414 (1977).

13. Holten, D., Windzor, M. W., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **7**, 189—227 (1978).
14. Campillo, A. J., Shapiro, S. L., In: *Topics in Applied Physics* (ed. S. L. Shapiro), **18**, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1977, p. 318—367.
15. Netzel, T. L., Rentzepis, P. M., Leigh, J. S., *Science*, **182**, 238—241 (1973).
16. Kaufman, K. J., Dutton, P. L., Netzel, T. L., Leigh, J. S., Rentzepis, P. M., *Science*, **188**, 1301—1304 (1975).
17. Rockley, M. G., Windzor, M. W., Cogdell, R. J., Parson, W. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2251—2254 (1975).
18. Shuvalov, V. A., Klevanik, A. V., Sharkov, A. V., Matveetz, Yu. A., Kryukov, P. G., *FEBS Lett.*, **91**, 135—139 (1978).
19. Ахманов С. А., Борисов А. Ю., Козловский В. С., Разживин А. П., Данелюс Р. В., Пискарскас А. С., *Биофизика*, **23**, 912—913 (1978).
20. Akhmanov, S. A., Borisov, A. Yu., Danielius, R. V., Gadonas, R. A., Kozlovski, V. S., Piskarskas, A. S., Razjivin, A. P., Shuvalov, V. A., *FEBS Lett.*, **114**, 149—152 (1980).
21. Борисов А. Ю., Годик В. И., *Изв. АН СССР, сер. физ.*, **44**, № 4, 738—744 (1980).

*Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова*

Вильнюсский государственный университет

A. J. BORISSOV, R. A. GADONAS, R. V. DANELIUS,
A. S. PISKARSKAS, A. P. RAZZIVIN

ENERGIAÜLEKANDE MEHCHANISMID JA KINEETIKA FOTOSÜNTEESIS

Artiklis on antud ülevaade fotosünteesi primaarsete fotofüüsikaliste protsesside uurimisest optiliste pikosekundmeetoditega, vaadeldud elektronergastuse energia ülekannet valgust koguvalt antenniklorofüllilist reaktsioonitsentritele ning kirjeldatud Vilniuse ülikooli 10—20-ps-lise aeglahutusega laserspektromeetrit, millega esmakordselt uuriti energia-ülekannet purpurbakterite natiivsetes kromatofoorides.

A. Yu. BORISOV, L. A. GADONAS, R. V. DANELIUS,
A. S. PISKARSKAS, A. P. RAZZIVIN

KINETICS AND ENERGY MIGRATION IN PHOTOSYNTHESIS

The optical picosecond studies of photosynthesis are reviewed briefly. The processes of migration of photoinduced electronic excitations from light-harvesting chlorophyllous «antenna» to energy-converting reaction centres are outlined. A multi-purpose picosecond laser spectrometer, developed in Vilnius State University, is introduced. The optical parametric oscillators employed in this instrument enabled a wide optical region from 450 to 4800 nm to be covered. The automatization of the experiment and computer-processing of the running data from three optical channels increased the sensitivity up to $2 \cdot 10^{-4}$ o.d. units at a low energy in exciting and probing monopulses ($\leq 10^{12}$ — 10^{14} photons) and the time resolution of ≈ 10 —20 ps.

The instrument enabled us to investigate for the first time the intact chromatophores of purple bacteria. The kinetics of excitation migration from antenna chlorophylls to reaction centres were observed. A new small fraction of chlorophyll was discovered which focusses excitations from numerous antenna chlorophylls in the nearest proximity of the reaction centre.