

Proceedings of the
FIFTH INTERNATIONAL CONGRESS
OF
BIOCHEMISTRY

Moscow, 1961

Proceedings of the
FIFTH INTERNATIONAL CONGRESS
OF
BIOCHEMISTRY

Moscow, 10-16 August 1961

GENERAL EDITOR

N. M. SISSAKIAN, Moscow, U.S.S.R.

Secretary-General of the Congress

VOLUME VI
MECHANISM
OF
PHOTOSYNTHESIS

Edited by

H. TAMIYA, ~~Japan~~

SYMPOSIUM PUBLICATIONS ~~DIVISION~~

PERGAMON ~~PRESS~~

OXFORD · LONDON · NEW YORK · PARIS

PWN—POLISH SCIENTIFIC PUBLISHERS

WARSAW

1963

PERGAMON PRESS LTD.
Headington Hill Hall, Oxford
4 and 5 Fitzroy Square, London W.1

PERGAMON PRESS INC.
122 East 55th Street, New York 22, N.Y.

GAUTHIER-VILLARS ED.
55, Quai des Grands-Augustins, Paris 6

PERGAMON PRESS G.m.b.H.
Kaiserstrasse 75, Frankfurt am Main

Distributed in the Western Hemisphere by
MACMILLAN COMPANY · NEW YORK
pursuant to a special arrangement with
PERGAMON PRESS LTD.
Oxford, England

Copyright © 1963
Pergamon Press Ltd.

Library of Congress Card Number 59-8791

Printed in Poland by the Scientific-Technical Printing House (DRP), Warsaw

LIST OF AUTHORS

- ALLEN, M. B.² Laboratory of Comparative Biology, Kaiser Foundation Research Institute, Richmond, California, U.S.A.
- ARNON, D. I. Laboratory of Cell Physiology, University of California, Berkeley, California, U.S.A.
- BASSHAM, J. A. Lawrence Radiation Laboratory and Department of Chemistry, University of California, Berkeley, 4. California, U.S.A.
- BENSON, A. A. Department of Agricultural and Biological Chemistry, The Pennsylvania State University University Park, Pennsylvania, U.S.A.
- BLACK, C. C. Department of Biochemistry, Cornell University, Ithaca, New York, U.S.A.
- CALVIN, M. Lawrence Radiation Laboratory and Department of Chemistry, University of California, Berkeley, 4. California U.S.A.
- CHANCE, B. Johnson Research Foundation, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa., U.S.A.
- FORK, D. C. Department of Plant Biology, Carnegie Institution of Washington, Stanford, California, U.S.A.
- FRENCH, C. S. Department of Plant Biology, Carnegie Institution of Washington, Stanford, California, U.S.A.
- GAFFRON, H. Department of Biological Science (Fels Fund) Florida State University, Tallahassee, Florida, U.S.A.
- GIBBS, M. Department of Biochemistry, Cornell University, Ithaca, New York, U.S.A.

- GODNEV, T. N.** Institute of Biology, U.S.S.R. Academy of Sciences, and the Laboratory of Biophysics and Isotopes, U.S.S.R. Academy of Sciences,
- GRANICK, S.** The Rockefeller Institute, New York City, New York, U.S.A.
- HOLT, A. S.** Division of Applied Biology, National Research Council, Ottawa, Canada
- KAMEN, M. D.** Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
- KANDLER, O.** Institute of Applied Botany of the Technische Hochschule, München
- KOK, B.** Photosynthesis Group of the Research Institute for Advanced Studies, Baltimore, 12, Md., U.S.A.
- KRASNOVSKII, A. A.** A. N. Baĭk Institute of Biochemistry, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow
- KUTYURIN, V. M.** V. I. Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Academy of Sciences, U.S.S.R. Moscow
- LIESENKÖTTER, I.** Institute of Applied Botany of the Technische Hochschule, München
- MOYSE, A.** Laboratoire de Photosynthèse du C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (S-O), France
- MÜLLER, A.** University of Marburg, Germany
- NICHIPOROVICH, A. A.** Institute of Plant Physiology, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow
- NISHIMURA, M.** Johnson Research Foundation, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa., U.S.A.
- PUTSEIKO, E. K.** Optical Institute, Leningrad, U.S.S.R.
- RABINOWITCH, E.** University of Illinois, Urbana, Illinois

- RUMBERG, B. University of Marburg, Germany
- SHLYK, A. A. Institute of Biology, U.S.S.R. Academy of Sciences, and the Laboratory of Biophysics and Isotopes, U.S.S.R. Academy of Sciences
- SMITH, J. H. C. Department of Plant Biology, Carnegie Institution of Washington, Stanford, California, U.S.A.
- STREHLER, B. L. Gerontology Branch, National Heart Institute, National Institutes of Health, Baltimore, Md., U.S.A.
- TAMIYA, H. University of Tokyo, and the Tokugawa Institute for Biological Research, Tokyo, Japan
- TERENIN, A. N. Optical Institute, Leningrad, U.S.S.R.
- VINOGRADOV, A. P. V. I. Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Academy of Sciences, U.S.S.R. Moscow
- VISHNIAC, W. Yale University, New Haven, Connecticut, U.S.A.
- WASSINK, E. C. Laboratory of Plant Physiological Research, Agricultural University, Wageningen, Netherlands
- WESSELS, J. S. C. Philips Research Laboratories, N. V. Philips' Gloeilampenfabrieken, Eindhoven, Netherlands
- WITT, H. T. Institute for Physical Chemistry, University of Marburg/Lahn, Germany
- WURMSER, R. Université de Paris, Faculté des Sciences, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, France

CONTENTS

	<i>Page</i>
List of Authors	ix
SESSION 1	
H. TAMIYA Opening Address	1
R. WURMSER Photochimie de la chlorophylle et mécanisme de la photo- synthèse	3
E. RABINOWITCH Transfer and Storage of Light Energy in Photosynthesis . .	15
A. N. TEREININ and E. K. PUTSEIKO The Inner Photo-Electric Effect in Aggregated Chlorophyll, Methylchlorophyllide and Chloroplast Pigments	47
A. S. HOLT Infra-Red Spectroscopy of Chlorophylls	59
H. T. WITT, A. MÜLLER and B. RUMBERG Investigations of the Mechanism of Photosynthesis	64
B. KOK Significance of P ₇₀₀ as an Intermediate in Photosynthesis . .	73
B. L. STREHLER The Significance of Photosynthetic Luminescence	82
<i>GENERAL DISCUSSION TO SESSION 1</i>	
	96
SESSION 2	
E. C. WASSINK The Nature of the Primary Act in Photosynthesis	100

C. S. FRENCH and D. C. FORK	
Two Primary Photochemical Reactions in Photosynthesis Driven by Different Pigments	122
<i>DISCUSSION</i>	137
Mary B. ALLEN	
Comparative Biochemistry of Photosynthetic Reactions . . .	138
<i>DISCUSSION</i>	149
J. H. C. SMITH	
Chlorophyll Formation and Photosynthesis	151
<i>DISCUSSION</i>	162
T. N. GODNEV and A. A. SHLYK	
Biosynthesis and Renewal of Chlorophyll in Connexion with Photosynthesis	163
S. GRANICK	
The Pigments of the Biosynthetic Chain of Chlorophyll and their Interactions with Light	176
<i>DISCUSSION</i>	186
A. A. KRASNOVSKII	
Photochemistry of Chlorophyll, the State and Transformations of Pigments in Photosynthetic Organisms	187
<i>DISCUSSION</i>	196
<i>GENERAL DISCUSSION TO SESSION 2</i>	198
SESSION 3	
D. I. ARNON	
Photosynthetic Phosphorylation and a Unified Concept of Photosynthesis	201
<i>DISCUSSION</i>	231
H. GAFFRON	
Conjunction of Photochemical and Enzymatic Stages in Plant and Bacterial Photosynthesis	233
<i>DISCUSSION</i>	240

CONTENTS

vii

M. D. KAMEN	
The Haem Proteins of Photosynthetic Tissues	242
W. VISHNIAC	
Path of Hydrogen in Photosynthesis	251
A. P. VINOGRADOV and V. M. KUTYURIN	
The Mechanism of Water Decomposition in Photosynthesis	253
<i>DISCUSSION</i>	262
J. S. C. WESSELS	
Nitroso Compounds as Electron Carriers in Photosynthetic Phosphorylation	263
B. CHANCE and M. NISHIMURA	
Light- and Oxygen-Activated Electron Transfer Systems of Photosynthetic Bacteria	267
<i>DISCUSSION</i>	284
J. A. BASSHAM and M. CALVIN	
The Way of CO ₂ in Plant Photosynthesis	285
<i>GENERAL DISCUSSION TO SESSION 3</i>	305

SESSION 4

A. MOYSE	
Les produits de la fixation de CO ₂ par les végétaux. Relations entre la photosynthèse et la respiration	310
O. KANDLER and I. LIESENKÖTTER	
The Effect of Monoiodo Acetic Acid, Arsenate and Dinitrophenol on the Path of Carbon in Photosynthesis	326
A. A. BENSON	
Chloroplast Lipid Metabolism	340
<i>DISCUSSION</i>	351

A. A. NICHIPOROVICH	
Non-Carbohydrate Products of Photosynthesis	352
<i>DISCUSSION</i>	363
M. GIBBS and C. C. BLACK	
Factors Affecting Photochemical CO ₂ Fixation by Chloroplasts	364
<i>GENERAL DISCUSSION TO SESSION 4</i>	371
<i>GENERAL DISCUSSION TO THIS VOLUME</i>	373
Index	379

OPENING ADDRESS

by HIROSHI TAMIYA

University of Tokyo, and the Tokugawa Institute for Biological Research

LADIES AND GENTLEMEN:

As organizer and general director of the Symposium on the Mechanism of Photosynthesis, I have the privilege to welcome you all to this meeting. At the same time, and especially as a participant from the Far East, I am extremely happy to see our colleagues from all over the world gathering in this country which is renowned since the end of last century for its great contributions to the science of photosynthesis. Such names as Timiri-azev, Krasheninnikov, Lubimenko and many others are familiar to us as pioneers in our common field, whose tradition of originality, I think, is still actively alive in recent works of Soviet scientists.

As a man who in his youth studied a number of papers published by those Russian scientists, I wonder what they would have thought, had they been able to attend such an international symposium and to hear the talks on multifarious aspects of modern knowledge about the mechanism of photosynthesis. At the time of Timiri-azev, the process of photosynthesis no doubt looked far simpler than it appears today, and the investigators seemed capable of commanding a broad knowledge of its diverse facets. Somewhat different is the situation nowadays, although the process of photosynthesis itself has remained the same. With the progress of our studies, a mechanism of enormous complexity is now unrolled before us, and many of us are, indeed have to be, specialists in particular aspects of photosynthesis; yet, by virtue of such specialization, we are liable to lose sight of the total process. Moreover, even for one and the same problem, we often encounter conflicting reports, controversies arising from differences either in methods of approach or in postulations set forth. I sincerely hope that this gathering will offer us a chance of reaching sound solutions of these controversies and of arriving at more general and comprehensive views concerning our common problems. In this way, we may come one step nearer to our ultimate aim of unraveling the whole mechanism of photosynthesis.

OPENING ADDRESS

Once again, I bid you all welcome to this Symposium. I express to you all my best wishes, with the belief that our Symposium will be a successful one. I now have the pleasure, ladies and gentlemen, to declare open the Symposium on the Mechanism of Photosynthesis.

PHOTOCHEMIE DE LA CHLOROPHYLLE ET MECANISME DE LA PHOTOSYNTHESE

by RENÉ WURMSER

*Université de Paris, Faculté des Sciences, Institut de Biologie
Physico-Chimique, Paris, France*

PUISQUE ce qui me vaut de prendre la parole au début de ce colloque est d'avoir été le témoin d'une longue suite de recherches sur la photosynthèse, je crois pouvoir commencer en rappelant quelques étapes.

On pense à peu près généralement que la réduction du gaz carbonique est localisée dans le stroma incolore des chloroplastes et qu'un système oxydo-réducteur sert d'intermédiaire entre les processus photochimiques et ceux où n'intervient plus la lumière. L'idée est ancienne. Je l'avais formulée moi-même il y a quarante ans,⁽¹⁾ l'opposant à celle de Willstätter,⁽²⁾ pour qui la lumière agissait sur un complexe carbonique de la chlorophylle. Une autre notion encore plus ancienne puisqu'elle remonte à Berthelot⁽³⁾ est qu'un effet primaire du rayonnement consiste à décomposer l'eau. Mais ces conceptions reposent aujourd'hui sur des découvertes et des arguments entièrement nouveaux dont je ne citerai que les plus convaincants.

En premier lieu, il y a la réaction de Hill,⁽⁴⁾ malgré l'interprétation différente qu'en a donné Warburg⁽⁵⁾ et malgré les différences que l'on observe selon que l'accepteur d'hydrogène est le gaz carbonique ou la quinone. En effet quelque soit l'accepteur, le dégagement d'oxygène implique l'intervention de molécules d'eau, ce qui laisse peu de doute sur l'origine hydrique de l'oxygène.

Mais surtout, et principalement grâce au groupe de Calvin et Benson,⁽⁶⁾ il y a la mise en évidence, au moyen de ^{14}C , des étapes du carbone entre le gaz carbonique et les hexoses. Ces travaux ont conduit à la séparation expérimentale des deux phases de la photosynthèse, finalement réalisée par Trebst, Tsujimoto et Arnon.⁽⁷⁾ L'éclaircissement des chloroplastes en absence de gaz carbonique produit le dégagement d'oxygène ainsi que l'accumulation de triphosphopyridine nucléotide et d'adénosine triphos-

phate. Après avoir écarté les grana et fourni du gaz carbonique on obtient une formation d'hexose phosphate.

Ces acquisitions si importantes laissent toutefois entier le problème proprement photochimique de la photosynthèse, celui du mécanisme par lequel l'énergie lumineuse permet la libération de l'oxygène de l'eau. Un autre mécanisme est à étudier depuis la découverte de la photophosphorylation par le groupe de Arnon:⁽⁸⁾ la formation photochimique de la liaison pyrophosphate de l'ATP.

INFORMATIONS TIRÉES DE LA CINÉTIQUE

Si l'on considère les exigences énergétiques de la décomposition de l'eau il faut que au moins 2 einstein de lumière rouge soient absorbés par demi-molécule d'oxygène dégagé. Dans ces conditions la conversion d'énergie lumineuse en énergie chimique proprement dite, c'est-à-dire en énergie correspondant à une rupture de liaison atomique, ne peut se faire en une seule fois que s'il existe à un moment donné une molécule doublement excitée.

C'est sur cette hypothèse qu'est fondée la théorie de Franck:⁽⁹⁾ une molécule de chlorophylle déjà à l'état triplet fondamental reçoit d'une molécule voisine se trouvant dans un premier état singlet excité, l'énergie supplémentaire pour passer à un état triplet plus élevé. On connaît l'objection soulevée par la brièveté de vie probable de cet état. En outre sa mise en évidence expérimentale n'a pu être obtenue jusqu'ici. Nous allons voir que l'étude cinétique de la photosynthèse favorise plutôt l'idée que l'énergie de chaque quantum est transformée en énergie chimique dans un acte élémentaire indépendant.

Les expériences classiques de Emerson et Arnold⁽¹⁰⁾ mettant en jeu des éclairs très courts de plus en plus puissants et suffisamment espacés ont établi qu'il existe un rapport entre le nombre de molécules de chlorophylle présentes et la quantité maxima d'oxygène qui peut être produite. L'explication admise est qu'un centre catalytique E se trouve saturé quand l'éclairement atteint une certaine valeur. Si le centre ne peut fonctionner qu'une fois pendant la durée d'un éclat, et si à la saturation une molécule d'oxygène est produite par 2000 molécules de chlorophylle, c'est que la concentration du catalyseur est $n/2000$ fois la concentration de la chlorophylle, n étant le nombre des réactions catalysées nécessaires pour dégager une molécule d'oxygène. L'intérêt de cette donnée est grandement accru par l'observation de Rabinowitch et Ehrmantraut⁽¹¹⁾ que la production maximum d'oxygène par éclair est sensiblement la même dans la réaction de Hill et dans la photosynthèse.

Il résulte des expériences de Tamiya⁽¹²⁾ et de Kok⁽¹³⁾ que lorsque l'on opère avec des éclairs de plus longue durée les choses se compliquent parce que le centre catalyseur a le temps de fonctionner plusieurs fois pendant l'éclairement. L'effet sur la cinétique est alors comparable à celui d'un réservoir qui assurerait la recharge du centre catalytique E.

Un travail effectué récemment dans mon laboratoire apporte à ce sujet des précisions intéressantes pour discuter si le processus photochimique primaire de la photosynthèse est un processus à 1 quantum ou à 2 quanta.

Pierre Joliot⁽¹⁴⁾ a mis au point une technique ampèrométrique qui permet de mesurer le dégagement de très petites quantités d'oxygène, de l'ordre de 10^{-11} moles dans 1 cm^3 d'une suspension d'algues. L'inertie de l'appareil est très faible et se prête bien à l'étude des phénomènes transitoires et aux mesures de rendement dans des temps très courts.

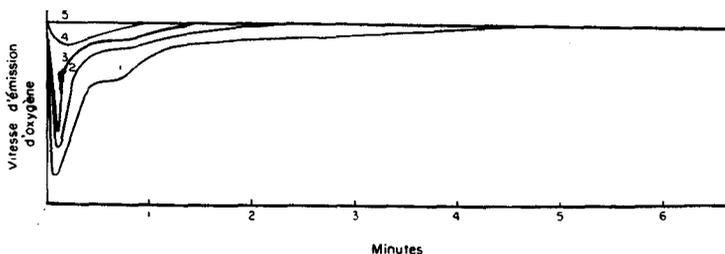


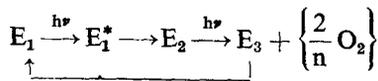
FIG. 1. Vitesse d'émission d'oxygène après une période d'obscurité décroissant de 1 heure (courbe 1) à 5 secondes (courbe 5) d'après Joliot (16).

Tout d'abord Pierre Joliot^(15, 16) s'est intéressé à la brusque émission d'oxygène observée par Blinks et Skow⁽¹⁷⁾ au début de la période d'illumination et qui a été jusqu'ici traitée plutôt comme un phénomène secondaire. Il a constaté (Fig. 1) que, en faible lumière, la vitesse d'émission au début du jet est égale à la vitesse stationnaire qu'atteindra la photosynthèse après la période d'induction. Cette égalité se comprend bien si l'on admet qu'une substance A responsable du jet d'oxygène est détruite à la lumière au début de l'illumination et se reforme pendant la période d'induction. A la fin de cette période la vitesse de destruction photochimique du complexe sera égale à sa vitesse de formation.

La concentration maximum de la substance A, ou, si l'on veut, la capacité du réservoir qui alimente le centre catalytique, est mesurée par le nombre de molécules d'oxygène dégagées pendant le jet en forte lumière. La valeur trouvée est 1/100ème de la concentration de la chlorophylle, donc environ 5 fois plus forte que celle des centres E, si 4 quanta sont supposés nécessaires pour dégager une molécule d'oxygène.

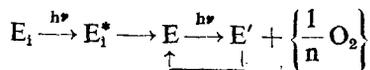
En ce qui concerne ces centres, Pierre Joliot apporte aussi une nouvelle information, grâce à une étude de l'action d'éclairs isolés. Ces éclairs avaient une énergie moyenne atteignant 50 joules et leur durée était environ $100 \cdot 10^{-6}$ sec. Après une longue période d'obscurité un premier éclat ne donne naissance à aucun dégagement d'oxygène, ce qui rappelle, sans avoir la même signification, le fait observé par Allen et Franck⁽¹⁸⁾ dans leur étude de la photosynthèse en anaérobie. Un deuxième éclat et les suivants, espacés de 5 à 10 secondes, produisent chacun une quantité d'oxygène correspondant à 1/1400ème de la concentration de la chlorophylle. Cette même quantité d'oxygène apparaît en déficit quand, en lumière continue, on compare les phases initiales de la photosynthèse sans préillumination et après préillumination. Le phénomène porte donc selon toute vraisemblance sur le système responsable du phénomène de saturation de Emerson.

A première vue ces faits pourraient être en faveur de l'idée que la réaction photochimique primaire nécessite l'accumulation de deux quanta sur un même centre photochimique. Mais une analyse plus poussée indique qu'il s'agit en réalité d'un processus d'activation. Considérons en effet un mécanisme à 2 quanta, en tenant compte d'expériences faites à de fortes intensités lumineuses et qui révèlent dans la phase initiale des cinétiques l'existence d'une réaction thermique limitante. E_1 , E_1^* , E_2 , E_3 sont des états successifs du centre et $\left\{ \frac{2}{n} O_2 \right\}$ un précurseur de O_2 . On aurait une série de réactions :



On peut montrer que, dans le cas d'une faible lumière, à la fin de la période transitoire, la moitié des centres serait à l'état E_1 et l'autre moitié à l'état E_2 , tandis qu'ils seraient tous à l'état efficace E_2 après une préillumination effectuée avec un fort éclat.

Si l'on admet au contraire un processus à 1 quantum

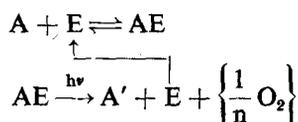


où E_1 représente un centre inactif et E' un centre qui a réagi, la quantité d'oxygène produite par un fort éclat sera toujours la même puisque tous les centres seront sous la forme active, que la préillumination soit effectuée par une faible lumière ou par un fort éclat. C'est effectivement ce que l'on observe.

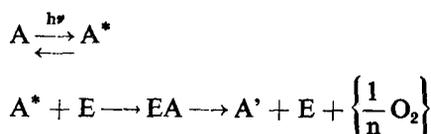
En toute rigueur l'étude cinétique ne nous renseigne que sur l'existence de concentrations critiques qui peuvent être aussi bien des concentrations de réactifs que des concentrations de catalyseurs, et dont la place dans la chaîne des processus est difficile à situer. L'ensemble des résultats se comprend bien si l'on admet l'un des deux schémas suivants:

(1°) Le système chimique dont la concentration (A) est mesurée par la quantité d'oxygène dégagée pendant le jet initial subit une transformation photochimique à l'état de complexe AE.

On a:



(2°) Le processus photochimique porte sur A. Le produit de cette réaction A* est ensuite stabilisé par le centre E, d'où le schéma:



On reconnaît ici l'hypothèse de Franck et Herzfeld.⁽¹⁹⁾

Rôle de la chlorophylle a. Dans ce qui précède, la nature de A n'est évidemment pas spécifiée. Tout ce que nous en savons c'est que sa concentration est environ 1/100ème de celle de la chlorophylle. A peut être un substrat comprenant la molécule d'eau qui sera scindée. Mais selon une suggestion de Lavorel,⁽²⁰⁾ A peut aussi être un type particulier de molécule de chlorophylle ou de complexe chlorophyllien. Ceci nous conduit à examiner à ce point de vue certaines données concernant la chlorophylle *in vivo*.

Les expériences de fluorescence sensibilisée de Dutton, Manning et Duggar,⁽²¹⁾ de Wassink et Kersten,⁽²²⁾ de Duysens,⁽²³⁾ de French et Young⁽²⁴⁾ ont établi que l'énergie de la lumière absorbée par les divers pigments des plastes, y compris la chlorophylle *b*, est transmise avec un haut rendement à la chlorophylle *a*. Chez les bactéries c'est la bactériochlorophylle 890 qui reçoit 100 p. 100 de l'énergie absorbée par les bactériochlorophylles 800 et 850. La chlorophylle *a* et la bactériochlorophylle 890 paraissent donc se situer à l'origine de la chaîne des transformations de l'énergie lumineuse en énergie chimique, qui font suite à son cheminement à travers le système pigmentaire.