

ELŻBIETA MICKIEWICZ

## WSPÓLCZESNE POGLĄDY NA PRZEMIANY ENERGII ŚWIETLNEJ W FOTOSYNTYZIE

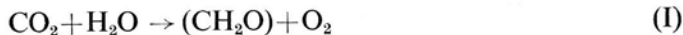
### I. ETAPY FOTOSYNTYZY

«Fotosynteza polega na syntezie związków organicznych (cukrów) z substancji mineralnych — kosztem energii światła widzialnego i w obecności barwników asymilacyjnych zamieniających energię świetlną na chemiczną; ubocznym produktem jest tlen» (Górski 1962).

Powyższa definicja oraz sama etymologia słowa «fotosynteza», gdzie «fos» znaczy światło a «syntesis» — składanie, podkreślają dwa zasadnicze aspekty tego procesu.

1) Proces fotosyntezy wymaga nieustannego dopływu energii spoza organizmu. Specyfika jego polega na tym, że źródłem energii jest promieniowanie słoneczne. W trakcie fotosyntezy energia w tej postaci zostaje zużyta nie tylko do jej przebiegu, ale i przekształcona w energię wiązań chemicznych pozostającą do dyspozycji organizmu. Zgodnie ze współczesnymi poglądami bioenergetyki wartość energetyczną materiału bądź procesu można ocenić ze względu na możliwą do uzyskania zeń ilość ATP (Baldwin 1959). Fotosynteza dostarcza ATP bezpośrednio w drodze fosforylacji cyklicznej i niecyklicznej (Arnon, 1958), podobnie, jak dzieje się to przy oddychaniu dzięki fosforylacji oksydatywnej.

2) Wystarczy jednak rzucić okiem na przyjęte od czasów Willstättera i Stolla równanie fotosyntezy:



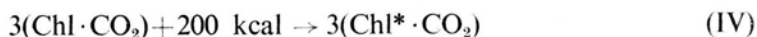
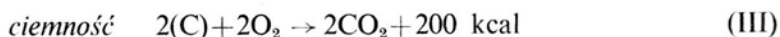
by ze względu na typ reakcji chemicznej uznać ją za odwrotność oddychania; chemicznym efektem fotosyntezy jest bowiem synteza związków organicznych z mineralnych substratów, a skutkiem oddychania — rozkład tych związków na dwutlenek węgla i wodę. Ale właśnie fotosynteza dostarcza substratów procesowi oddychania i innym reakcjom uwalniającym energię ze związków organicznych, przez co umożliwia pośrednio, w każdej chwili, syntezę ATP z ADP i fosforanów nieorganicznych w reakcjach ciemnych. Odtworzone przez fotosyntezę związki organiczne stanowią ponadto budulec organizmu, podłoże wszystkich przemian, składających się na całość metabolizmu.

Dzisiaj zdecydowanie przeważa pogląd, że najogólniej rzecz biorąc, fotosynteza odbudowuje związki organiczne na drodze redukcji  $\text{CO}_2$  za pomocą elektronów pochodzących z wody. Właśnie oderwanie elektronów od wodoru wody (u bakterii — innego donora wodoru) wymaga wielkiego wkładu energii. Jak powiedziano wyżej, roślina czerpie ją ze Słońca.

Zupełnie inny schemat procesu proponuje Warburg (1958) (i cyt. za Kaczowskiem 1958). Odrzuca on koncepcję fotolizy wody zakładając, że cząsteczka  $\text{CO}_2$  wiąże się z chlorofilem na tzw. «fotolit». Dzięki energii świetlnej w fotolizie następuje redukcja zaktywowanego  $\text{CO}_2$ , odłączenie zredukowanego produktu i przyłączenie nowej cząsteczki  $\text{CO}_2$  w uwolnione miejsce:



Odtworzenie fotolitu wymaga dodatkowej energii, pochodzącej z oddychania:



$(\text{Chl} \cdot \text{CO}_2)$  ... fotolit

$(\text{Chl} \cdot \text{CO}_2)$  ... związek chlorofilu z niezaktywowanym  $\text{CO}_2$ .

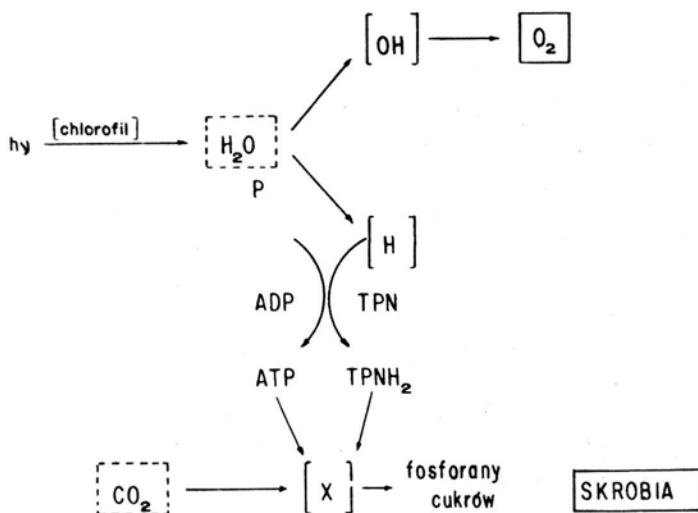
Zgodnie z powszechnie przyjętym poglądem na całość fotosyntezy, wyróżnienie dwóch podstawowych jej aspektów pokrywa się z podziałem całego procesu na dwa etapy, a całego aparatu fotosyntetycznego — na dwie zasadnicze struktury.

Poniższy schemat (wg Arnona 1958) ilustruje produkty obu etapów i zależności między nimi:

1) W ciągu etapu pierwszego, fotochemicznego, odpowiednia struktura przenosi elektrony z wody na jeden z kofaktorów — NADP, który je oddaje dwutlenkowi węgla. Transportowi elektronów towarzyszy synteza drugiego kofaktora — ATP niezbędnego do dalszych przekształceń produktów fotosyntezy. Według Basshama i Calvina (1962) przyswojenie jednej cząsteczki  $\text{CO}_2$  wymaga udziału dwóch cząsteczek  $\text{NADPH}_2$  i trzech cząstek ATP. Mówiąc językiem teleologicznym «zadaniem» etapu fotochemicznego jest «wytworzenie siły asymilacyjnej» (Arnon 1958), widoczny zaś skutek jego funkcjonowania stanowi wydzielanie się tlenu cząsteczkowego u roślin zielonych, a utlenienie zredukowanych związków podłoża u bakterii fotosyntetyzujących.

2) Etap drugi — cykl Calvina, według przeważającej dzisiaj opinii, polega na redukcji  $\text{CO}_2$  do poziomu cukrów oraz syntezie innych związków organicznych z metabolitów cyklu. Zużywa on kofaktory wytworzone podczas procesu fotochemicznego. Jest więc od światła tylko pośrednio zależny, kierowany enzymatycznie.

Oba etapy i struktury z nimi związane można oddzielić od siebie a) w czasie i b) przestrzeni.



a) W doświadczeniu Arnona (Trebst, Tsuimoto i Arnon 1958 oraz Arnon cyt. przez Wassinka 1963) w trakcie fotosyntezy przebiegającej w nieobecności  $CO_2$ , powstały obie komponenty siły asymilacyjnej tj.  $NADPH_2$  i ATP. Po wyłączeniu światła dodano  $C^{14}O_2$ . Gdy zbadano produkty końcowe, okazało się, że są one identyczne z tymi, które otrzymano przy ciągłym naświetlaniu chloroplastów w obecności znaczonego dwutlenku węgla.

b) Trebst i in. w r. 1958, a ostatnio Park i Pon (1961) rozbijając ultradźwiękami całe chloroplasty otrzymali frakcję barwnikową odpowiedzialną za reakcje fotochemiczne i frakcję niebarwnikową umożliwiającą reakcje cyklu Calvina. Każda frakcja oddzielnie nie jest w stanie wiązać  $CO_2$  na świetle. Dopiero ich połączenie daje pełny efekt.

Frakcja barwnikowa składa się głównie z lamelli chloroplastów. W lamellach, zawierających chlorofil i około 50% azotu białkowego chloroplastów, zachodzą reakcje świetlne i transport elektronów. Normalny przebieg tych reakcji umożliwiają już fragmenty lamelli pewnej minimalnej wielkości. Lamelle zatem składają się z podjednostek, które nazwano kwantasomami (Lichtenthaler i Park 1963). Przypuszczalnie są to najmniejsze jednostki fotosyntetyczne zdolne do przemiany kwantowej i transportu elektronów.

Frakcja niebarwnikowa natomiast — to stroma chloroplastów wraz z enzymami koniecznymi do wiązania i przemian  $CO_2$ .

Dziś nie poddaje się w wątpliwość istnienia i względnej niezależności obu opisanych wyżej etapów. W ciągu ostatnich pięciu lat znacznie zmodyfikowano teorie dotyczące mechanizmu pierwszej reakcji świetlnej i transportu elektronów, prowadzącego do syntezy kofaktorów. Droga redukcji  $CO_2$  pozostała w zasadzie bez zmian. Niemniej prace Kandlera, Gibbsa, Warburga i in. (cyt. za Basshamem 1963) postulują konieczność rewizji i uzupełnień cyklu Calvina.

Fizykalny mechanizm pierwszej reakcji etapu fotochemicznego jest wyznaczony przez strukturę chlorofilu. Cząsteczka chlorofilu składa się z czterech pierścieni pyrolowych zawierających serię wiązań sprzężonych. Zatem, po zaabsorbowaniu kwantu światła, cały pierścień, czyli zespół elektronów, osiąga wyższy poziom energetyczny. Przy dostatecznie dużym pobudzeniu elektron może zostać wybity z cząsteczki chlorofilu i wędrować w kierunku wzrastającego potencjału.

Ustalenie wymogu kwantowego, tj. najmniejszej liczby kwantów światła słonecznego koniecznej do redukcji jednej cząsteczki  $\text{CO}_2$  do poziomu cukrów, wskazuje na ilość reakcji elementarnych, dzięki którym cztery elektrony mogą być przeniesione z wody na jedną cząsteczkę  $\text{CO}_2$ .

Pomiary manometryczne Warburga (1958) wskazały na wartość wymogu kwantowego wynoszącą 3—4 kwanty/cz.  $\text{CO}_2$ . Wartość tę godzi autor z prawem Einsteina głoszącym, że jeden atom lub cząsteczka może jednorazowo pochłaniać energię w ilości jednego kwantu. W swojej koncepcji fotolitu Warburg zakłada jednorazowy wkład światła w redukcję jednej cząsteczki  $\text{CO}_2$  i w ten sposób formułuje «jednokwantową teorię fotosyntezy» (por. reakcje II, III, IV). Jednak liczne pomiary metodami: manometryczną, polarograficzną, kolorymetryczną, dokonane w latach 1941—1960, podały wartość wymogu kwantowego równą 7—12, a nawet wyższe (Kok 1959). (Teoretyczne uzasadnienie wymogu kwantowego, wynoszącego około 12 kwantów, podał w 1950 r. Strebeyko wychodząc z założenia, że rozkład wody jest reakcją wyłącznie fotochemiczną).

### III. EFEKT EMERSONA

Już w 1943 r. Emerson i Lewis zwrócili uwagę, że należy spodziewać się niskiej wydajności kwantowej dla dalekiej czerwieni, gdzie jedynym absorbującym barwnikiem jest chlorofil a. Doświadczenie przeprowadzone na komórkach *Chlorella* naświetlanych światłem o długości fali  $> 695 \text{ m}\mu$  potwierdziło to przypuszczenie. Rys. 1 przedstawia spadek wydajności kwantowej dla komórek *Chlorella*. Ten tzw. «czerwony spadek» (red drop) zaczyna się przy krótszej fali dla niższych temperatur w porównaniu z wyższymi (Emerson i in. 1956).

Jeżeli promień dalekiego czerwonego światła zostanie uzupełniony promieniem o krótszej długości fali, wydajność fotosyntezy wzrasta. Najbardziej efektywny okazał się dodatek światła żółtego ( $578 \text{ m}\mu$ ), następnie czerwonego ( $644 \text{ m}\mu$ ), zielonego ( $546 \text{ m}\mu$ ), a najmniej — niebieskiego ( $430 \text{ m}\mu$ ) (Emerson 1957). Bliższej analizy wpływu długości fali światła uzupełniającego o intensywności dającej takie samo natężenie fotosyntezy, jak daleka czerwień, dostarczył Emerson w r. 1958. Wyniki przedstawia tabela 1 podając procentowy wzrost wydajności fotosyntezy przy świetle o długości fali  $> 690 \text{ m}\mu$  dla różnych długości fal światła uzupeł-

Tabela 1

Wzrost wydajności fotosyntezy w dalekiej czerwieni pod wpływem światła uzupełniającego (Emerson 1958)

długość fali św. uzupełn. m $\mu$ .	wzrost wydajności w %	
	<i>Chlorella</i>	<i>Porphyridium</i>
644	28	0
578	19	15
546	12	100
508	5	85
480	60	0
468	40	0
436	10	0
405	55	0
365	7	0

niającego. Porównując dane w tabeli ze spektrum absorpcji fikoerytryny i chlorofilu b (patrz rys. 5 i 7) widać, że największy wzrost wydajności fotosyntezy odpowiada maksimum absorpcji fikoerytryny w przypadku *Porphyridium* i chlorofilu b w przypadku *Chlorelli*. Stąd wniosek, że wpływ światła uzupełniającego na wydajność fotosyntezy polega na silniejszym pobudzeniu chlorofilu b (u *Chlorelli*) i fikoerytryny (u *Porphyridium*) w porównaniu z daleką czerwienią. Wskazuje to na udział barwników różnych od chlorofilu a w fotosyntezie i stąd pobudzenie wyłącznie chlorofilu a nie wystarcza do osiągnięcia maksymalnej wydajności kwantowej.

Zjawisko wzrostu wydajności fotosyntezy przy dalekiej czerwieni pod wpływem dodatkowego światła o fali krótszej otrzymało nazwę efektu Emersona lub «efektu wzmożenia» (enhancement effect).

#### IV. KRYTYKA INTERPRETACJI EFEKTU EMERSONA

Czy jednak interpretacja «czerwonego spadku» zasugerowana przez Emersona jest poprawna?

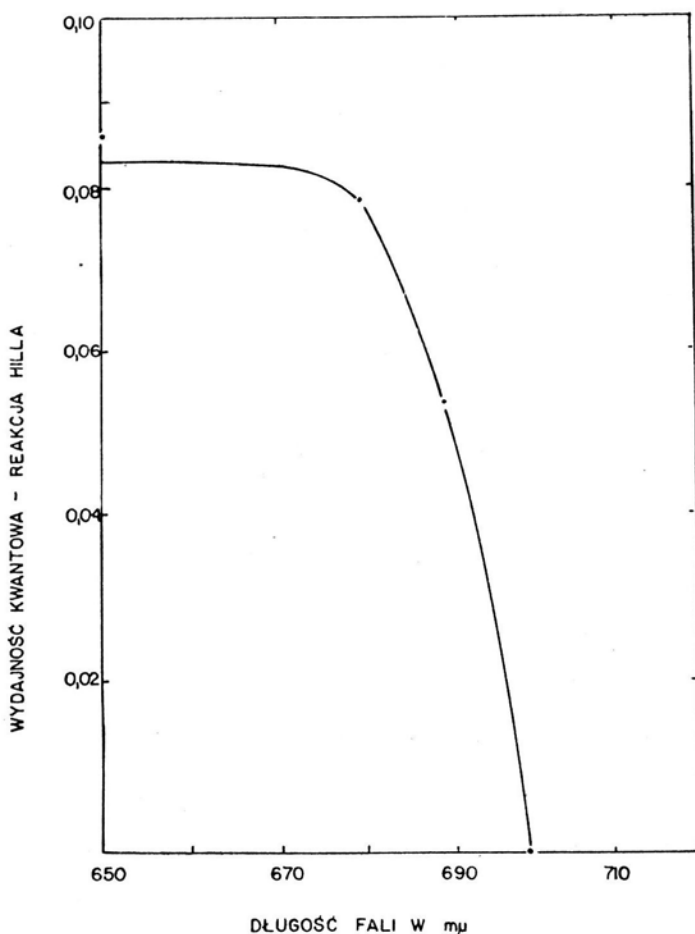
Poniżej podane zostaną inne możliwości wyjaśnienia tego zjawiska oraz ich krytyka w świetle odpowiednich eksperymentów.

1) W związku z tym, że wydajność fotosyntezy określono na podstawie ilości wydzielonego tlenu w jednostce czasu, powstaje pytanie, czy «czerwony spadek» nie jest spowodowany, przynajmniej częściowo, przez świetlne zahamowanie oddychania, ponieważ zastosowana metoda (manometryczna) nie pozwala na odróżnienie pozytywnych zmian w natężeniu fotosyntezy od negatywnych zmian w natężeniu oddychania.

Odpowiedzią były wyniki doświadczenia Govindjee i in. (1960), którzy badali



2) A może po prostu energia, której dostarcza daleka czerwień, jest zbyt mała, by utrzymać wysoką wydajność fotosyntezy i to stanowi przyczynę «czerwonego spadku»?



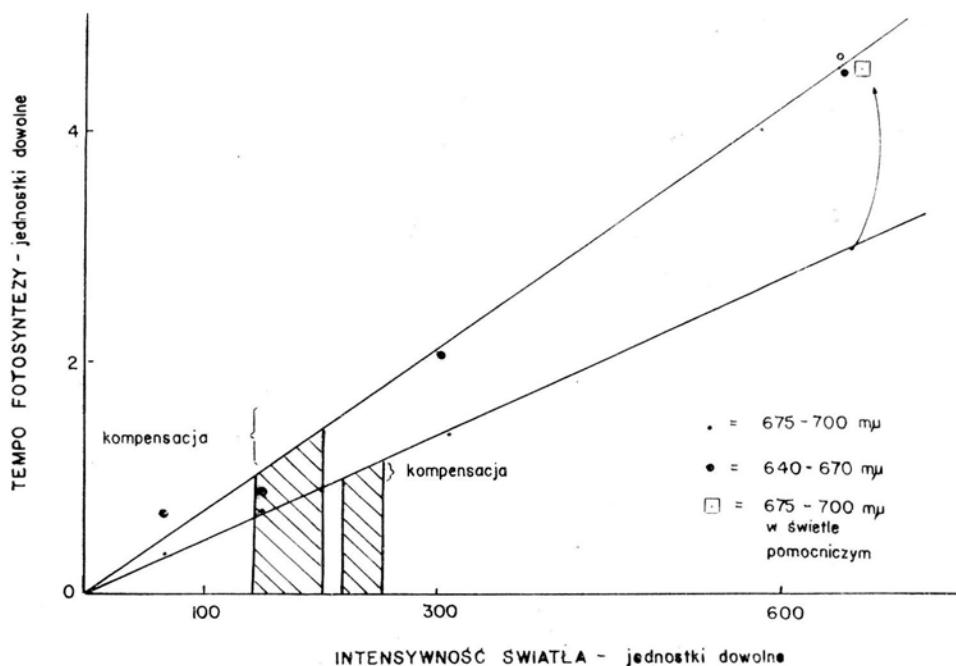
Rys. 2. «Czerwony spadek» w spektrum czynnościowym reakcji Hilla (fotoredukcji chinonu) w komórkach *Chlorella*. Wydajność kwantowa przedstawiona w zależności od długości fali światła monochromatycznego (Govindjee i in. 1960b)

Jednak według teorii spektroskopowej, cząsteczki o pobudzonych elektronach, po termicznym zrównoważeniu z ośrodkiem, posiadają identyczną reaktywność niezależnie od wielkości zaabsorbowanego kwantu.

3) Może więc wpływ światła uzupełniającego jest katalityczny?

Przemawia przeciw temu fakt, że stymulujący wpływ światła uzupełniającego rośnie proporcjonalnie do jego intensywności aż do nasycenia (rys. 3).

Dowodem udziału barwników pomocniczych<sup>1</sup> w fotosyntezie jest jej spektrum czynnościowe w świetle uzupełniającym. Krzywą, ilustrującą wydajność fotosyntezy w świetle złożonym z dalekiej czerwieni oraz ze światła uzupełniającego (tj. światła o fali krótszej) minus wydajność uzyskana dzięki barwnikowi po-

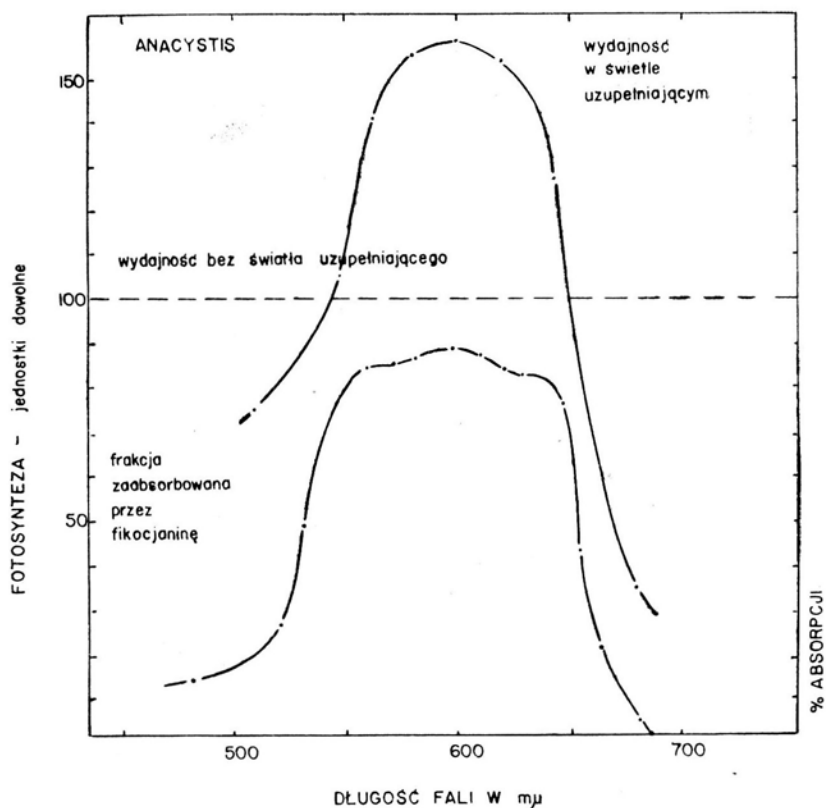


Rys. 3. Proporcjonalność natężenia fotosyntezy w dalekiej czerwieni i w świetle uzupełniającym (o krótszej fali) do intensywności padającego światła (Emerson i in. 1960)

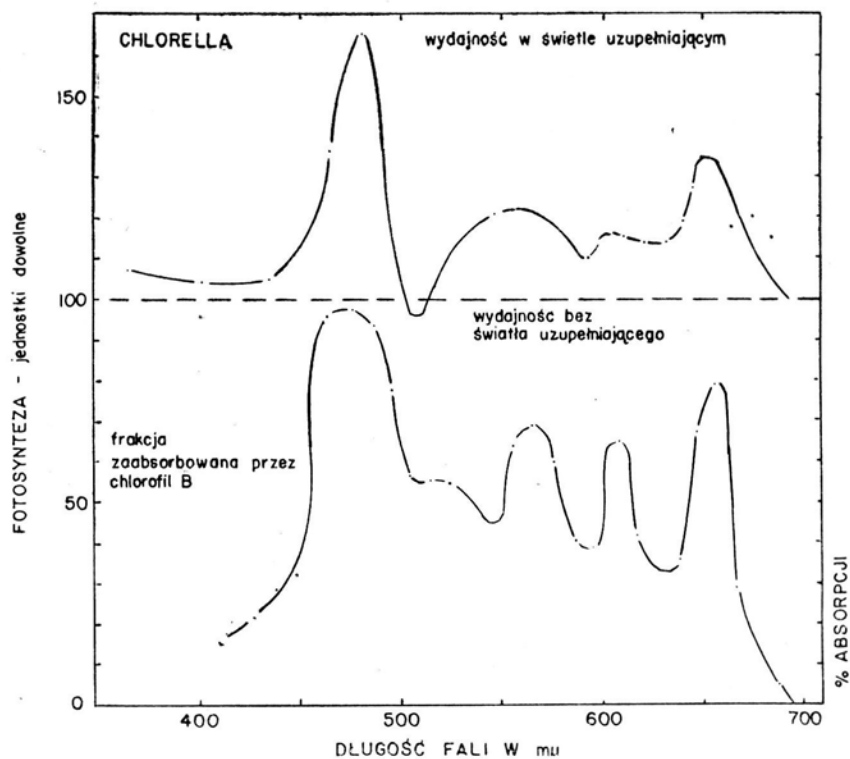
mocniczemu, nakreślono jako funkcję długości fali pochłanianej przez barwnik pomocniczy. Poniższe wykresy (rys. 4, 5, 6 i 7) ujawniają uderzające podobieństwo spektrum czynnościowego fotosyntezy w świetle uzupełniającym do (względego lub absolutnego) spektrum absorpcji odpowiedniego barwnika pomocniczego.

<sup>1</sup> Historycznie termin «barwniki pomocnicze» stosowano do fikoerytryny, fikocjaniny i karotenoidów tj. wszystkich barwników aparatu fotosyntetycznego różnych od chlorofilu. Obecnie to określenie stosuje się również do chlorofilu b i chlorofilu a<sub>670</sub>. Nazwa «barwniki główne» przysługuje tylko formom chlorofilu a: Chla<sub>695</sub>, Chla<sub>683</sub> i P700 (Smith, French 1963).

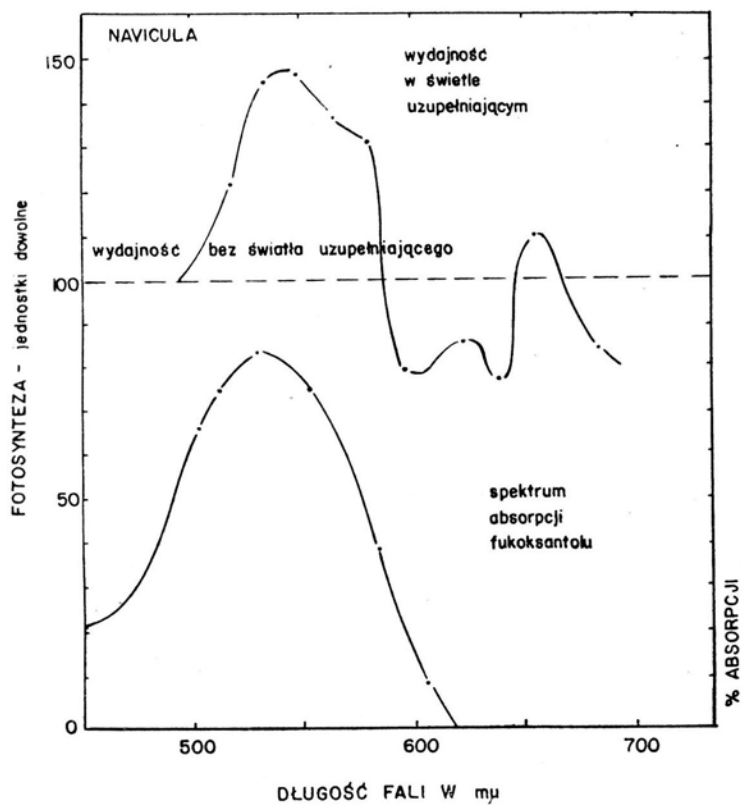




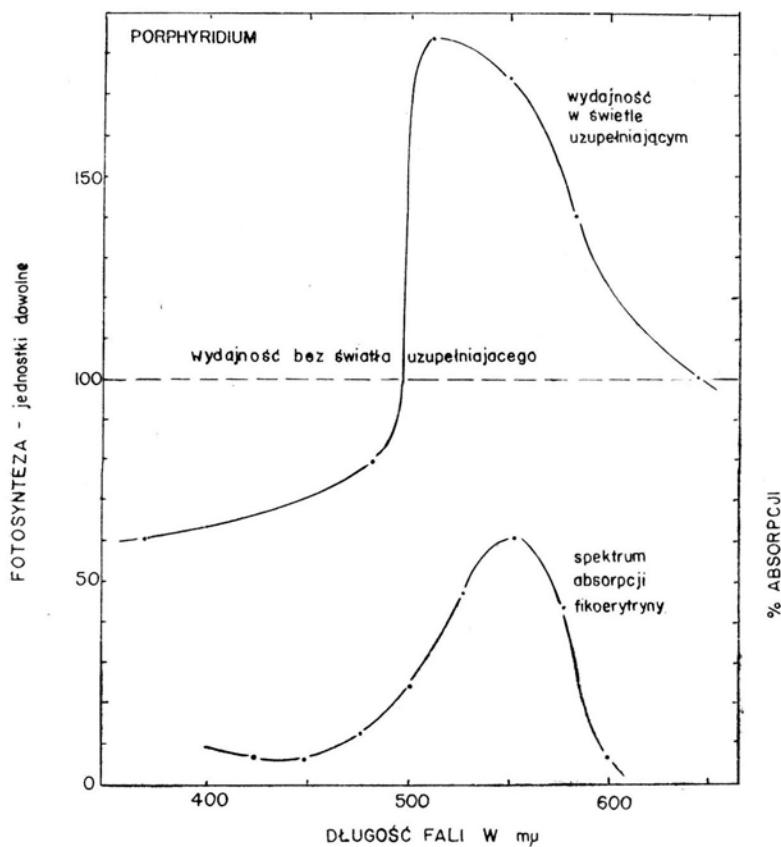
Rys. 4. Wpływ światła uzupełniającego na wydajność fotosyntezy w dalekiej czerwieni dla *Anacystis* w porównaniu z frakcją światła zaabsorbowanego przez fikocjaninę. (Wg Emerson a i in., niepublikowane, cyt. przez Rabinowitcha 1960)



Rys. 5. Wpływ światła uzupełniającego na wydajność fotosyntezy w dalekiej czerwieni dla *Chlorella* w porównaniu z frakcją światła zaabsorbowanego przez chlorofil b



Rys. 6. Wpływ światła uzupełniającego na wydajność fotosyntezy w dalekiej czerwieni dla *Navicula* w porównaniu ze spektrum absorpcji fukoksantolu



Rys. 7. Wpływ światła uzupełniającego na wydajność fotosyntezy w dalekiej czerwieni dla *Porphyridium* w porównaniu ze spektrum absorpcji fikoerytryny

Analiza spektrum czynnościowego fotosyntezy w dalekiej czerwieni wskazuje, że i w obrębie samego chlorofilu a istnieje kilka form kierujących na różne tory zaabsorbowaną przezeń energię świetlną.

Brown i French (1959) zbadali takie spektrum dla *Chlorelli*. Krzywa absorpcji chlorofilu okazała się złożoną z trzech komponent o maksimach absorpcji: 672, 683 i 693 m $\mu$ . Każda komponenta należy do odrębnej formy chlorofilu a (por. rys. 9).

Podobna sytuacja istnieje w przypadku bakteriochlorofilu, gdzie maksimum absorpcji w pobliżu 770 m $\mu$  można rozłożyć na trzy składniki: 800, 850 i 890 m $\mu$  (Wassink 1963). Obecnie nie wiadomo, czy te różne formy chlorofilu i bakteriochlorofilu są definitywnie różnymi związkami chemicznymi, czy też są przedstawicielami tej samej klasy, które odróżnić można jedynie na podstawie położenia maksimów pasm absorpcji.

W jaki sposób współdziałają ze sobą te różne typy barwników i ich form oraz jaką funkcję pełni każda z nich?

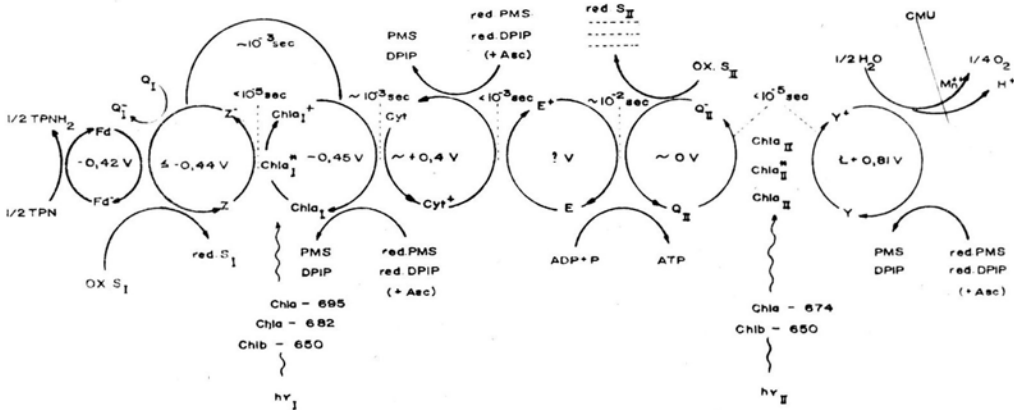
Informacji na ten temat dostarczają badania spektrów fluorescencji pobudzonych barwników, wskazujące na stan ekscytacji i typy reakcji drobin fluoryzujących. Wyższe natężenie fluorescencji świadczy o silniejszym pobudzeniu barwnika, a wygaszanie fluorescencji — o skierowaniu energii na inne tory, tj. jej przekazaniu innemu barwnikowi, bądź włączeniu w łańcuch przemian chemicznych. Przenoszenie energii między różnymi barwnikami zachodzi zawsze z cząstek, których prążki absorpcyjne zbliżone są do fioletowej części widma na cząsteczki, których absorpcja przesunięta jest w kierunku czerwieni. Zatem możliwości przekazywania energii między znanymi barwnikami przedstawiają się następująco:

karotenoidy  $\rightarrow$  fikocjanina  $\rightarrow$  chlorofil c  $\rightarrow$  chlorofil b  $\rightarrow$  chlorofil a lub bakteriochlorofil (Kasprzyk 1962).

W roku 1951 Duysens wykazał, że fluorescencja chlorofilu a u *Porphyra lacinata* jest silniejsza dla światła zaabsorbowanego przez wszystkie barwniki (546 m $\mu$ ) niż dla światła zaabsorbowanego przez sam chlorofil a (420 m $\mu$ ). Światło o długości fali 546 m $\mu$  absorbują głównie fikobiliny i one przekazują energię chlorofilowi a. Oprócz chlorofilu a i fikobilin *Porphyra* zawiera jeszcze inny barwnik — chlorofil d, którego silna fluorescencja może być spowodowana tylko przez przeniesienie nań energii z innych barwników (Duysens 1951). W podobny sposób Duysens stwierdził przekazywanie energii świetlnej z karotenoidów na bakteriochlorofil absorbujący światło o długości fali 890 m $\mu$  (B890), który jest jedyną fluoryzującą formą bakteriochlorofilu. Także B800 i B850 przekazują energię do B890. Nasuwa się zatem myśl, że i pomiędzy formami chlorofilu a może zachodzić przekazywanie energii. Kierunek zdeterminowany jest położeniem maksimów pasm absorpcji tych form, a więc wiedzie do Chla<sub>695</sub>.

Badania chloroplastów rozbitych ultradźwiękami i umieszczonych w świetle spolaryzowanym, przeprowadzone przez Sauera i Calvina (1962), wskazują na

wielkie prawdopodobieństwo tej możliwości. Wynika z nich również, że 5% chlorofilu a, mianowicie Chla<sub>695</sub>, posiada cząsteczki zorientowane w stosunku do sąsiednich i do osi współrzędnych w kwantasomie. Cząsteczki innych form chlorofilu a są ułożone chaotycznie lub zorientowane bardzo słabo. Uporządkowany chlorofil przedstawia najniższy poziom pobudzenia. Energia może tu zewsząd migrować, ale z tej formy nie może wędrować na inne, lecz przechodzi we fluorescencję bądź inny rodzaj energii.



Rys. 8. Schemat reakcji systemu transportującego elektrony w fotosyntezie podany na podstawie krótkotrwałych zmian absorpcji mierzonych za pomocą czulej fotometrii błyskowej (Witt i inni, 1963)

Zgodnie z teorią Förstera warunkiem przenoszenia energii między różnymi barwnikami jest pokrywanie się pasma absorpcji barwnika, na który energia jest przenoszona z pasmem fluorescencji barwnika, z którego energia jest przenoszona.

Fikobiliny spełniają ten warunek i sprawność transportu energii z nich na chlorofil a wynosi 80—95%. Jednak sprawność ta jest niska dla kierunku: karotenoidy → chlorofil a w przypadku roślin zielonych (20—25%) (Emerson, Rabinowitch (1960).

#### VI. SCHEMAT TRANSPORTU ELEKTRONÓW W REAKCJACH ETAPU FOTOCHEMICZNEGO

Na podstawie wyżej omówionych doświadczeń i hipotez wyłania się obraz grupy barwników absorbujących światło o odpowiedniej dla każdego długości fali i przenoszących energię pobudzenia do centrum, gdzie zostaje ona przekształcona w energię wiązań chemicznych. Grupa taka stanowi jednostkę fotosyntetyczną. I ta struktura doczekała się wielu hipotez dotyczących jej wielkości, funkcjonowania i składu. Nie one jednakże są tematem niniejszej pracy.

W którym więc miejscu następuje przemiana energii pobudzenia w energię chemiczną, którą substancję należy uznać za pierwszy produkt reakcji fotochemicznej?

Eksperymenty Koka (1959, 1961) wskazują, że pierwszy produkt fotosyntezy u roślin zielonych, substancja, na którą przenoszona jest energia pobudzenia — to P700, prawdopodobnie forma chlorofilu a. Absorbuje ona światło o długości fali od 700 do 705 m $\mu$ . Daleka czerwień powoduje utlenienie P700 do P700<sup>+</sup>, a redukcję P700<sup>+</sup> do P700 przyspiesza światło o fali krótszej. W fotosyntezie bakteryjnej analogami P700 są — prawdopodobnie formy bakteriochlorofilu — P890, P879, P770 występujące odpowiednio w różnych typach mikroorganizmów (Clayton 1963). Obserwacje Koka nasuwają także inny ważny wniosek natury ogólnej: światło o różnych długościach fal zmienia stan redoks przenośników elektronów w łańcuchu łączącym wodę i NADP, jednym z członów którego jest P700.

Jakie są pozostałe człony tego łańcucha i jak reagują na światło o dłuższej i krótszej fali?

Duysens (1961) badał reakcje cytochromów u glonów naświetlanych światłem o różnej długości fali. Daleka czerwień utlenia cytochrom: Cyt  $\rightarrow$  Cyt<sup>+</sup>, a nałożone na światło podstawowe (680 m $\mu$ ) światło o fali krótszej (560 m $\mu$ ) powoduje redukcję utlenionego cytochromu: Cyt<sup>+</sup>  $\rightarrow$  Cyt.

Jednocześnie Rumberg, Schmidt-Mende i Witt (1964) wykazali, że u roślin zielonych daleka czerwień (> 700 m $\mu$ ) prowadzi do utlenienia cytochromu, a światło o fali < 700 m $\mu$  umożliwia redukcję substancji X: X  $\rightarrow$  X<sup>-</sup>, czyli plastochinonu. Zredukowany plastochinon redukuje utleniony cytochrom.

Wyniki te autorzy uzyskali badając zmiany absorpcji spowodowane przez reakcje redoksove wyżej wymienionych substancji.

Ujawniły one istotny fakt, że w przenoszeniu elektronów w trakcie fotosyntezy biorą udział dwie reakcje świetlne:

I. redukcja plastochinonu uczulana przez światło o fali krótszej.

II. utlenienie P700 uczulane przez daleką czerwień.

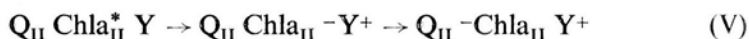
Zredukowany plastochinon i utleniony P700 wstępują w ciemne reakcje enzymatyczne odzyskując stan pierwotny. O tym, z jakimi substancjami reagują, wnioskujemy z ich potencjałów redoks, z zachowania się względem różnych odczynników chemicznych oraz z kinetyk zmian absorpcji.

Pełny schemat reakcji parcjalnych w fotosyntezie, uwzględniający ich sekwencję, czas trwania i potencjały redoks podał Witt (dla roślin zielonych), rys. 8.

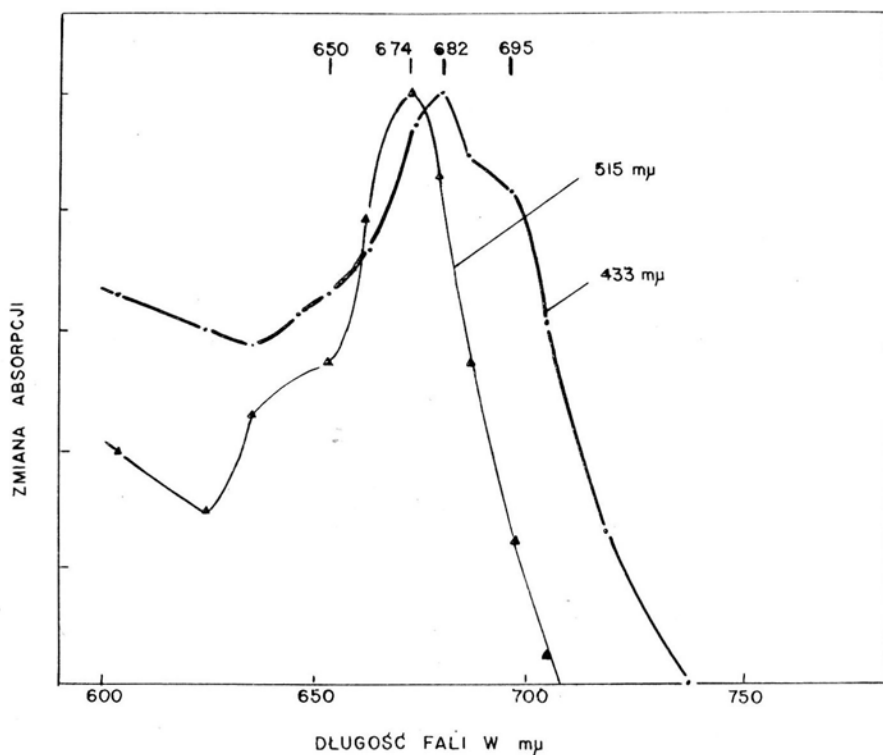
Pobudzony światłem P700 (Chl<sub>a1</sub>) oddaje elektrony nieznanemu akceptorowi Z. W razie braku akceptora elektronów z Z<sup>-</sup> następuje ich przepływ na utleniony chlorofil a<sub>1</sub> (P700<sup>+</sup>). Naturalnym akceptorem elektronów z Z<sup>-</sup> jest reduktaza NADP, czyli ferredoksyna, która redukuje NADP. Zredukowany koenzym wraz z ATP wchodzi w cykl Calvina.

Utleniony P700 natychmiast utlenia cytochrom. Utleniony cytochrom jest redukowany przez Q<sub>11</sub> (plastochinon) poprzez E. Jak widać na rys. 8, Chl<sub>a11</sub> uczula

reakcję redukcji  $Q_{II}$ . Prawdopodobnie przebiega ona następująco:  $Chl_{a_{II}}$  tworzy z Y kompleks przenoszący w elektron stanie pobudzonym z Y na  $Q_{II}$ :



Związek pośredni:  $Q_{II} Chl_{a_{II}} - Y^+$ , jeżeli nawet istnieje, posiada bardzo krótki czas trwania, ponieważ redukcja  $Q_{II}$  zachodzi w czasie  $< 10^{-5}$  sek. Utleniony Y pośrednio



Rys. 9. Spektrum czynnościowe dla zmian absorpcji przy 515 mμ ( $Q_{II}$ ) i 433 mμ ( $Chl_{a_I}$ ). Chloroplasty szpinaku (Witt i in. 1963)

lub bezpośrednio utlenia wodę, przy czym wobec jonów Mn wydziela się tlen cząsteczkowy. Loach i Yamamoto (cyt. za Basshamem 1963) wysuwają hipotezę, że  $Mn^{+4}$  w postaci chelatowego analogu cytochromu utlenia wodę i przenosi fotochemicznie dwa elektrony na jakiś akceptor (być może Y).

#### VII. CHARAKTERYSTYKA SYSTEMÓW I i II DUYSENSA

Pamiętając o tym, że światło o różnych długościach fal aktywuje różne barwniki, dochodzimy do wniosku, że dwie podstawowe reakcje w transporcie elektronów z ostatecznego donora do ostatecznego akceptora są zależne od dwóch zespołów barwników.



Etap fotochemiczny fotosyntezy składa się zatem z fotoutlenienia wody i foto-redukcji NADP. Oznacza to, że każdy atom wodoru (lub elektron) musi być aktywowany dwukrotnie na drodze: woda  $\rightarrow$  NADP i że każdy z tych dwóch stopni pobudzany jest przez swoisty zespół barwników.

Za jakie reakcje odpowiedzialny jest chlorofil, a za jakie pozostałe barwniki?

Według Duysensa (1960, 1961) oba zespoły barwników są wyposażone zarówno w chlorofil a jak i w barwniki pomocnicze. Jeden zespół, nazwany przez autora systemem II, czuły na światło o fali krótszej, zawiera fluoryzujący chlorofil a i dużo barwników pomocniczych; drugi zespół, system I, czuły na daleką czerwień, zawiera głównie chlorofil a i mało barwników pomocniczych.

O udziale poszczególnych barwników i ich form świadczy spektrum czynnościowe fotosyntezy.

Witt (1963) podaje spektra czynnościowe odpowiadające funkcjonowaniu systemu I (zmiana absorpcji przy  $433 \text{ m}\mu$ ) i systemu II (zmiana absorpcji przy  $515 \text{ m}\mu$ ) dla chloroplastów szpinaku (rys. 9). Zgodnie z tym (patrz także rys. 8), formy:  $\text{Chla}_{682}$ ,  $\text{Chla}_{695}$ ,  $\text{Chlb}_{650}$  pobudzają  $\text{Chla}_{\text{II}}$  (P700), a więc system I, natomiast  $\text{Chlb}_{650}$  i  $\text{Chla}_{674}$  pobudzają  $\text{Chla}_{\text{I}}$  czyli system II.

Ze względu na to, że system II dostarcza elektronów systemowi I, który je przekazuje na NADP, wydajna fotosynteza zachodzi tylko wówczas, gdy oba systemy funkcjonują. Jeżeli dla jakiejś długości fali jeden system działa sprawniej niż drugi, tempo fotosyntezy jest równe tempu systemu ograniczającego.

Obniżenie wydajności fotosyntezy przez wyłączenie jednego z systemów było dobrze znane od 1943 r. jako «czerwony spadek» (red drop). Emerson stwierdził najwyższą wydajność kwantową fotosyntezy dla światła najsilniej absorbowanego przez barwniki pomocnicze i za przyczynę «czerwonego spadku» uznał brak udziału tych barwników w fotosyntezie. Jednak fakt występowania barwników pomocniczych w obu systemach nasuwa nieco inną interpretację, której słuszność potwierdzają pomiary (Duysens, Ames 1960): w istocie przyczyną «czerwonego spadku» jest wyłączenie systemu II, który skupia barwniki absorbujące światło o fali krótszej. System I nie otrzymuje wówczas dostatecznej ilości zredukowanego plastochinonu i ogólna wydajność fotosyntezy maleje. Uzupełnienie dalekiej czerwieni światłem o fali krótszej włącza także system II znacznie podnosząc wydajność fotosyntezy. Zjawisko to znamy jako efekt Emersona lub «efekt wzmożenia» (enhancement).

#### VIII. BARWNE PRZEJŚCIE (CHROMATIC TRANSIENT)

Charakter współdziałania obu systemów nie jest prosty. Świadczą o tym zjawiska w fotosyntezie, które towarzyszą zmianom naświetlania chloroplastów światłem o jednej długości fali na światło o jakiejś innej długości fali. Zespół tych zjawisk nazwano «barwnym przejściem» (chromatic transient).

Myers i French (1960) badali przebieg «przejścia barwnego» dla światła o długości fali  $700 \text{ m}\mu$  absorbowanego głównie przez chlorofil a i  $650 \text{ m}\mu$  absorbo-

wanego głównie przez chlorofil b. Rozważane zjawisko starali się wyjaśnić w terminach reakcji właściwych tym barwnikom. Interpretacja ich wymaga szeregu upraszczających założeń:

- przy 700 m $\mu$ , całe światło absorbowane jest przez chlorofil a
- przy 650 m $\mu$ , frakcja R jest zaabsorbowana przez chlorofil b, zaś frakcję 1 — R pochłania chlorofil b
- charakter reakcji chlorofilu a nie zależy od tego, czy absorbuje on światło o długości fali 700, czy 650 m $\mu$ .

Przejściu 700  $\rightarrow$  650 m $\mu$  towarzyszy gwałtowny wzrost udziału kwantów frakcji 1 —R, absorbowanych przez chlorofil b i spadek udziału kwantów frakcji 1 —R absorbowanych przez chlorofil a; frakcja R pozostaje bez zmiany.

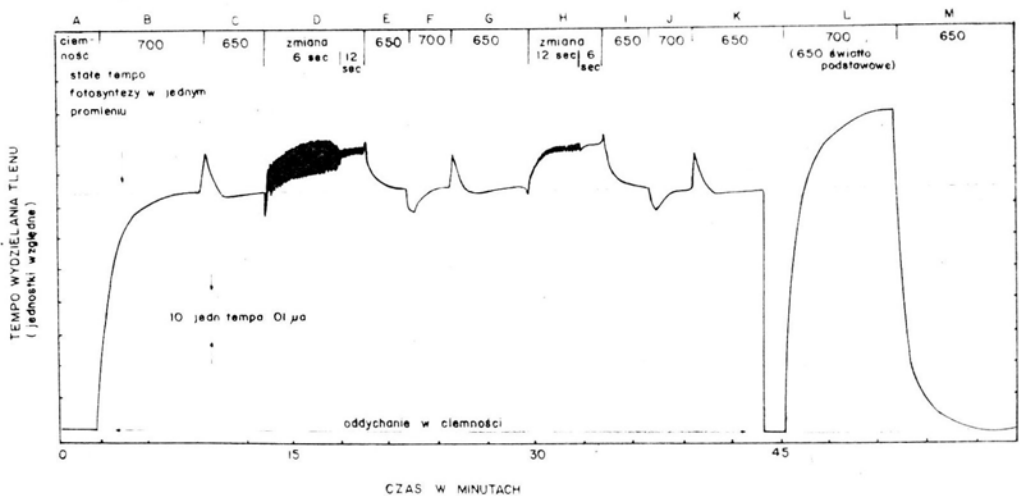
Przy przejściu 650  $\rightarrow$  700 m $\mu$  można zaobserwować zmiany odwrotne.

Frakcję R ustalono doświadczalnie i zmieniano dowolnie od 0,48 do 0,74.

Zjawiska zatem towarzyszące przejściu 700  $\rightarrow$  650 m $\mu$  mogą być rezultatem wzrostu prędkości reakcji związanej ze światłem o fali krótszej (systemem II) i obniżenia prędkości reakcji związanej ze światłem o fali dłuższej (systemem I), ponieważ wydzielanie tlenu wymaga udziału systemu II. Stąd zrozumiałe jest obniżenie tempa wydzielania tlenu przy przejściu 650  $\rightarrow$  700 m $\mu$ .

Rys. 10 przedstawia rekonstrukcję śladów oryginalnego zapisu eksperymentu dla światła o długościach fal 700 i 650 m $\mu$  o intensywności dającej w obu wypadkach natężenie fotosyntezy na poziomie 74 jednostek.

Kolejne następstwo dwóch promieni o wyżej wymienionych długościach fal, z których każdy naświetla chloroplasty przez 3—6 min., wywołuje typowe chromatyczne transjenty.



Rys. 10. Efekt Emersona dla światła o długości fali 700 i 650 m $\mu$ ; zrekonstruowano ślady z jednego eksperymentu (Myers i French 1960)

W sekcji D promieni 650 i 700 m $\mu$  następują po sobie co 6 sek. Zachodzi wtedy efekt Emersona prawie nie różniący się co do wielkości od enhancement w przypadku jednoczesnego naświetlania światłem o krótszej i dłuższej fali (patrz sekcja L). Wysokość zapisu powyżej poziomu normalnego tempa fotosyntezy właściwego jednemu promieniowi jest miarą stopnia enhancement. W sekcji L wielkość enhancement jest dwukrotnie wyższa w porównaniu z sekcjami D i H, mimo iż współczynnik enhancement w obu wypadkach jest jednakowy, ponieważ w H i D jest połowa tej ilości światła co w L.

Wynika stąd ważny wniosek: współdziałanie między systemem II i I jest takie samo dla promieni 650 i 700 m $\mu$  obecnych ciągle oraz następujących kolejno po sobie co 0,6 sek.

Wobec tego związku pośrednie powstające po świetlnym pobudzeniu każdego systemu posiadają długi czas trwania mierzony w sekundach. Reakcje między pierwszymi produktami obu reakcji świetlnych muszą mieć charakter enzymatyczny.

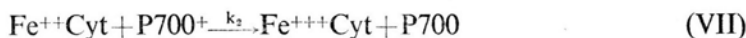
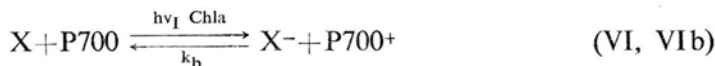
#### IX. UDZIAŁ PLASTOCJANINY W TRANSPORCIE ELEKTRONÓW

Zaproponowany przez Witta obraz transportu elektronów podczas fotosyntezy tylko najogólniej wskazuje na charakter reakcji między głównymi członami łańcucha. Ustalenie mechanizmu tych reakcji, związków pośrednich i zależności od wewnętrznych warunków fotosyntezy wymaga dalszych żmudnych badań. Obecnie badacze poświęcają wiele uwagi roli reakcji cytochromowych w fotosyntezie w związku z odkryciem w r. 1959 nowego enzymu związanego z cytochromem — plastocjaniny (Kato 1960). Jest to związek miedzioproteinowy, zdolny do odwracalnych reakcji redoksowych. Potencjał redoks plastocjaniny równa się 390 voltów w 20°C i przy pH 7,0. Maksimum absorpcji dla formy utlenionej wynosi 597 m $\mu$ . Forma zredukowana absorbuje światło o długości fali ponad 500 m $\mu$ .

Jakie jest miejsce plastocjaniny w łańcuchu reakcji redoksowych fotosyntezy?

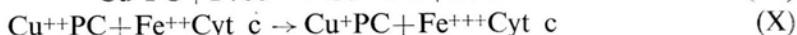
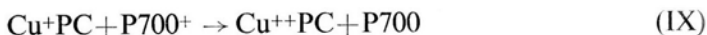
Ze schematu Witta (rys. 8) widać ścisłą zależność między P700<sup>+</sup> a cytochromem, który pod wpływem P700<sup>+</sup> ulega utlenieniu.

Bishop i Nakamura (1959) stwierdzili, iż utlenianie cytochromu w naświetlanych chloroplastach przebiega przy udziale enzymu fotooksydazy. W przeciwieństwie do utleniania cytochromu w trakcie zwykłej ciemnej reakcji przy udziale oksydazy cytochromowej reakcja ta jest niewrażliwa na cjanek. Wydajność jej wzrasta ze wzrostem długości fali padającego światła (> 690 m $\mu$ ), a przebieg jest następujący:



Kwant światła zaabsorbowany przez barwniki systemu I wytwarza utleniacz P700<sup>+</sup> i silny reduktor X<sup>-</sup>. W chloroplastach traktowanych detergentami, P700<sup>+</sup> utlenia cytochrom c (ferrocytochrom Fe<sup>++</sup>Cyt), natomiast X<sup>-</sup> (na rys. 8: Z<sup>-</sup>) utlenia się tlenem z powietrza.

Opisana przez Bishopa fotooksydaza cytochromu c odpowiada plastocjaninie Katoha. Plastocjanina stymuluje endogenną szybkość utleniania cytochromu 10-krotnie. Dzięki temu przy bardzo słabym świetle podnosi wydajność kwantową systemu: Prawdopodobnie plastocjanina (PC) katalizuje reakcję VII:



Ferrocytochrom c momentalnie redukuje utlenioną plastocjaninę.

Według opinii Koka i in. (1964) podobną rolę jak plastocjanina spełnia cytochrom f o potencjale normalnym 0,37 voltów. Ponieważ plastocjanina nie redukuje cytochromu f, oba te związki są specyficznymi donorami elektronów dla pierwszego fotoutleniacza (P700<sup>+</sup>), są z nim ściśle związane i zajmują specjalne miejsca w kwantasomie (Sauer, Calvin 1962). W kompletnym procesie, zredukowany ferrocytochrom f lub zredukowana miedzioplastocjanina powstają dzięki systemowi II. Jeżeli redukcja tych związków jest wolniejsza od fotoutlenienia P700, cały proces zachodzi z niską wydajnością kwantową. Dzieje się tak na przykład przy naświetlaniu chloroplastów światłem o długiej fali.

Udział plastocjaniny i cytochromu f w normalnej fotosyntezie może być równoczesny bądź alternatywny. Tę pierwszą hipotezę nasuwa analogia z systemem oddechowym oksydazy cytochromu c, w którym również atomy miedzi i żelaza działają w ścisłym związku.

#### X. UWAGI KOŃCOWE

Badania optycznych i chemicznych efektów świetlnego pobudzenia aparatu fotosyntetyzującego, w ciągu ostatnich dwudziestu lat, pozwoliły nakreślić obraz przemian energetycznych w fotosyntezie, zachodzących w normalnym przebiegu tego procesu. Aktualne hipotezy dotyczące przekazywania energii między różnymi barwnikami i formami chlorofilu a oraz udziału dwóch kwantów światła w transporcie elektronów z wody do NADP poprzez łańcuch reakcji redoksowych, pozwalają już na całościowy opis zagadnienia będącego tytułem niniejszej pracy. Toteż rozpoczęto ją definicją fotosyntezy i omówiono cały proces pod kątem widzenia przemian energetycznych stopniowo zwężających zakres rozważań. A więc najpierw zaznaczono, że jedynie w drodze fotosyntezy organizm żywy przekształca energię świetlną w energię chemiczną, a następnie przy jej udziale syntetyzuje związki organiczne z mineralnych substratów. Można w fotosyntezie wyróżnić dwa względnie niezależne etapy: fotochemiczny i cykl Calvina. Ponieważ tylko etap fotochemiczny jest od światła zależny, opis ograniczono do niego.

Istnieją dwa kontrowersyjne poglądy co do zasady funkcjonowania etapu fotochemicznego: koncepcja fotolitu Warburga z jednokwantowym ujęciem procesu oraz hipoteza procesu dwukwantowego popierana przez wszystkich pozostałych cytowanych tu autorów. Dowodem jej adekwatności są, eksperymentalnie dowiedzione, liczne zależności i prawidłowości reakcji fotochemicznych, które łączy ona we wspólną całość.

Przedstawiono je tak, by wykazać, że badacze wymogu kwantowego, efektu Emersona, fluorescencji różnych barwników aparatu fotosyntetyzującego, spektrów absorpcji układów redoksowych, «przejścia barwnego» (chromatic transient), zaatakowali to samo zagadnienie z różnych stron — zagadnienie zróżnicowanych funkcji i składu systemów I i II Duysensa. Szczególnie uderza to w rozdziale VII tej pracy, gdzie efekt Emersona, którego odkrycie i poprawna w gruncie rzeczy interpretacja, stanowiąca przesłankę dla hipotezy o dwukwantowości procesu, doczekał się nowego bardziej zgodnego z wynikami doświadczeń ujęcia w terminach tejże hipotezy.

Można zauważyć pewną dychotomię w procesie fotosyntezy — podział jej na etap fotochemiczny i cykl Calvina i następnie analogiczny podział etapu fotochemicznego na system I Duysensa uruchamiany przez reakcję świetlną  $hv_I$  i system II, który może funkcjonować tylko dzięki reakcji  $hv_{II}$ . Korzystając z odrębnych własności można rozdzielić oba systemy i otrzymać w ten sposób produkty reakcji właściwe dla każdego z nich, zupełnie jak w przypadku prostego oddzielenia etapu fotochemicznego od cyklu Calvina.

Zgodnie z wynikami badań szczegółowo w pracy zrelacjonowanymi, energia promienista zaabsorbowana przez różne barwniki przenoszona jest drogą rezonansu do dwóch centrów:  $Chl_a$  i  $Chl_{II}$  (patrz rys. 8). Każde centrum korzysta ze światła o właściwym sobie zakresie długości fal, zależnym od barwników składowych. Energia pobudzenia ulega przemianie na energię chemiczną w momencie wybicia elektronu z P700 skutkiem reakcji  $hv_I$ . Wybitny elektron wędruje poprzez szereg przenośników do NADP. Warunkiem ponownej takiej reakcji jest odzyskanie elektronu przez P700<sup>+</sup> (a ściślej przez cytochrom, z którego elektron na P700<sup>+</sup> momentalnie przechodzi). Następuje to tylko dzięki reakcji  $hv_{II}$ , która umożliwia wybicie elektronu z cząsteczki wody i następnie przeniesienie go — poprzez szereg przeważnie niezidentyfikowanych jeszcze przenośników — na cytochrom. Transportowi elektronów towarzyszy synteza ATP z ADP i fosforanów nieorganicznych.

Dziś niewiele jeszcze wiadomo o dokładnym przebiegu poszczególnych reakcji łańcucha przenoszącego elektrony. Dość dokładnego opracowania doczekała się reakcja cytochromu z P700 przy udziale plastocjaniny, zidentyfikowanej tak niedawno. Zachowanie się jej wobec światła o różnej długości fali i wobec różnych inhibitorów chemicznych potwierdza słuszność hipotezy o podwójnym pobudzeniu elektronów w drodze od H<sub>2</sub>O do NADP.

## ALFABETYCZNY SPIS UŻYWANYCH SKRÓTÓW

ADP .....	adenozyno-5-dwufosforan
Asc .....	kwas askorbinowy
ATP .....	adenozyno-5-trójfosforan
B .....	bakteriochlorofil
Chl .....	chlorofil
Chl. * .....	chlorofil w stanie pobudzenia
(CH <sub>2</sub> O) .....	związek na poziomie redukcji cukrów
CMU .....	3-(p-chlorofenylo)-1,1-dwumetylomocznik
Cyt .....	cytochrom
DPIP .....	2,6-dwuchlorofenol-indofenol
Fd .....	ferrodoksyna
In .....	indofenol
P .....	fosforan (nieorganiczny)
PC .....	plastocjanina
PMS .....	metasiarczan fenazyiny
Q <sub>II</sub> (= X u Witta) .....	plastochinon
ox S <sub>I</sub> .....	grupa utleniaczy reagujących specyficznie z Z <sup>-</sup> (rys. 8)
ox S <sub>II</sub> .....	grupa utleniaczy reagujących specyficznie z Q <sub>II</sub> (rys. 8)
TPN = NADP ...	fosforan dwunukleotydu nikotynoamido-adeninowego <sup>1</sup>

<sup>1</sup> W schematach i na rysunkach zamieszczonych w tej pracy figuruje jeszcze symbol «TPN» (a nie ostatnio przyjęty «NADP»), ponieważ stanowią one reprodukcje z prac oryginalnych.

## LITERATURA

- Arnon D. I., Whatley F. R., Allen M. B., 1958: *Science* **127**, 1026.  
 Baldwin E., 1959: *Biochemia dynamiczna*, Warszawa str. 74.  
 Bassham I. A., Calvin M., 1962: *Udział węgla w fotosyntezie*, Warszawa  
 Bishop N. J., Nakamura H., Blatt J., Vennesland B., 1959: *Plant Physiol.* **34**, 551.  
 Bassham I. A., 1963: *Adv. Enzymol.* **25**, 39.  
 Brown J. S., French S. 1959: *Plant Physiol.*, **34**, 305.  
 Clayton R. K., 1963: *Ann. Rev. of Plant Physiol.*, **14**, 159.  
 Duysens L. M. N., 1951: *Nature*, **190**, 548.  
 Duysens L. M. N., Amesz J., 1960: *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 243.  
 Duysens L. M. N., Amesz J., Kamp B. M., 1961: *Nature*, **190**, 510.  
 Emerson R., Lewis Ch. M., 1943: *Americ. J. of Botany*. **30**, 165.  
 Emerson R., Chalmers R., Cedestrand C., Brody M., 1959: *Science*, **123**, 673.  
 Emerson R., 1957: *Science*, **125**, 746.  
 Emerson R., 1958: *Science*, **127**, 1059.  
 Emerson R., Rabinowitch E., 1960: *Plant Physiol.* **35**, 477.  
 Govindjee R., Thomas J. B., Rabinowitch E., 1960: *Science*, **132**, 421.  
 Górski F., 1962: *Fizjologia roślin*, t. I, Warszawa, str. 362.  
 Katoh S., 1960: *Nature*, **186**, 533.  
 Kaczkowski J., 1958: *Postępy Biochemii*, IV, 321.  
 Kasprzyk Z., 1962: *Postępy Biochemii*, VIII, 53.  
 Kok B., 1959: *Plant Physiol.*, **34**, 527.

- Kok B., 1961: *Biochim. Biophys. Acta*, **48**, 527.
- Kok B., Rurainsky H. T., 1964: *Plant Physiol.*, **39**, 513.
- Lichtenthaler H. T., Park B., 1963: *Nature*, **198**, 1070.
- Myers J., French C. S., 1960: *Plant Physiol.*, **35**, 963.
- Park R. B., Pon N. G., 1961: *J. Mol. Biol.*, **3**, 1.
- Rumberg B., Schmidt-Mende P., Witt H. T., 1964: *Nature*, **201**, 466.
- Sauer K., Calvin M., 1962: *J. Mol. Biol.*, **4**, 451.
- Smith J. H. C., French C. S., 1963: *Ann. Rev. of Plant Physiol.* **14**, 181.
- Strebeyko P., 1950/51: Towarzystwo Naukowe Warszawskie, Sprawozdania z posiedzeń Wyd. Nauk Biol., Rok XLIII.
- Trebst A., Tsuimoto H. Y., Arnon D. I., 1958: *Nature*, **182**, 351.
- Warburg O., 1958: *Science*, **128**, 68.
- Wassink E. C., 1963: *Comparative Biochemistry*, vol. V, part C, 352.
- Witt H. T., Muller A., Rumberg B., 1963: *La Photosynthèse*, No 119, Gif-sur-Ivette et Saclay, 23—27 VII 1962, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique.