

А. К. ЧИБИСОВ, Н. И. ЗАХАРОВА, Т. Д. СЛАВНОВА,
А. Ф. ПЕШКИН, А. В. КАРЯКИН

**КРАТКОВРЕМЕННЫЕ СВЕТОИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ПОГЛОЩЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ
1-й ФОТОСИСТЕМЫ**

(Представлено академиком А. П. Виноградовым 30 XII 1974)

Известно (¹⁻³), что перенос электрона, разложение воды и выделение кислорода при фотосинтезе обусловлены функциональными особенностями реакционных центров. В этой связи одной из актуальных проблем в исследовании механизмов первичных процессов фотосинтеза является установление свойств и строения реакционных центров (р.ц.) 1-й и 2-й фотосистем. Низкие концентрации р.ц. в хлоропластах растений в ряде случаев затрудняют изучение первичных фотореакций с участием р.ц. (^{4, 5}). Поэтому перспективным направлением следует считать исследование свойств р.ц. в частицах хлоропластов, обогащенных центрами, а также в хлорофилл-белковых комплексах (^{6, 7}). Более того, отсутствие ряда промежуточных переносчиков электрона электронтранспортной цепи (цитохромы, пластоцианин, ферредоксин и др.) у хлорофилл-белковых комплексов позволяет значительно надежнее отождествлять светиндуцированные изменения поглощения с первичными процессами в р.ц.

В ряде работ (^{7, 8}) было показано наличие р.ц. 1-й фотосистемы (P700) в пигмент-белковых комплексах. Однако использование стационарного освещения исключало возможность проведения кинетических измерений процессов переноса электрона в р.ц. В этой связи использование дифференциальной импульсной спектрофотометрии открывает большие возможности изучения этих процессов.

В настоящем сообщении приведены результаты спектрально-кинетического исследования кратковременных светиндуцированных изменений в хлорофилл-белковых комплексах 1-й фотосистемы.

Пигмент-белковые комплексы выделялись из хлоропластов гороха по методике, описанной в (⁹). Измерения дифференциальных спектров поглощения при импульсном фотовозбуждении проводили на спектрофотометрических установках (^{10, 11}).

При импульсном освещении растворов пигмент-белковых комплексов ($1 \cdot 10^{-5}$ мол/л по хлорофиллу а) наблюдаются обратимые изменения поглощения, характер которых зависит от интенсивности возбуждающего светового импульса (1 дж/см², длительность $2 \cdot 10^{-5}$ сек.); наблюдаемые изменения поглощения обусловлены фотоокислением хлорофилла р.ц. 1-й фотосистемы, т. е. образованием P700⁺. Исследования зависимости величины спектральных изменений, связанных с образованием P700⁺, от концентрации экзогенных акцепторов и доноров электрона, а также от концентраций додецилсульфата натрия (SDS) позволили выбрать оптимальные условия измерения. В качестве акцептора электрона использовали метилвиологен (10^{-3} мол/л), в качестве донора — дихлорфенолиндифенол (10^{-4} мол/л) в присутствии аскорбиновой кислоты (10^{-3} мол/л). Содержание SDS в растворе составляло 0,03—0,1 %.

Было обнаружено уменьшение концентрации P700⁺ на вспышку при высоких интенсивностях зондирующего луча в спектрофотометрической

установке в результате смещения равновесия $P700 \rightleftharpoons P700^+$ в сторону $P700^+$. Уменьшение стационарной концентрации $P700^+$ достигалось за счет снижения интенсивности и возможной монохроматизации ($730 > \lambda > 680$ нм) зондирующего света. С учетом изложенных условий был измерен дифференциальный спектр поглощения, обусловленный переходом

$P700 \xrightarrow{h\nu} P700^+$ (рис. 1). Построение дифференциального спектра поглощения (свет минус темнота) проводилось по данным осциллограмм, характеризующим изменения поглощения при импульсном освещении. На рис. 2 приведены осциллограммы, иллюстрирующие уменьшение поглощения $P700$ в результате фотоокисления р.д. при 435 и 700 нм.

Из рис. 1 следует, что дифференциальный спектр поглощения аналогичен дифференциальному спектру поглощения $P700$ в хлоропластах, частицах и хлорофилл-белковых комплексах, измеренному при непрерывном освещении (¹, ⁶, ⁷). Следует отметить, что измерения в области 660–720 нм были выполнены в условиях низкой дисперсии монохроматора и достаточно большом раскрытии щелей, что не позволило полностью разрешить полосу при 680 нм на фоне поглощения с $\lambda = 700$ нм.

Обнаруженные нами в хлорофилл-белковых комплексах р.д. 1-й фотосистемы обладают свойствами, характерными для $P700$ (⁵). Темновое окисление $P700$ при добавлении феррицианида в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ мол/л в раствор хлорофилл-белковых комплексов сопровождалось резким падением величины светоиндуцированного поглощения при 700 нм. Прогрев (65°C , 5 мин.) приводил к необратимому ослаблению изменения поглощения при 435 и 700 нм. Наконец, отмеченная выше зависимость величины светоиндуцированного поглощения от интенсивности зондирующего света также свойственна для $P700$.

В работе были выполнены измерения скорости восстановления $P700^+$ в отсутствие и в присутствии экзогенных доноров электрона. Результаты измерений, проведенных по скорости исчезновения индуцированного по-

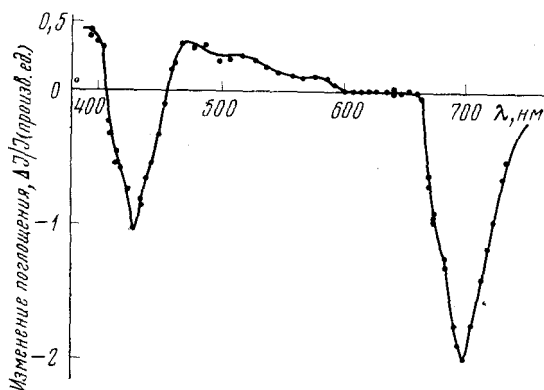


Рис. 1. Дифференциальный спектр поглощения (свет минус темнота) хлорофилл-белковых комплексов 1-й фотосистемы

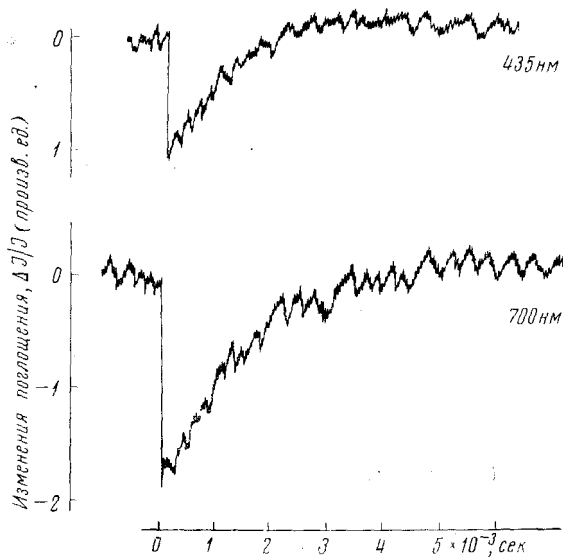


Рис. 2. Осциллограммы относительного изменения поглощения при импульсном освещении хлорофилл-белковых комплексов, содержащих феназинметасульфат ($1 \cdot 10^{-4}$ мол/л) и аскорбиновую кислоту (10^{-3} мол/л)

глощения при 435, 470 и 700 нм, показали следующее. В отсутствие экзогенных доноров электрона время ($\tau_{1/2}$) восстановления $P700^+$ составляет >10 сек. Величина $\tau_{1/2}$ сокращается до $6 \cdot 10^{-1}$ сек. в присутствии смеси метилвиологена (10^{-3} мол/л), дихлорфенолиндифенола (10^{-4} мол/л) и аскорбиновой кислоты ($3 \cdot 10^{-3}$ мол/л). Добавление феназинметасульфата в раствор пигмент-белкового комплекса, содержащего метилвиологен и аскорбиновую кислоту, приводит к дальнейшему ускорению реакции восстановления $P700^+$. Из зависимости скорости убыли относительной величины поглощения $P700$ от концентрации феназинметасульфата было найдено значение константы скорости реакции восстановления $P700^+$, составляющее $8 \cdot 10^6$ л·моль $^{-1}$ ·сек $^{-1}$.

Результаты спектральных измерений показали, что отношение концентрации $P700$ к содержанию хлорофилла а в препарате составляет $1/(40 \pm 10)$. Это указывает, что хлорофилл-белковый комплекс 1-й фотосистемы значительно обогащен р.ц.

Наряду с изменениями поглощения, обусловленными образованием $P700^+$ в хлорофилл-белковых комплексах, наблюдаются светоиндуцируемые изменения в поглощении, зависящие от энергии возбуждающего импульса. При энергиях вспышки 10 дж/см 2 наблюдаемые изменения во времени носят сложный характер. Наряду с образованием $P700^+$ (долгоживущий компонент осциллограммы) обнаружено появление триплетных молекул хлорофилла а, относящихся к мономерной форме пигмента. В пользу этого свидетельствует наблюдаемое характерное триплет-триплетное поглощение хлорофилла (короткоживущий компонент осциллограммы), $\tau_{1/2} = 10^{-4}$ сек. (12). Кроме триплет-триплетного поглощения, наблюдается при высоких интенсивностях возбуждающего света относительно долгоживущее поглощение, которое можно отнести к продуктам реакций возбужденных молекул хлорофилла.

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что хлорофилл-белковые комплексы 1-й фотосистемы обнаруживают кратковременные светоиндуцированные изменения поглощения, обусловленные переносом электрона в р.ц., а также фотореакциями других форм хлорофилла. Отсутствие эндогенных переносчиков электрона в хлорофилл-белковых комплексах создает определенные преимущества для изучения конверсии световой энергии в энергию разделенных зарядов в первичных процессах фотосинтеза

Институт геохимии и аналитической химии
им. В. И. Вернадского
Академии наук СССР
Москва

Поступило
11 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Clayton, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 44 (1972). ² W. Butler, Account. Chem. Res., v. 6, 177 (1973). ³ S. Malkin, In: Progr. in Photosyn. Res., v. 2, 845 (1969).
- ⁴ A. J. Bearden, R. Malkin, Biochem. et biophys. acta, v. 283, 456 (1972). ⁵ H. T. Witt, Quart. Rev. Biophys., v. 4, 365 (1971). ⁶ T. Miyama, B. Ke, Biochem. et biophys. acta, v. 267, 160 (1972).
- ⁷ W. E. Dietrich, J. P. Thornber, Biochem. et biophys. acta, v. 245, 482 (1971). ⁸ J. P. Thornber, J. M. Olson, Photochem. Photobiol., v. 14, 329 (1971).
- ⁹ Е. Ш. Луговая, Н. И. Захарова, В. М. Кутюрин, ДАН, т. 212, 1458 (1973). ¹⁰ А. К. Чубисов, Б. И. Барашков, А. В. Карякин, Журн. прикл. спектроскоп., т. 12, 243 (1970).
- ¹¹ А. К. Чубисов, В. А. Кузьмин, А. П. Виноградов, ДАН, т. 187, 142 (1969). ¹² А. К. Chibisov, Photochem. Photobiol., v. 10, 331 (1969).