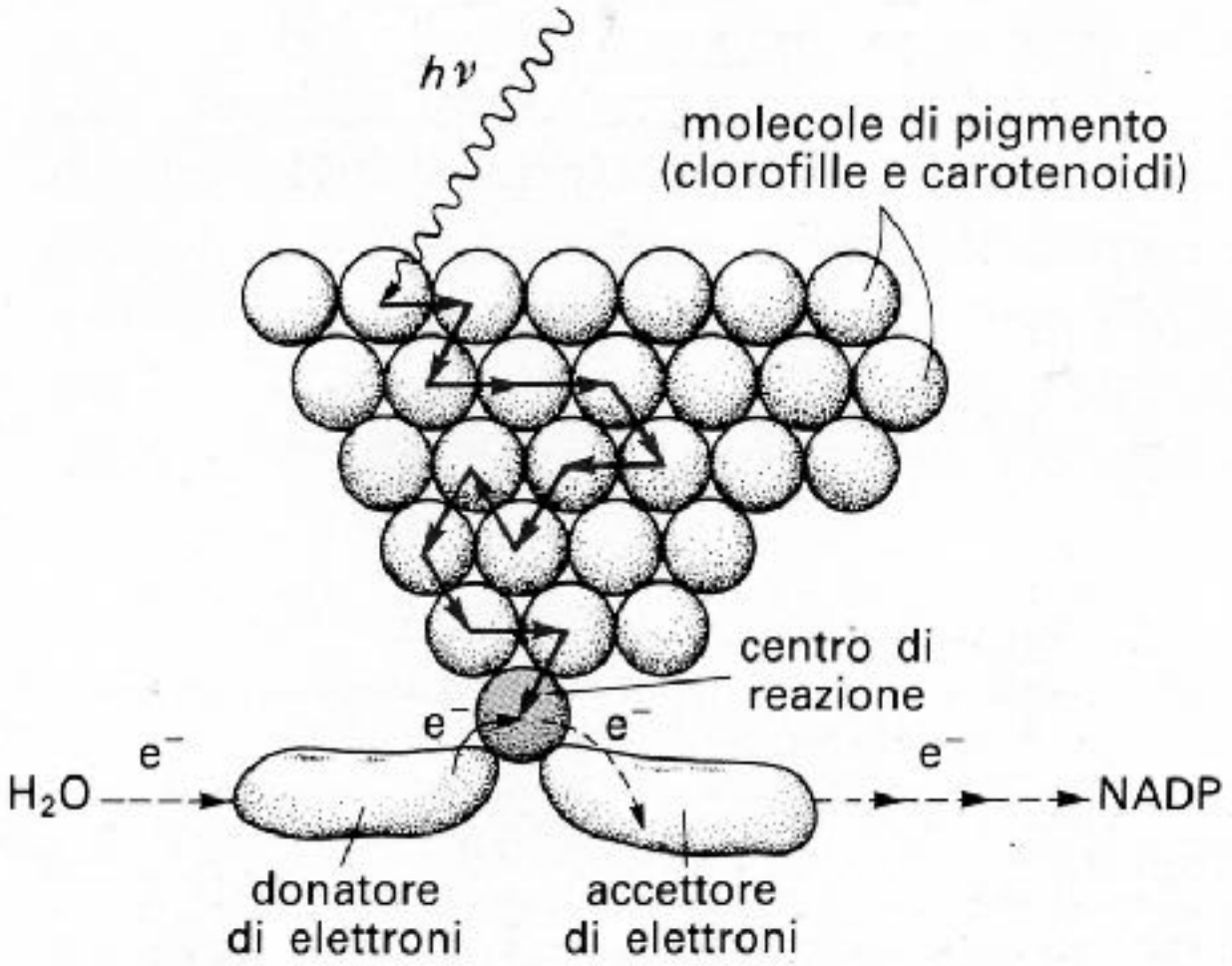

FOTOSINTESI




hν
molecole di pigmento
(clorofille e carotenoidi)
centro di
reazione
e⁻
e⁻
e⁻
e⁻
H₂O
NADP
donatore
di elettroni
accettore
di elettroni



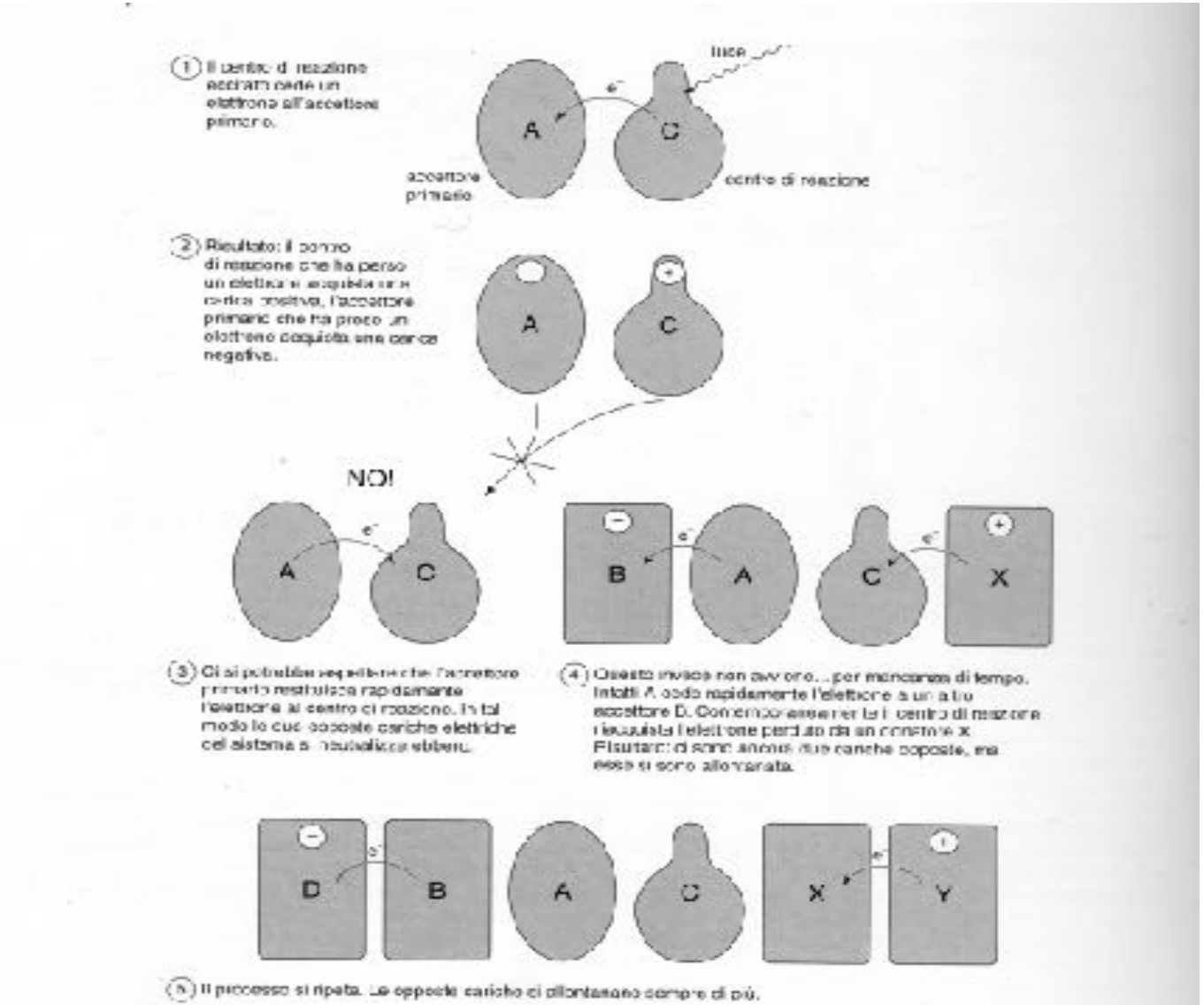


Fig. 13.19 • In seguito all'eccitazione del centro di reazione si forma una coppia di cariche elettriche: il centro di reazione perde un elettrone e quindi acquista una carica positiva mentre un accettore riceve un elettrone e quindi acquista una carica negativa. Una volta terminata la fase di separazione le due cariche non si ricombinano nuovamente perché migrano verso molecole sempre più lontane fra loro.



Il “donatore” di elettroni, nel caso della fotosintesi ossigenica, è l’acqua. Questa, scissa tramite fotolisi nel fotosistema II, libera 1 elettrone (e-), 1 protone (H+), e OH, con l’ossigeno ossidato da -2 a -1. L’elettrone va quindi a “ricaricare” la clorofilla a del centro di reazione.

Il destino dell’OH è quello di unirsi a un altro OH, liberando acqua, riportando l’ossigeno allo stato ridotto (-2), e “mezza” molecola di ossigeno, che verrà presto unita a un’altra metà per liberare ossigeno gassoso (meccanismo non ancora chiarito completamente).

Il fotosistema I, invece, non riceve elettroni dall’acqua (la fotolisi è “esclusiva” del fotosistema II), ma da una catena di trasporto degli elettroni che proviene dal fotosistema II.

In questo modo, si instaura un processo non ciclico di trasferimento di elettroni dall’acqua ai due fotosistemi, elettroni che saranno usati per ridurre il NADP+ a NADPH.



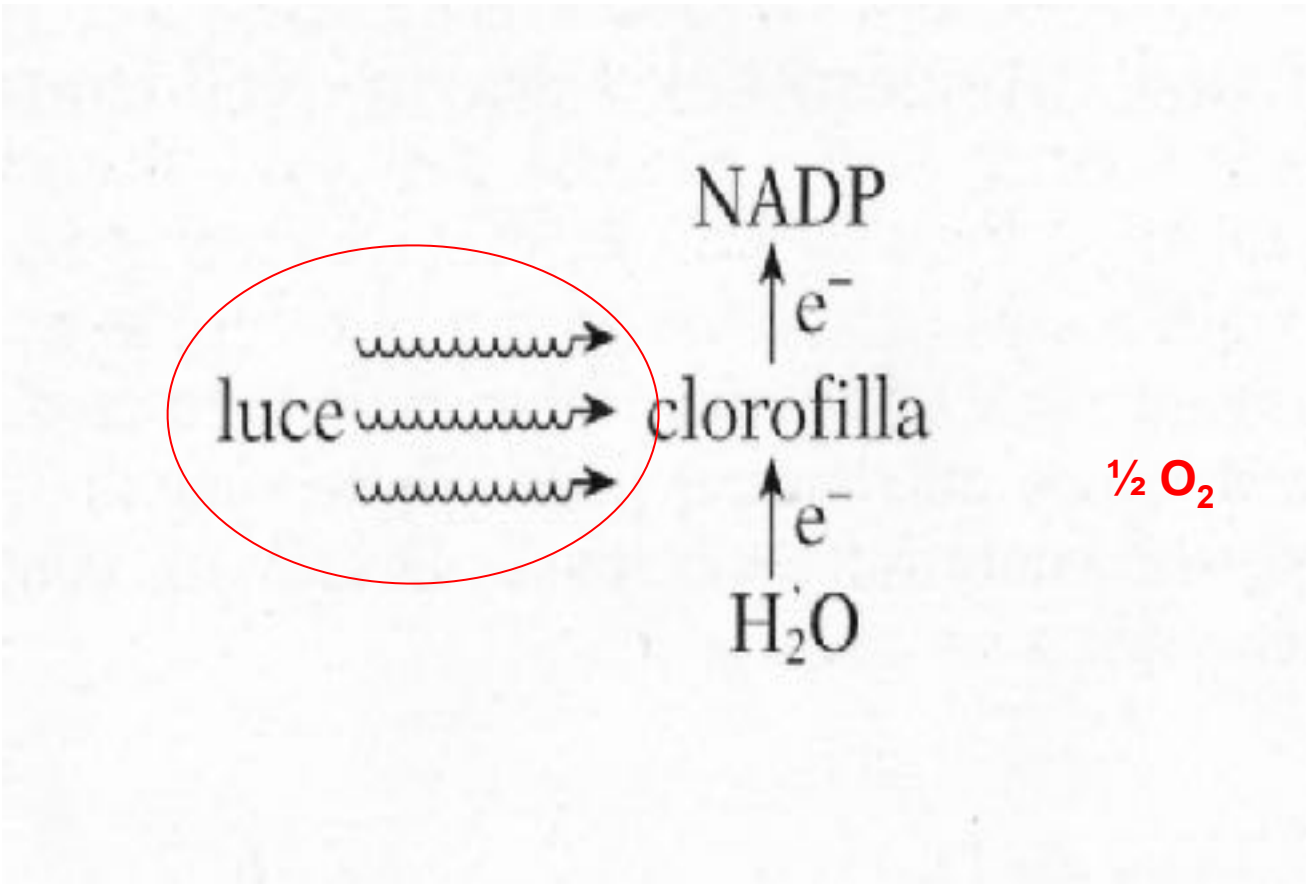
In conclusione, il donatore iniziale di elettroni è l'ossigeno dell'acqua, che si ossida (nei tilacoidi), e l'accettare finale è il $NADP^+$ (nello stroma dei cloroplasti).

$$H_2O + NADP^+ \longrightarrow NADPH + H^+ + ½\ O_2;$$

$$\Delta G^{0'} = + 218\ KJ/mol\ NADPH$$

Un sistema ossidoriduttivo avente un potenziale fortemente negativo ($NADPH+H^+$ / $NADP^+$: E'_0 = -0,32 V) è di fatto ridotto ad opera di un sistema ossidoriduttivo con potenziale estremamente positivo ($H_2O/½O_2$: E'_0= +0,82 V), e quindi richiede energia per avvenire.




NADP
e⁻
luce
clorofilla
e⁻
H₂O
½ O₂



La produzione dell'**NADPH+H$^+$** è in ultima analisi un processo ossido-riduttivo che avviene grazie al cambiamento di stato dei centri di reazione: questi diventano "generosi" quando sono eccitati, cedendo un elettrone ad un accettore, che si riduce, l'ultimo dei quali è l'NADP$^+$.

Il salto energetico tra la coppia **H_2O / NADPH+H$^+$** è così elevato, che abbiamo bisogno di due cambiamenti di *status* ossidoriduttivo, e quindi di due fotosistemi.

Infatti quando il fotosistema I funziona da solo (fotososforillazione ciclica) non produce NADPH, ma solo **ATP**.



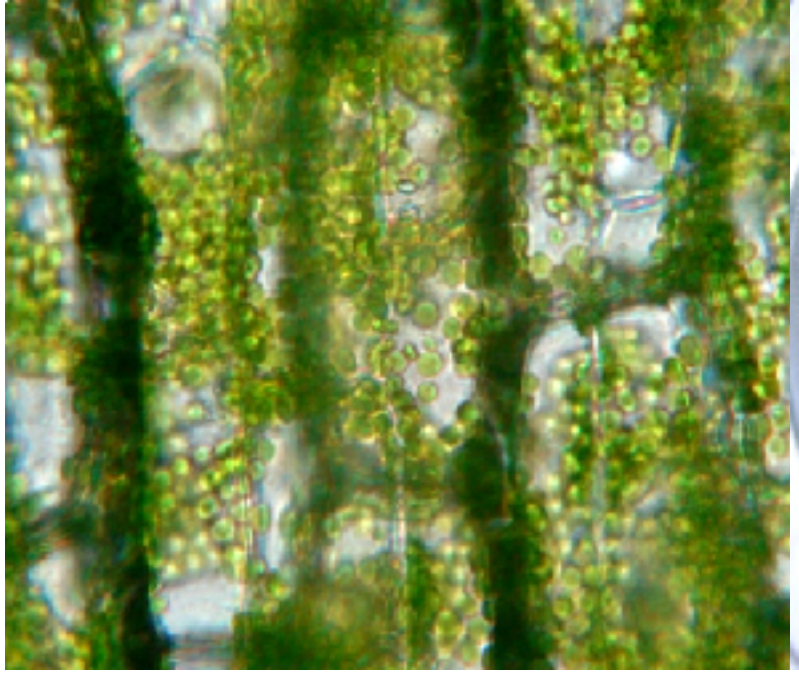
Clorofilla *a* (Chl *a*)

Tipo di clorofilla di colore verde-blu presente in (quasi?) tutti gli organismi con fotosintesi OSSIGENICA, dove partecipa come pigmento primario alla captazione dell'energia luminosa.

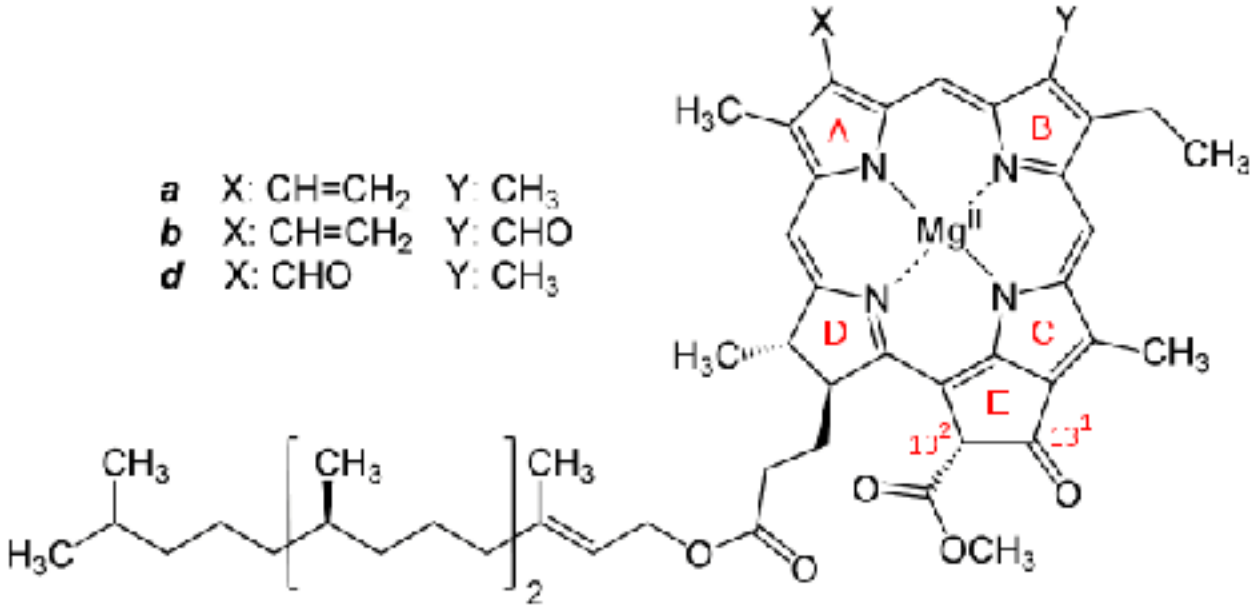
La molecola della clorofilla *a* è costituita da 4 anelli pirrolici sostituiti, uno dei quali ridotto, e da una lunga catena laterale terpenoide (fitolo); i due gruppi acidi sono esterificati uno dall'alcool metilico e l'altro dal fitolo.

La molecola che ne risulta presenta un polo idrofilo, quello con il nucleo tetrapirrolico, ed uno idrofobo, quello con il fitolo. Nei solventi organici presenta un massimo di assorbimento della luce alla lunghezza d'onda intorno a 430 e 660 nm. Ciò significa che assorbe la luce rossa e blu mentre la verde viene riflessa: ecco perché le foglie sono verdi!



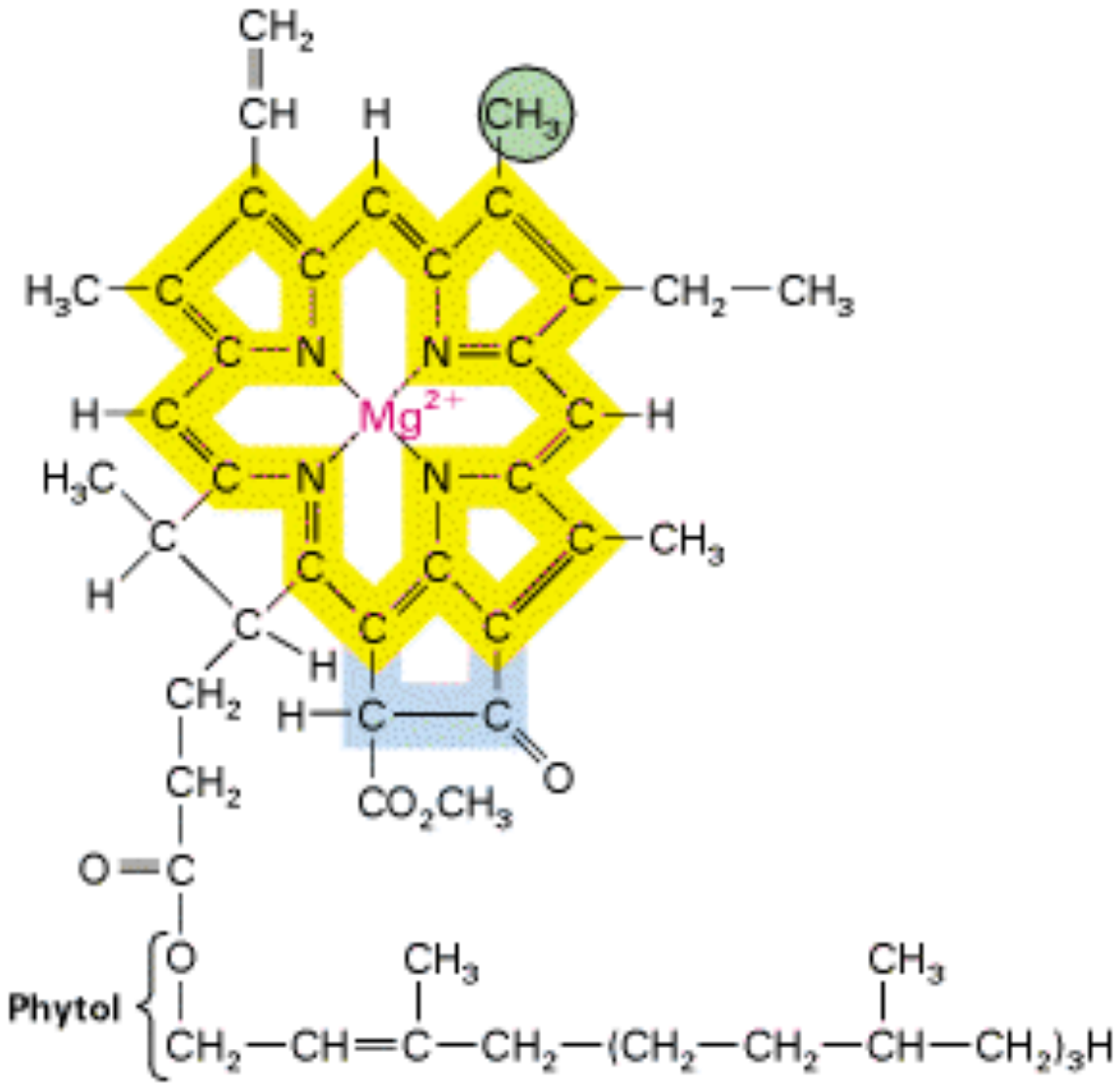




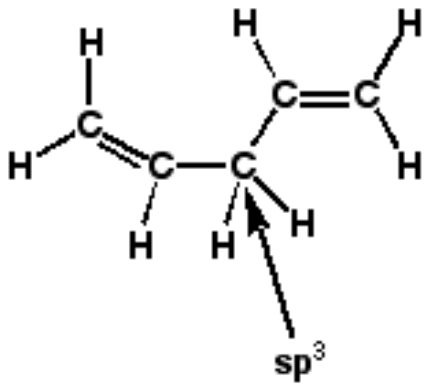

a X: CH=CH2 Y: CH3
b X: CH=CH2 Y: CHO
d X: CHO Y: CH3
X
Y
H3C
CH3
A
B
N
N
Mg
N
N
D
C
H3C
CH3
E
O
O
OCH3
CH3
CH3
CH3
H3C
O
O
2

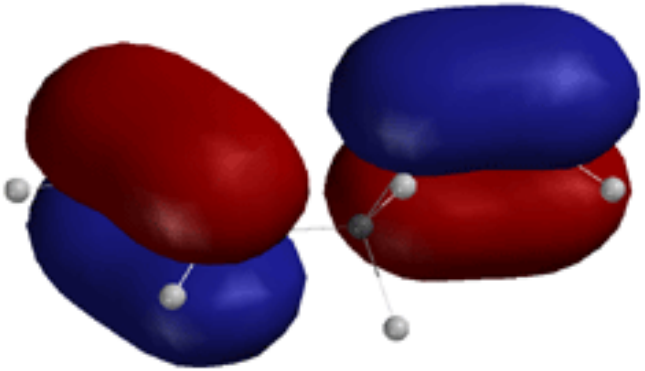


Chlorophyll *a*

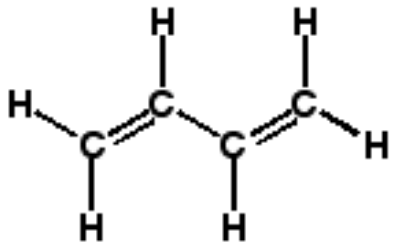




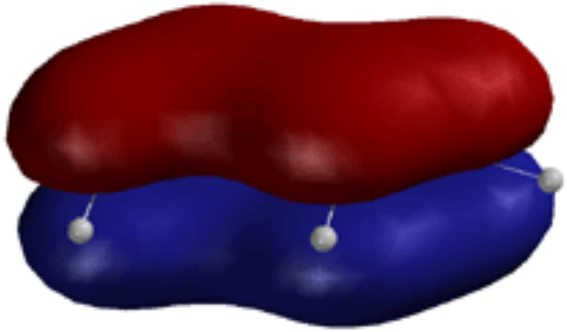




Non-conjugated π system
(π bonds do not interact)



All carbon atoms sp^2

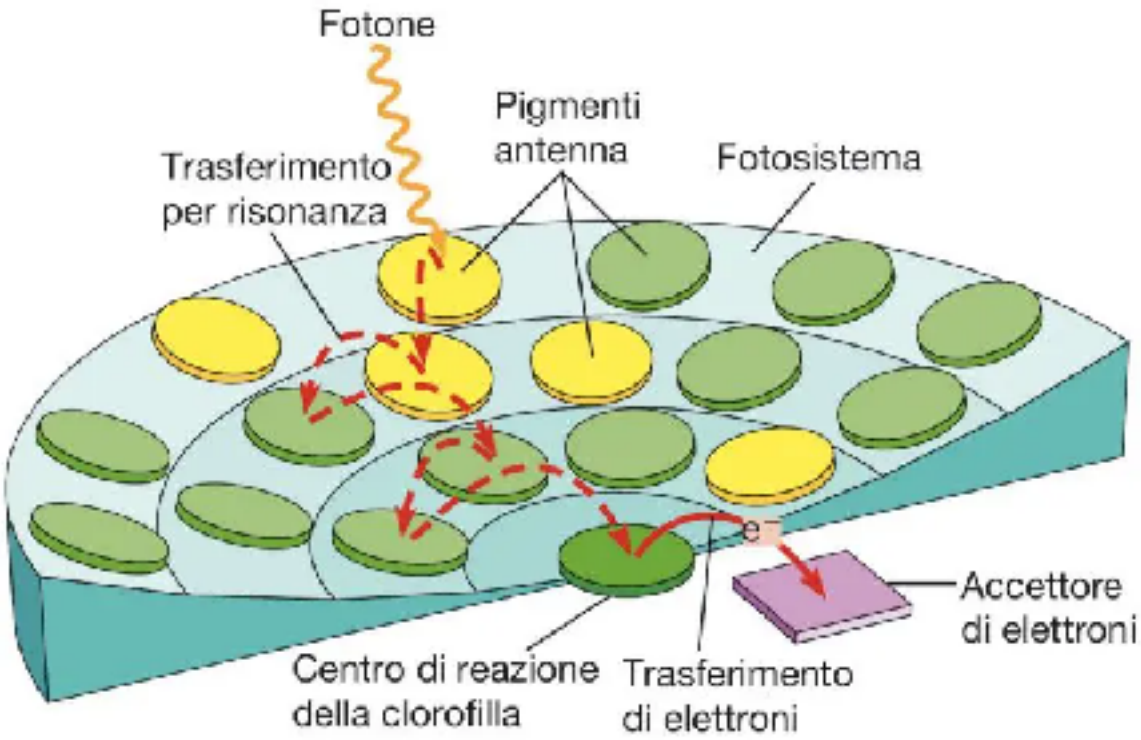


Conjugated π system
(Electron density
delocalized over all
four carbon atoms)



Complesso antenna: reprise :-)





Le molecole di **clorofilla** e di altri pigmenti che costituiscono il **complesso antenna** assorbono fotoni a lunghezze d'onda specifiche.

Quando un pigmento assorbe un fotone, un **elettrone** in quella molecola viene promosso da uno stato elettronico fondamentale a uno **stato eccitato singoletto**.

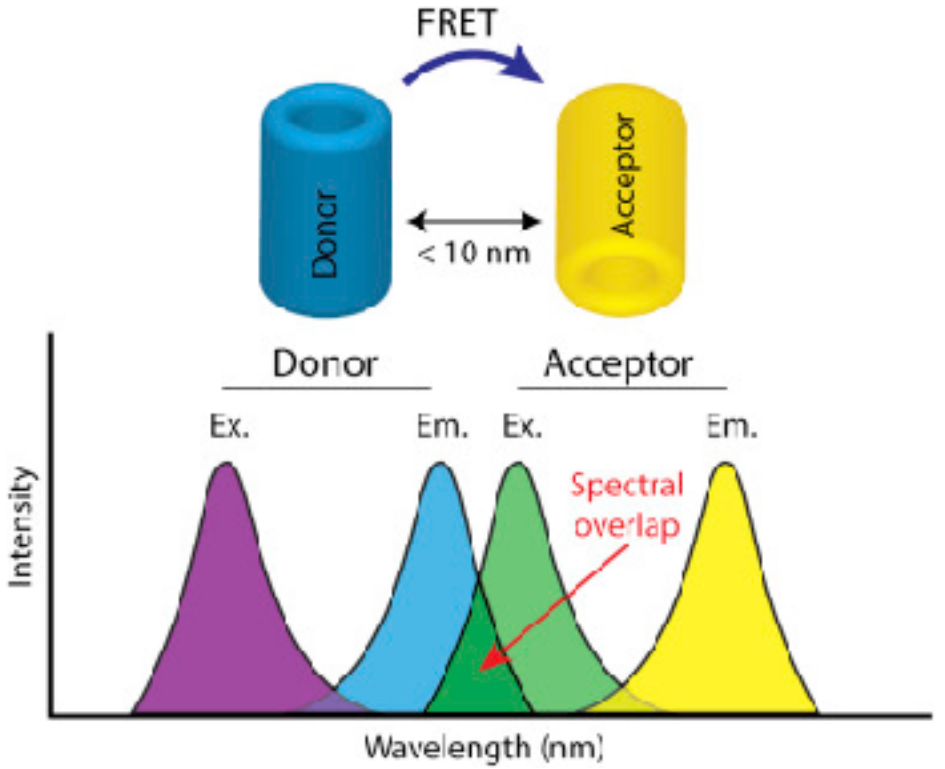
L'energia dell'eccitazione non è stabile: deve essere trasferita altrove per non andare persa in forma di calore.

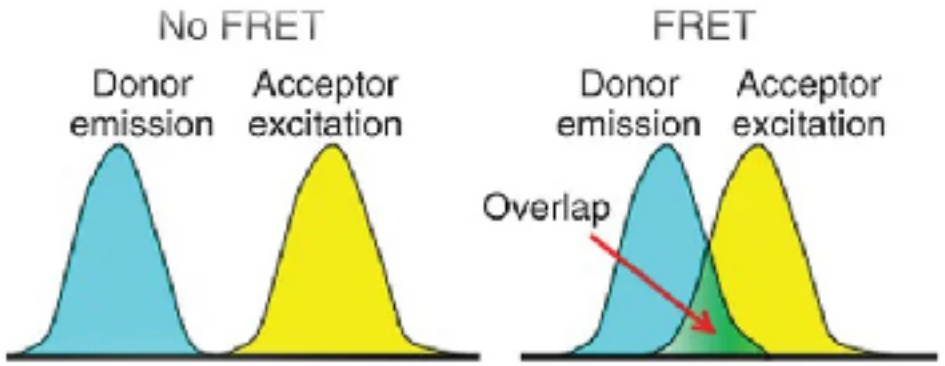


Il processo non avviene con il trasferimento diretto di elettroni tra pigmenti antenna, ma attraverso un **meccanismo di risonanza elettromagnetica** (**Fluorescence Resonance Energy Transfer - FRET)** o **trasferimento di eccitazione per risonanza**.

- **Come funziona**:
  - Una molecola eccitata genera un **campo elettromagnetico oscillante** (dipolo di transizione).
  - Se nelle vicinanze (< 2–10 nm) c'è un altro pigmento le cui bande di assorbimento coincidono con l'energia dell'eccitazione, l'energia può "saltare" dal primo pigmento al secondo per accoppiamento dipolo–dipolo.
- **Condizione di risonanza**: La transizione elettronica della molecola donatrice deve avere un'energia molto vicina (in risonanza) a quella della molecola accettrice.
- **Perdita graduale di energia**: Ad ogni trasferimento, l'energia tende ad abbassarsi leggermente (shift verso lunghezze d'onda più lunghe, "**red shift**"), finché si raggiunge il centro di reazione.




FRET
Donor
Acceptor
< 10 nm
Donor
Acceptor
Ex.
Em.
Ex.
Em.
Spectral overlap
Intensity
Wavelength (nm)


No FRET
Donor emission
Acceptor excitation
FRET
Donor emission
Acceptor excitation
Overlap



Le proteine del complesso antenna non sono disposte a caso: creano una **rete spaziale organizzata** di pigmenti, con energie elettroniche leggermente decrescenti verso il centro di reazione.

Questo genera un "**imbuto energetico**" (energy funnel) che guida l'eccitazione, minimizzando la dispersione.

L'energia arriva infine allo **special pair di clorofille** (**P680** nel **Fotosistema II**, **P700** nel **Fotosistema I**).

Queste clorofille speciali hanno la capacità, per eccitazione elettrostatica, di "perdere" un elettrone, che viene effettivamente trasferito a un **accettore primario.**

Da qui parte la vera catena di trasporto degli elettroni della fotosintesi.



Riassunto del meccanismo

- Il fotone **non viaggia fisicamente da una molecola all'altra**.
- L'energia è trasmessa attraverso una **serie di oscillazioni coerenti dei dipoli elettronici**, un po' come onde che passano da un diapason vibrante a un altro vicino.
- Questo meccanismo di **trasferimento per risonanza di eccitazione** è estremamente efficiente (fino al **95–99%** di rendimento).



Che peccato!

Le cose, purtroppo, non sono veramente così.
O almeno, non solo…



Negli ultimi 15 anni (a partire dal 2007 circa), usando tecniche di **spettroscopia 2D ultrarapida** sui complessi antenna (ad esempio il **FMO complex** dei batteri verdi solforosi), è emerso un fenomeno sorprendente:

- Dopo l'assorbimento di un fotone, l'eccitazione **non resta localizzata su un singolo pigmento**, ma si distribuisce **coerentemente** su più molecole contemporaneamente.
- Si formano stati quantistici "delocalizzati", cioè **superposizioni coerenti** di eccitazione tra più pigmenti.

In altre parole, invece di pensare a un'energia che "salta" come una pallina da una molecola all'altra, bisogna immaginarla come un'**onda quantistica** che si propaga su tutta la rete di pigmenti.



Questa propagazione ondulatoria ha conseguenze importanti:

- **Ricerca parallela dei cammini energetici**:
  L'onda quantistica esplora simultaneamente più percorsi nella rete pigmentaria. L'energia non prova una strada alla volta, ma "tutte insieme".
- **Selezione del percorso ottimale**:
  L'interferenza quantistica favorisce i cammini più efficienti verso il centro di reazione, scartando quelli meno favorevoli.
- **Robustezza al rumore termico**:
  In modo contro-intuitivo, l'interazione con le vibrazioni molecolari (il rumore dell'ambiente) non distrugge ma può addirittura **stabilizzare la coerenza**, aiutando l'energia a mantenersi in uno stato delocalizzato abbastanza a lungo per raggiungere il centro di reazione.



Oggi si pensa che nei complessi antenna agiscano **entrambi i meccanismi**:

- **FRET classico**, utile per spiegare i trasferimenti più locali e a lungo raggio.
- **Coerenza quantistica**, che permette una **ricerca veloce e parallela dei cammini energetici**, aumentando l'efficienza complessiva.

In sintesi: la fotosintesi sembra sfruttare principi della **meccanica quantistica applicati a sistemi biologici**, per massimizzare la raccolta e il trasferimento dell'energia solare.



Queste ricerche hanno interessanti sviluppi applicativi…

La fotosintesi ha mostrato che la natura sfrutta coerenze quantistiche e accoppiamenti vibrazionali per dirigere l'energia in modo estremamente efficiente.

Diversi gruppi di ricerca stanno tentando di trasporre quei principi in materiali artificiali (organici, ibridi, plasmonici e polaritonici) per migliorare l'assorbimento, il trasporto e l'estrazione dell'energia nelle celle solari.

I progressi sono promettenti ma si scontrano con sfide pratiche di decoerenza, stabilità e dimostrazione di benefici energetici reali su scala tecnologica.



Evoluzione della fotosintesi



La terra si è formata circa 4,5 miliardi di anni fa.

Nei primi 500 milioni di anni circa, è stata bombardata da sciami meteorici, che hanno reso la sua superficie troppo tormentata (e calda) per ospitare la vita.
Tuttavia, queste hanno probabilmente portato sul pianeta:
i) materia organica di origine extraterrestre
ii) acqua
iii) azoto molecolare.

Questo “bombardamento a tappeto” cessò probabilmente circa 4 miliardi di ani fa. Gli esperti sono abbastanza concordi nel credere che le prime forma di vita si siano quindi sviluppate circa 3,8 miliardi di anni fa.

Le condizioni sul pianeta, a questo stadio del suo sviluppo erano le seguenti: ossigeno quasi assente dall’atmosfera (ca. 0,001%, contro circa il 21% attuale); altissime concentrazioni di anidride carbonica, con conseguente effetto serra. La convinzione che vi fosse anche molto metano sembra oggi non essere più supportata dai ricercatori.

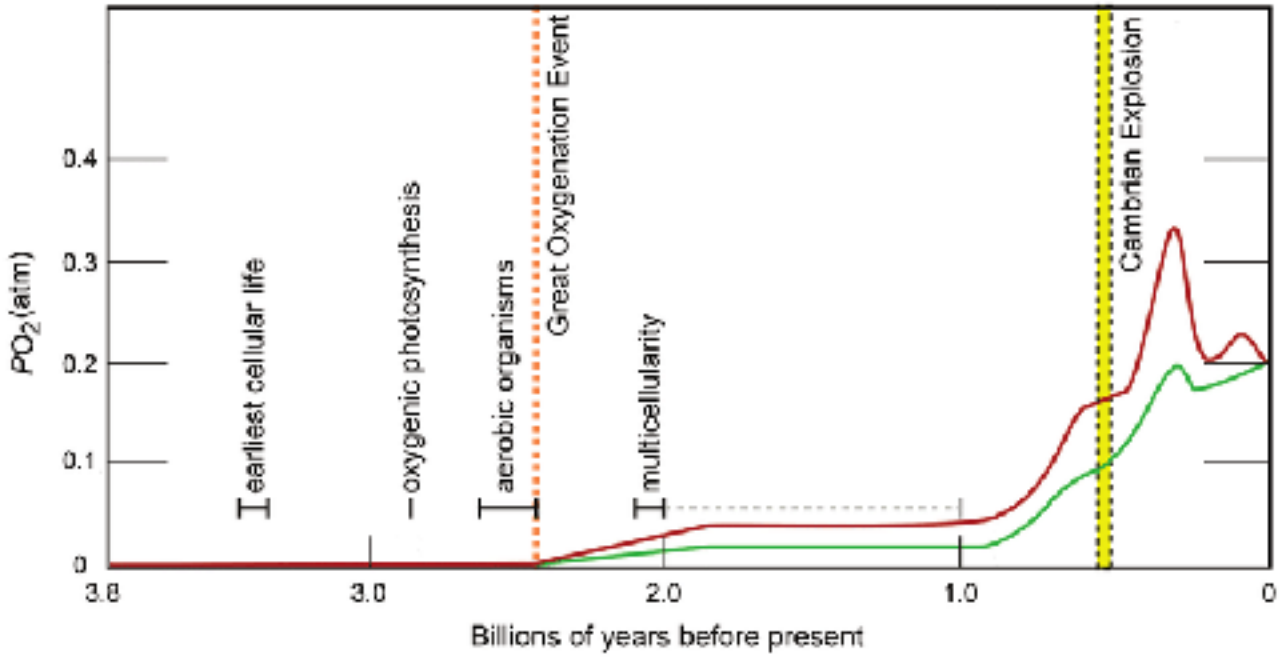


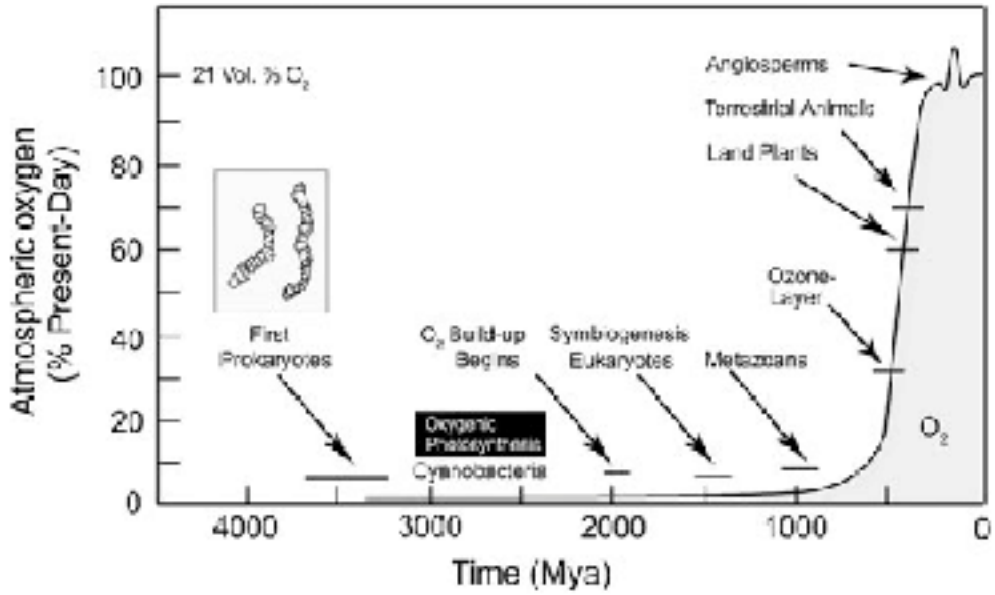
L’effetto serra garantito dalle alte concentrazioni di anidride carbonica in questa fase della vita del pianeta fu probabilmente molto importante, visto che il sole era nei suoi primi stadi di sviluppo, e emetteva un quantitativo di energia che doveva essere circa 80% di quello attuale.

Le prime evidenze di fotosintesi vengono oggi fatte risalire a circa 3,6 miliardi di ani fa. Tuttavia, la fotosintesi ossigenica, ovvero quella che prevede la rottura di acqua e la liberazione di ossigeno, viene fatta risalire a tempi più recenti, circa 2,8-3 miliardi di anni fa, con la comparsa di alcuni primitivi cianobatteri.

Di conseguenza, una massiccia immissione di ossigeno in atmosfera non è iniziata probabilmente prima di 3 miliardi di anni fa. Inoltre, a causa della grande quantità di gas e altri materiali riducenti sul pianeta, il livello di ossigeno iniziò a crescere molto lentamente all’inizio, tanto che si stima che rimase circa a 1% nell’atmosfera fino a 1 miliardo di anni fa.




PO_2 (atm)
0.4
0.3
0.2
0.1
0
earliest cellular life
oxygenic photosynthesis
aerobic organisms
Great Oxygenation Event
multicellularity
Cambrian Explosion
3.8
3.0
2.0
1.0
0
Billions of years before present

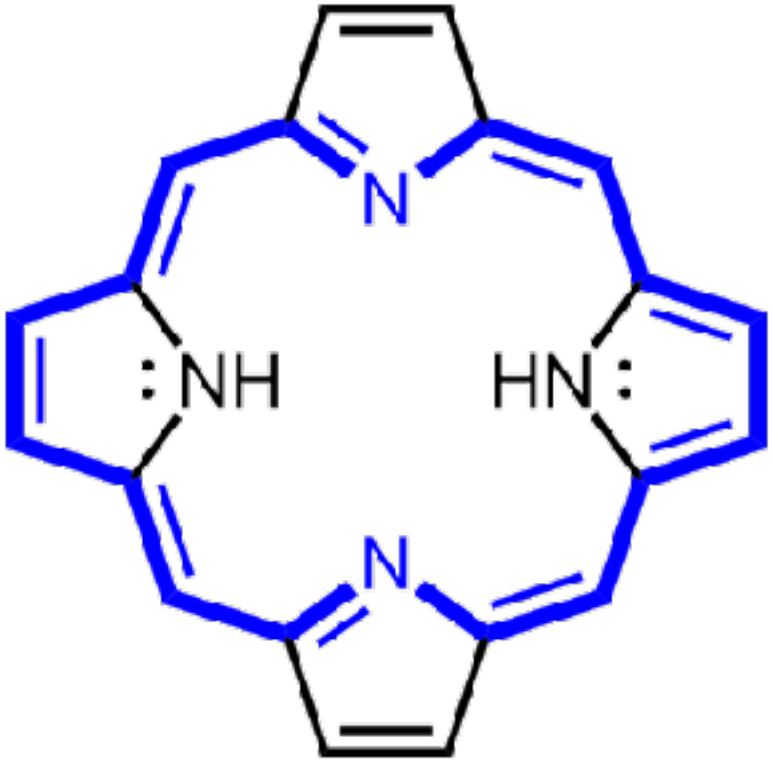

Atmospheric oxygen
(% Present-Day)
100
80
60
40
20
0
21 Vol. % O_2
First Prokaryotes
O_2 Build-up Begins
Oxygenic Photosynthesis
Cyanobacteria
Symbiogenesis Eukaryotes
Metazoans
Ozone-Layer
Land Plants
Terrestrial Animals
Angiosperms
O_2
4000
3000
2000
1000
0
Time (Mya)



La comparsa dei primi eucarioti fotosintetici viene fatta risalire a circa 2-1,8 miliardi di anni fa.

L'evoluzione dei primissimi batteri fotosintetici sembra sia dovuta in particolare a molecole quali porfirinogeni e porfirine.

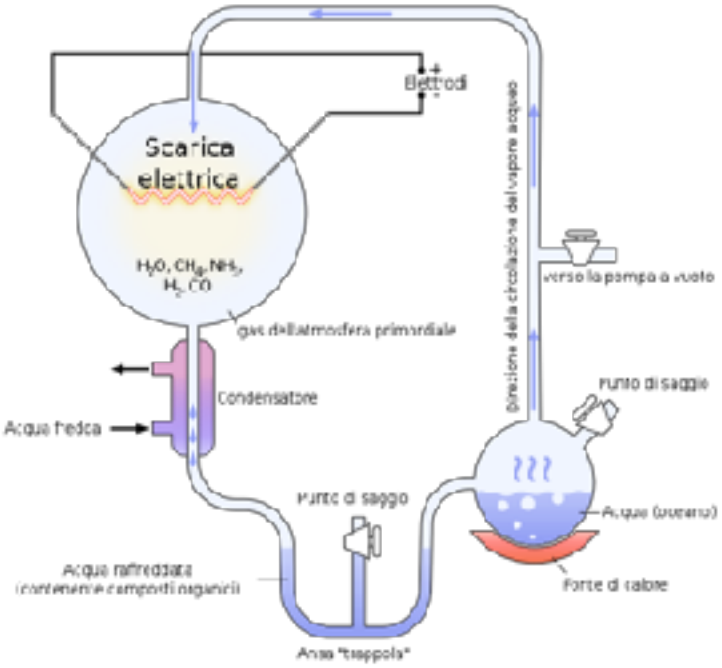
I porfirinogeni sono composti che si trovano in natura, e che erano prodotti in quantità probabilmente nei primi stadi di evoluzione del pianeta. Essi sono i precursori delle porfirine, che a loro volta sono la base per la costruzione di diverse molecole organiche quali citocromi, eme, clorofille, vitamina B, etc.





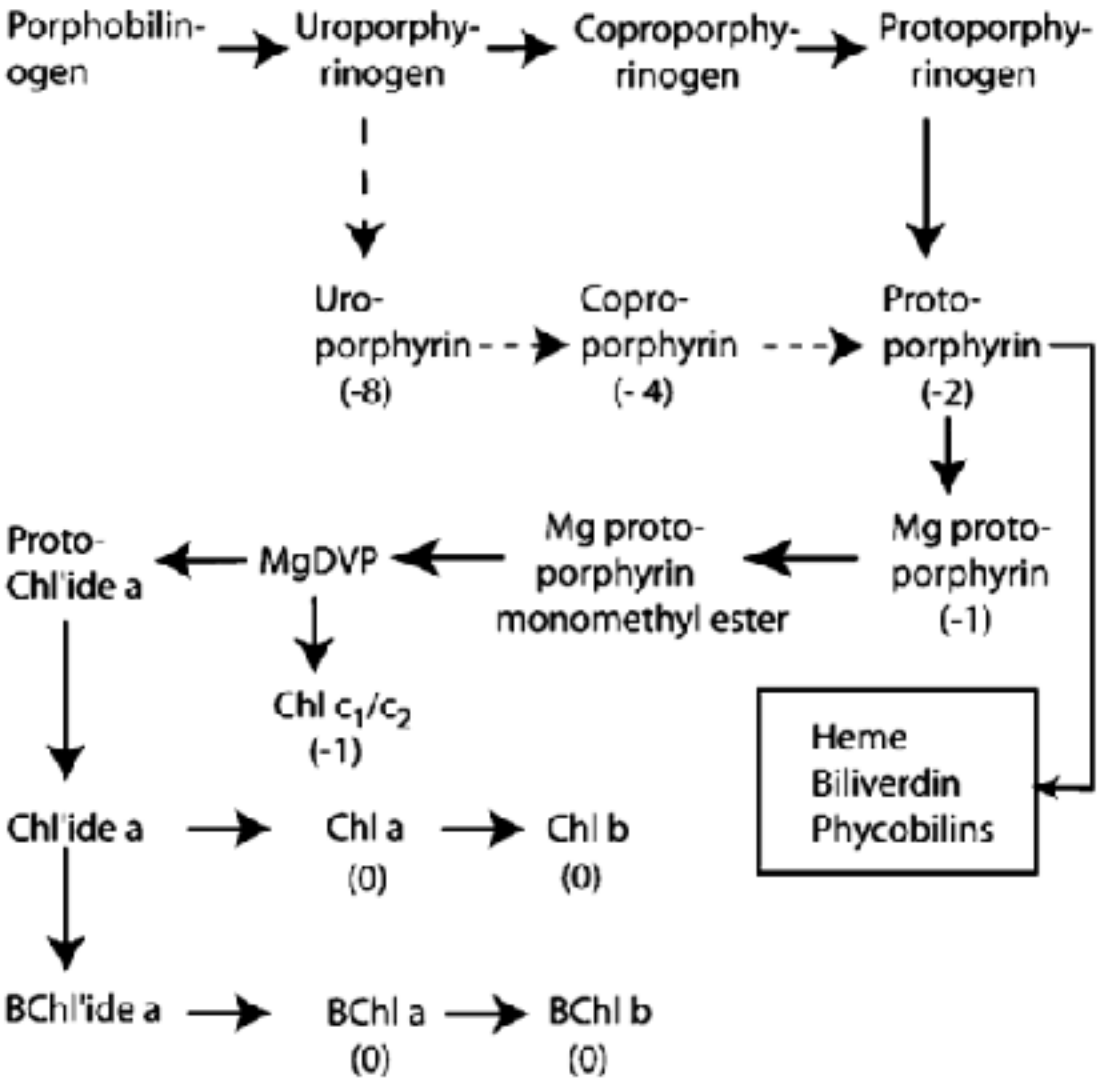
Le porfirine sono colorate, e hanno un picco principale di assorbimento nel violetto (400-410 nm), e altri 4 caratteristici picchi minori nel verde.

Siccome porfirine furono prodotte nell'esperimento di Urey e Miller, negli anni 50, è facile immaginare che queste molecole fossero abbondanti nel brodo primordiale del pianeta, e che quindi fossero le prime molecole capaci di assorbire la luce a essere usare da alcuni primitivi organismi fotosintetizzanti. É stato suggerito che un primo meccanismo di pompa redox alimentata dalla luce fosse capace di generare un gradiente protonico ossidando composti organici e riducendo ioni ferrici (Fe^{3+}).



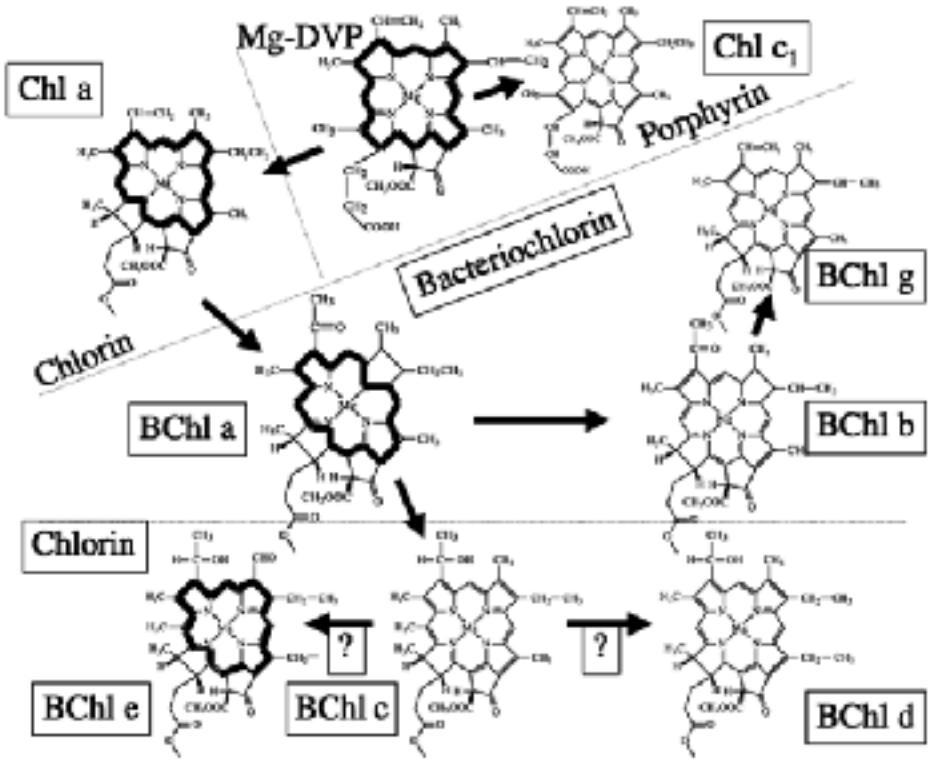
esperimento di Urey e Miller




Porphobilin-ogen
Uroporphy-rinogen
Coproporphy-rinogen
Protoporphy-rinogen
Uro-porphyrin (-8)
Copro-porphyrin (-4)
Proto-porphyrin (-2)
Mg proto-porphyrin (-1)
Mg proto-porphyrin monomethyl ester
MgDVP
Proto-Chl'ide a
Chl c_1/c_2 (-1)
Heme
Biliverdin
Phycobilins
Chl'ide a
Chl a (0)
Chl b (0)
BChl'ide a
BChl a (0)
BChl b (0)



I primi pigmenti fotosintetici “moderni” furono probabilmente delle porfirine chelanti magnesio (Mg2+), che portò a un notevole aumento della loro efficienza.
Sembra ora possibile che da queste molecole si siano originate prima le clorofille c che la clorofilla (Chl) a e b, e le batterioclorofille (BChl). Esistono tuttavia diverse contrastanti ipotesi su quale forma di clorofille si sia evoluta prima.





Da questo punto in poi l'evoluzione dei pigmenti fotosintetici diviene ancor più incerta.

Anche la relativa certezza del ruolo fondamentale della Chl a in entrambi i fotosistemi, ove si credeva fosse l'unica clorofilla a formare lo "*special pair*", è stata recentemente messa in dubbio dalla scoperta della Chl d (P740), che invece forma come omodimero lo *special pair* nel fotosistema I, e probabilmente come eterodimero con la clorofilla a nel fotosistema II del cianobatterio *Acaryochloris marina*.

Questa scoperta è stata in un certo senso rivoluzionaria, perché ha dimostrato non solo che il ruolo esclusivo della Chl a non è tale, ma che anche radiazioni nel rosso lontano sembrano contenere fotoni con energia sufficiente ad attivare il processo fotosintetico.

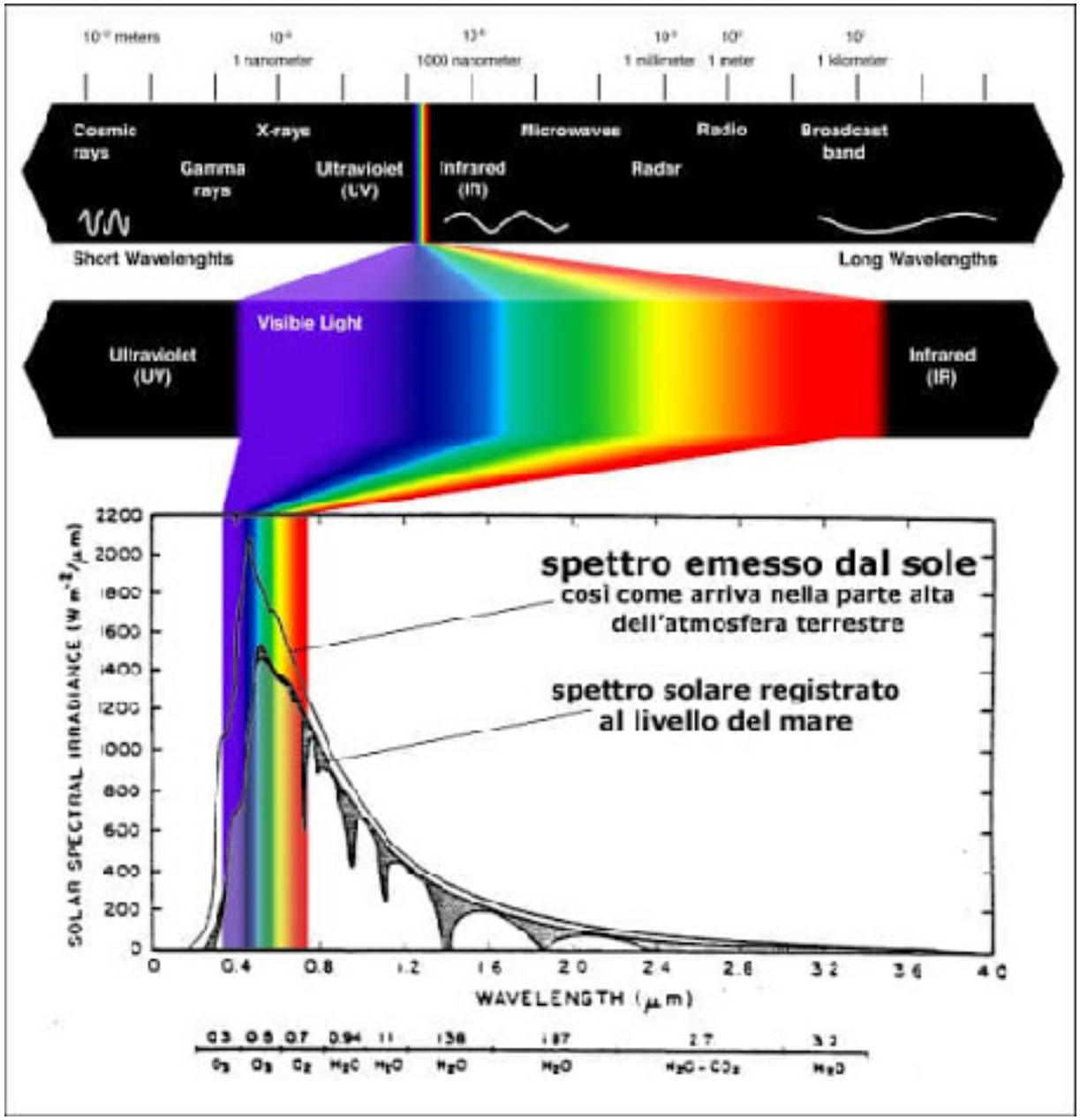
L'adattamento che ha portato alla selezione di organismi con clorofilla d da un indubbio vantaggio in ambienti dove la luce disponibile è quella già filtrata da altri organismi fotosintetizzanti con clorofilla a.



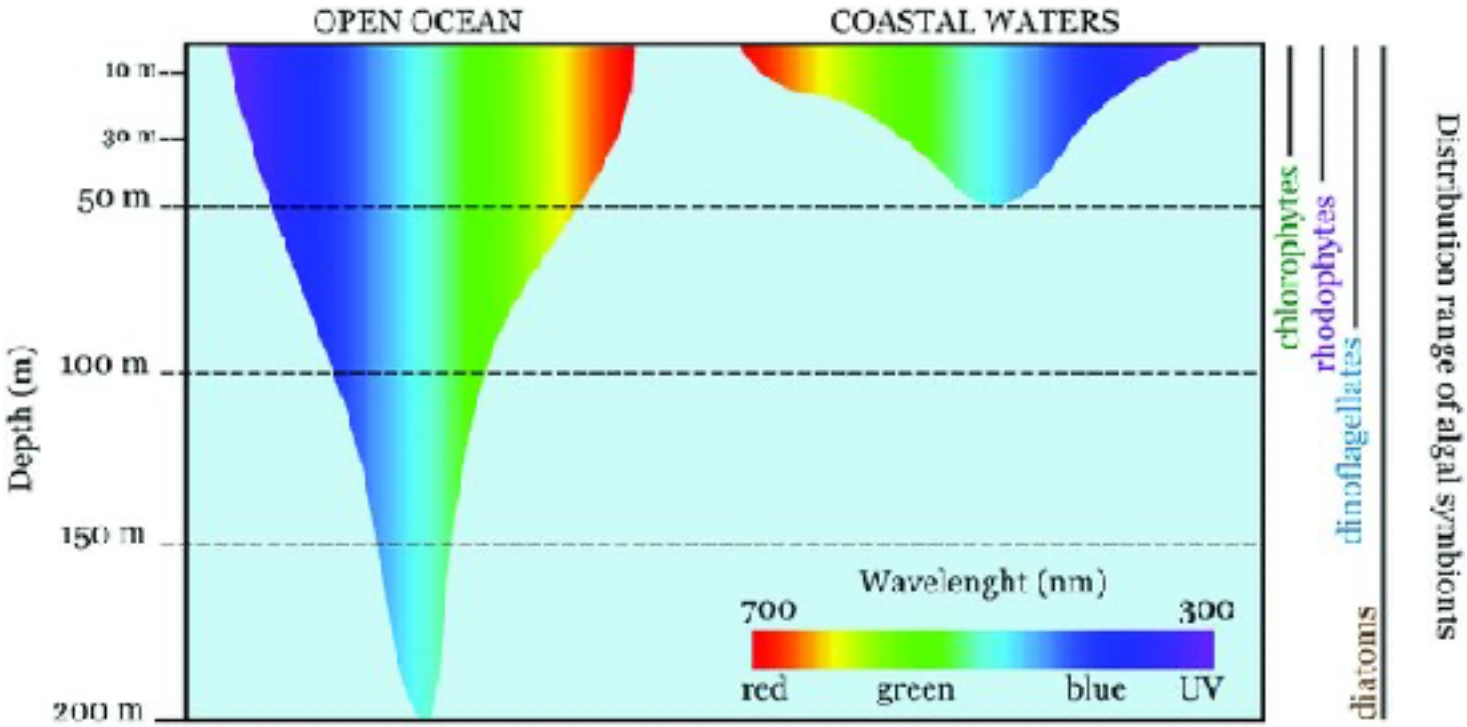
Perché queste lunghezze d'onda?

Perché la fotosintesi si è evoluta per sfruttare proprio queste, e non altre, magari più ricche di energia?



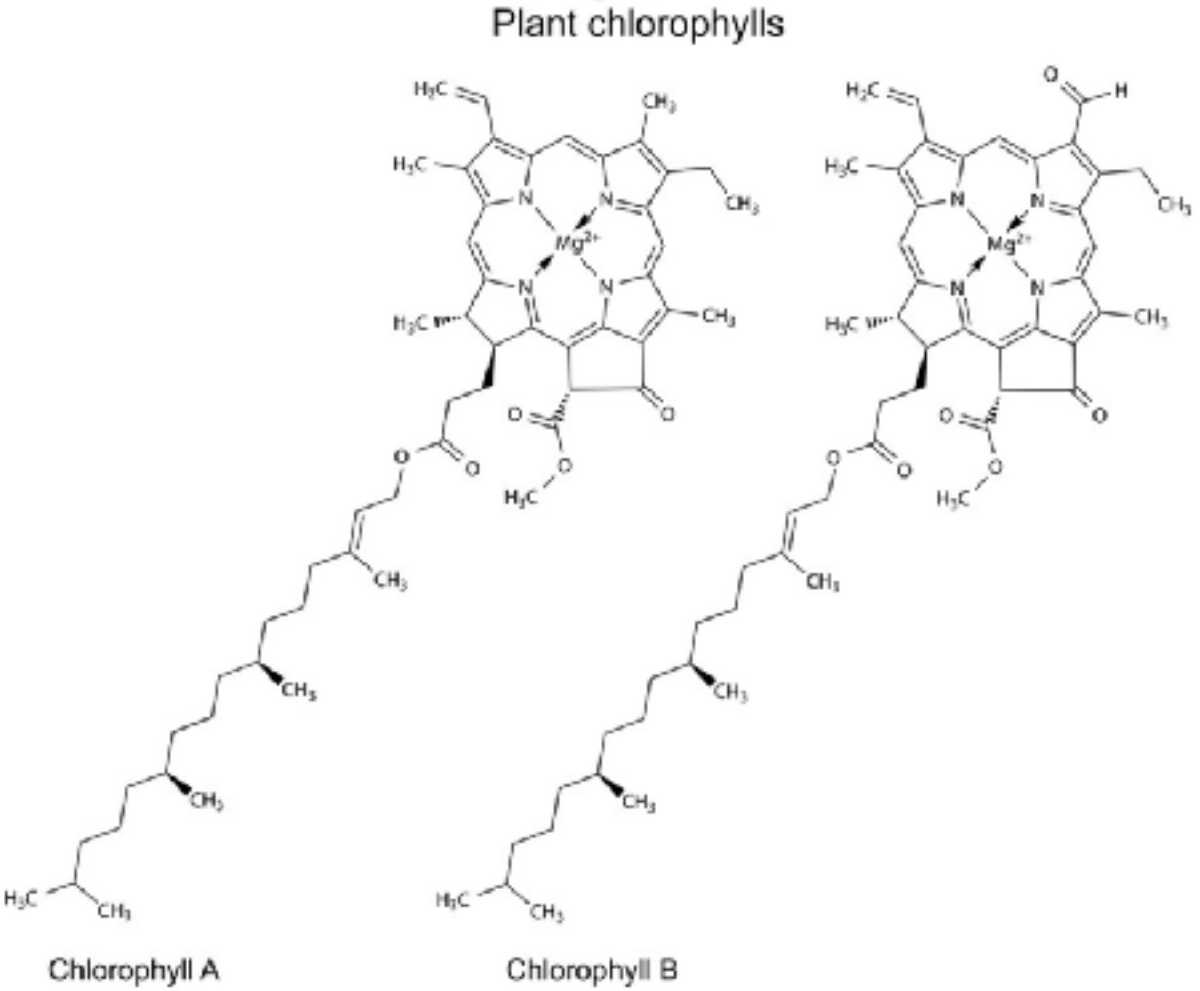

1 nanometer
1000 nanometer
1 millimeter
1 meter
1 kilometer
Cosmic rays
X-rays
Gamma rays
Ultraviolet (UV)
Infrared (IR)
Microwaves
Radar
Radio
Broadcast band
Short Wavelenghts
Long Wavelengths
Ultraviolet (UV)
Visible Light
Infrared (IR)
spettro emesso dal sole
così come arriva nella parte alta dell'atmosfera terrestre
spettro solare registrato al livello del mare
SOLAR SPECTRAL IRRADIANCE (W m⁻² / μm)
WAVELENGTH (μm)




OPEN OCEAN
COASTAL WATERS
10 m
30 m
50 m
100 m
150 m
200 m
Depth (m)
Wavelenght (nm)
700
300
red
green
blue
UV
chlorophytes
rhodophytes
dinoflagellates
diatoms
Distribution range of algal symbionts

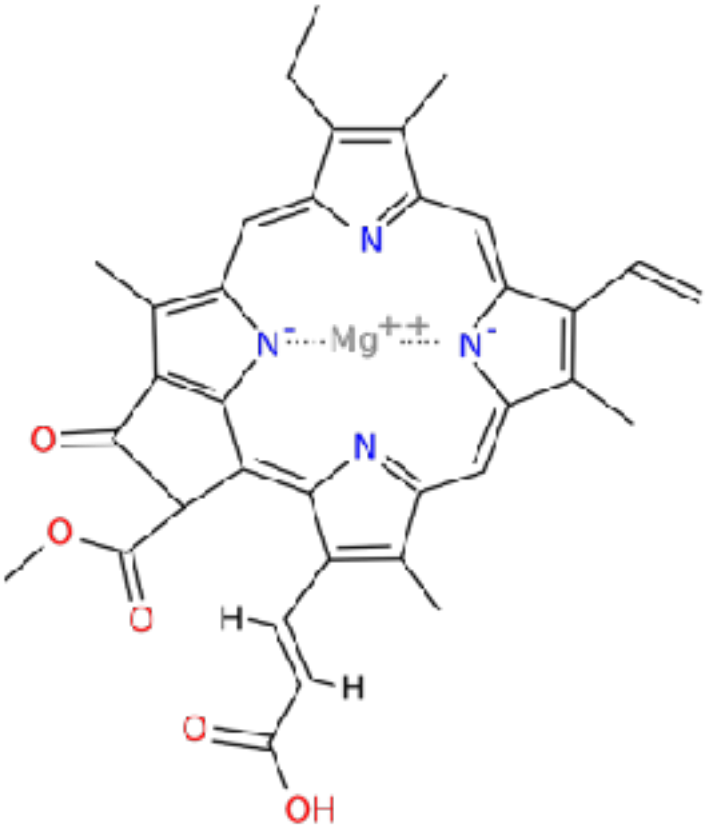


Tuttavia, come detto, non esiste solo la clorofilla a….

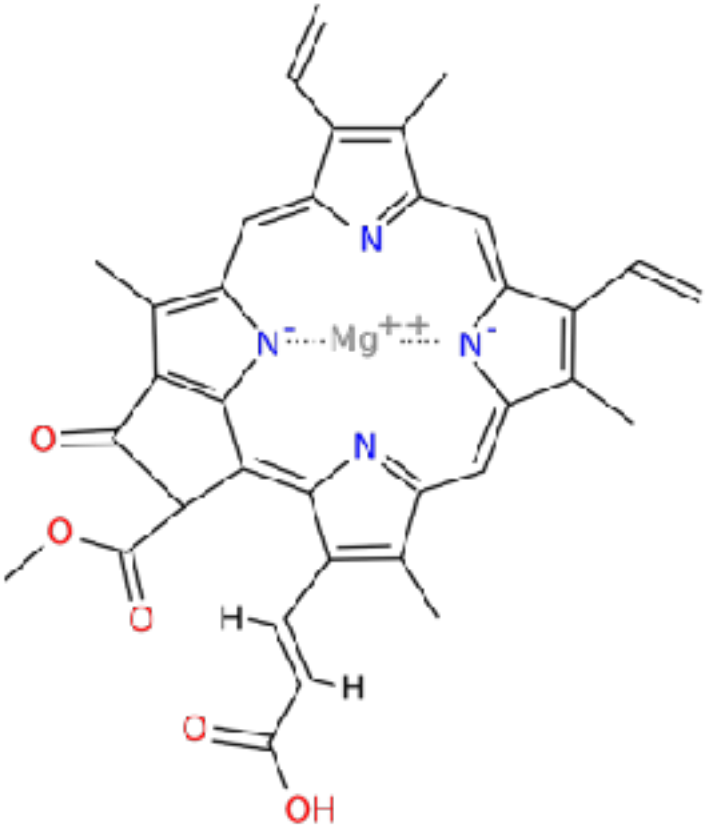




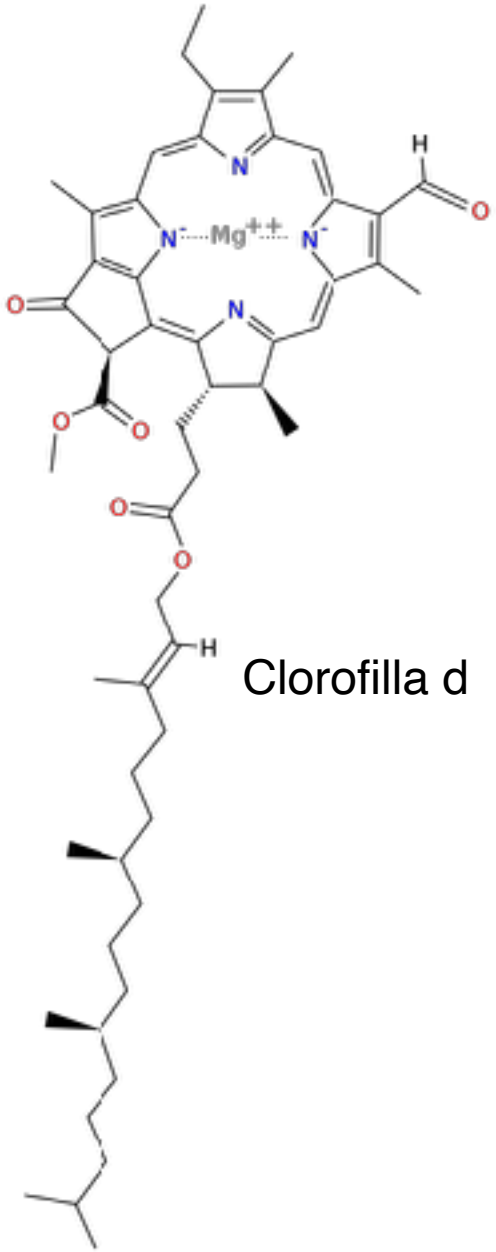
Clorofilla c1



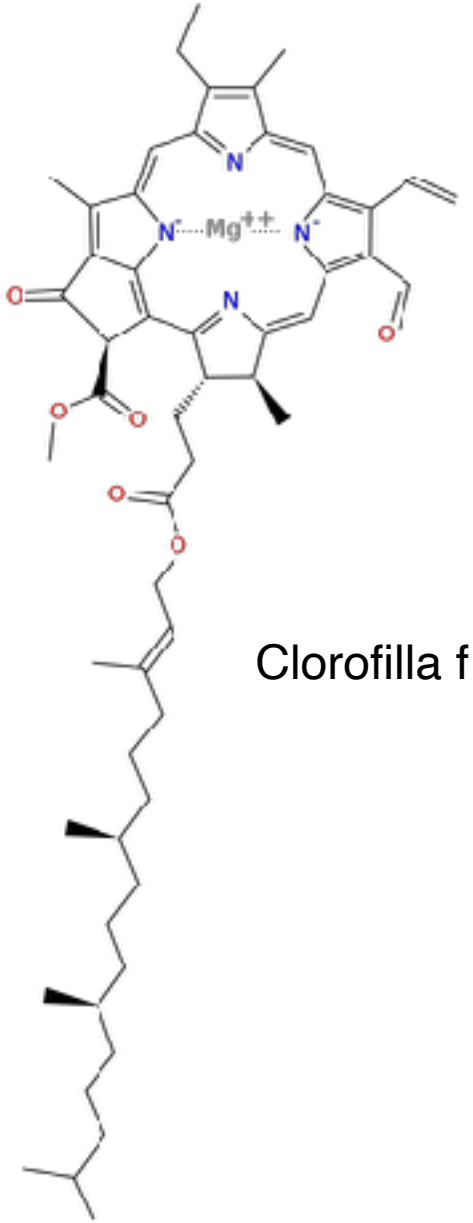
Clorofilla c2







Clorofilla d



Clorofilla f

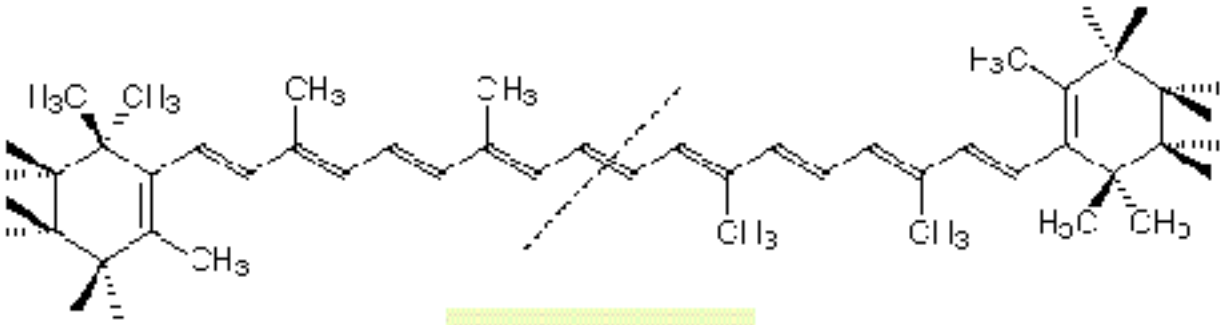


La clorofilla a è universale, presente in tutti gli organismi fotosintetizzanti. Le altre invece sono limitate a alcuni gruppi di organismi. La clorofilla b è presente principalmente nelle piante, mentre le c sono presenti nelle alghe. Le clorofille d e f sono presenti solo nei cianobatteri.

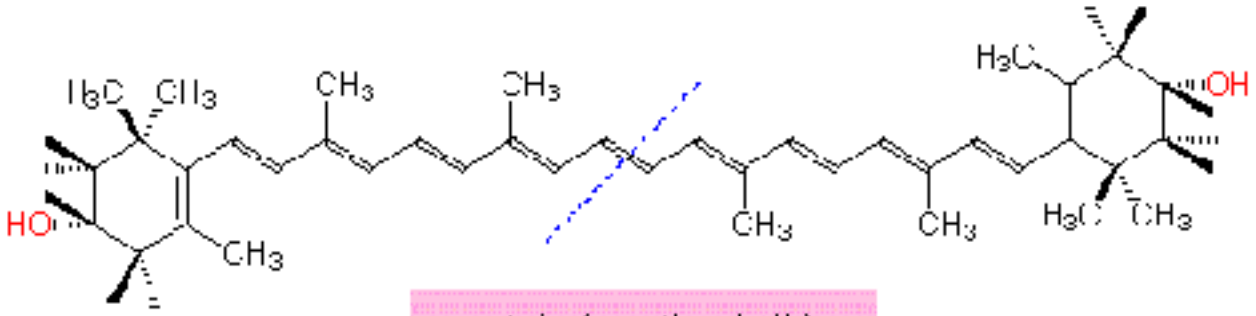
Lo special pair del centro di reazione è normalmente composto da una coppia di molecole di clorofilla a, tranne in alcuni casi come il già citato cianobatterio *Acaryochloris marina*.

Oltre alle clorofille, ci sono poi altri pigmenti accessori, che sono i carotenoidi e le ficobiline. Questi hanno il ruolo aiutare le clorofille a intercettare diverse lunghezze d'onda, ampliando il range di assorbimento dei sistemi antenna dei fotosistemi.
I carotenoidi hanno però anche un ruolo fondamentale nel prevenire danni fotossidativi alle molecole di clorofilla.
Nei cloroplasti sono presenti normalmente due tipi di carotenoidi: i caroteni e le xantofille.





β – carotene



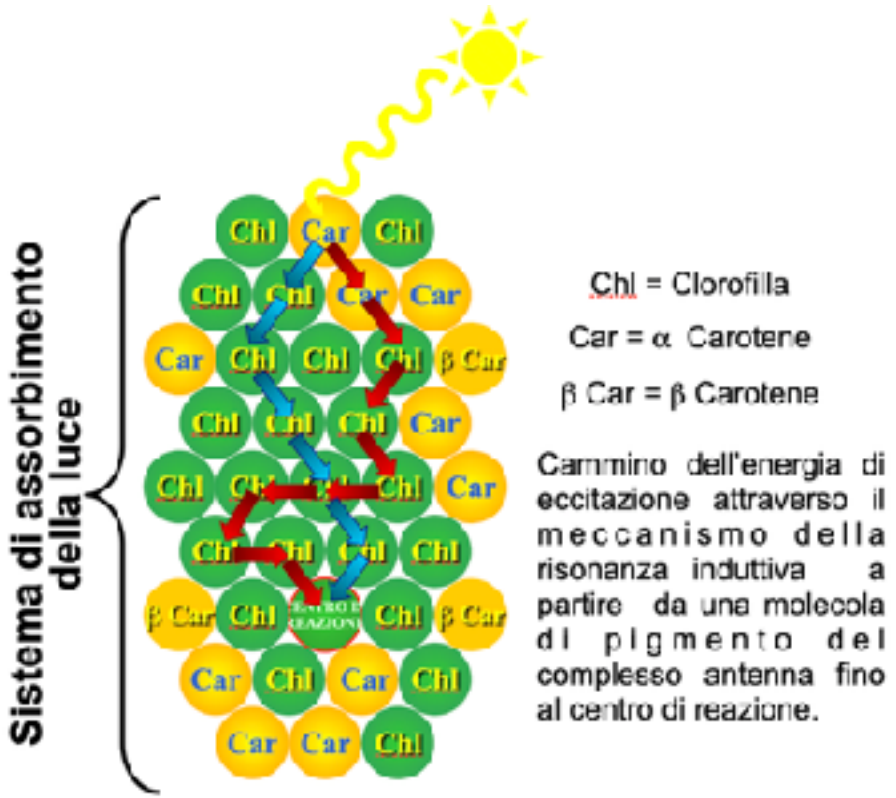
utein (xanthophyll)



Il beta carotene è la principale fonte di vitamina A, o retinolo, necessaria per l'uomo e per molti altri animali.

Nelle foglie il colore dei carotenoidi è di solito mascherato alle clorofille, fuorché nelle caducifoglie in autunno, quando la degradazione delle clorofille lascia ce questo divenga evidente.

Le ficobiline non sono universalmente presenti, ma si trovano solo in cianobatteri e alghe rosse.

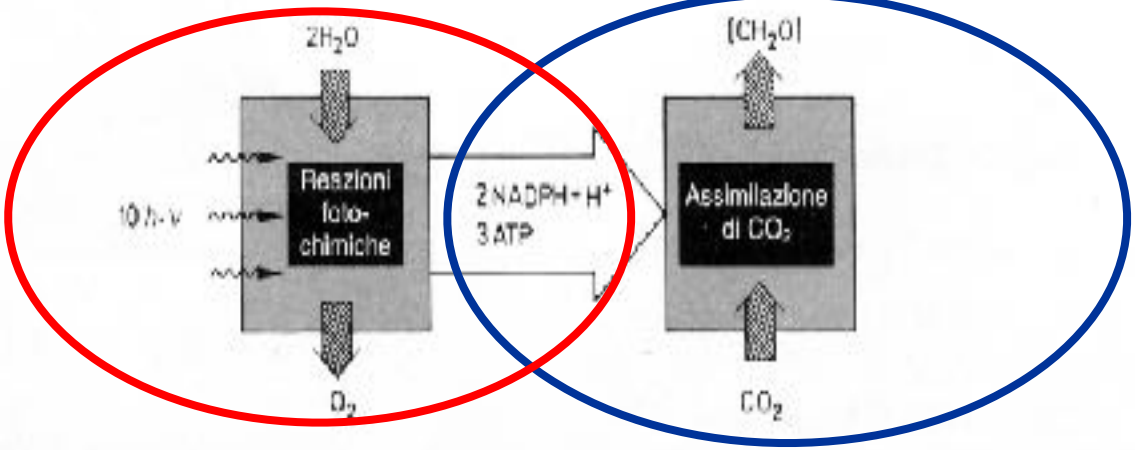




Fotosintesi: la fase “luminosa”

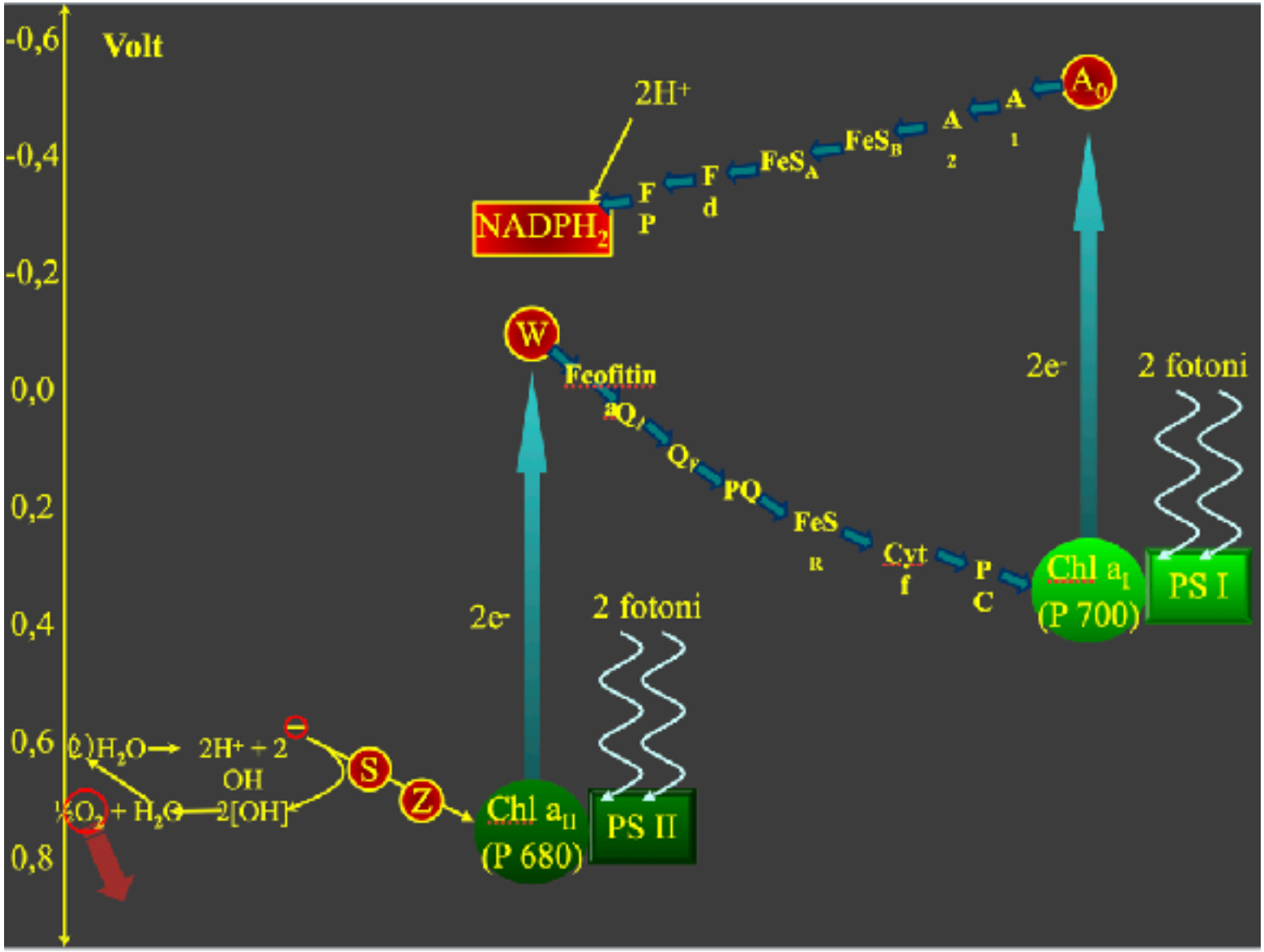


FASE LUMINOSA **FASE OSCURA**



Dipendenza dell'assimilazione fotosintetica di CO_2 dall'apporto di NADPH + H^+ e di ATP a partire da reazioni fotochimiche. Il consumo di 10 fotoni si spiega per il fatto che 8 fotoni vengono impiegati per la produzione di 2 NADPH + H^+ e di 2 ATP attraverso il trasporto non ciclico di elettroni, e che 2 fotoni ancora sono impiegati per produrre 1 ATP attraverso il trasporto ciclico degli elettroni.




Volt
-0,6
-0,4
-0,2
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
2H+
NADPH2
FP
Fd
FeSA
FeSB
A2
A1
A0
W
Feofitin
aQ
Q
PQ
FeS R
Cyt f
PC
Chl a I (P 700)
PS I
2e-
2 fotoni
2e-
2 fotoni
(2)H2O → 2H+ + 2 OH
½O2 + H2O → 2[OH]
S
Z
Chl a II (P 680)
PS II

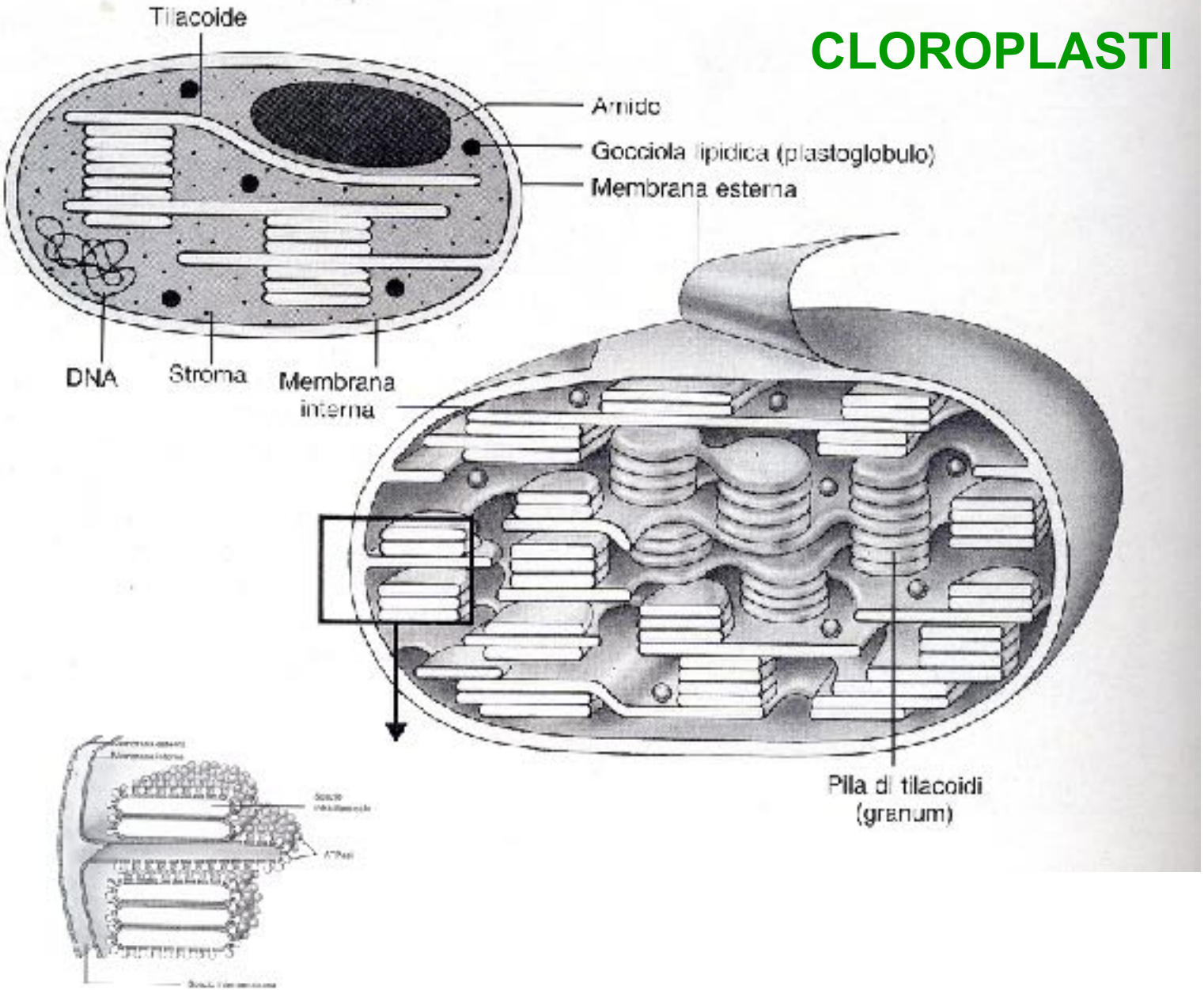


Dove avvengono questi fenomeni?

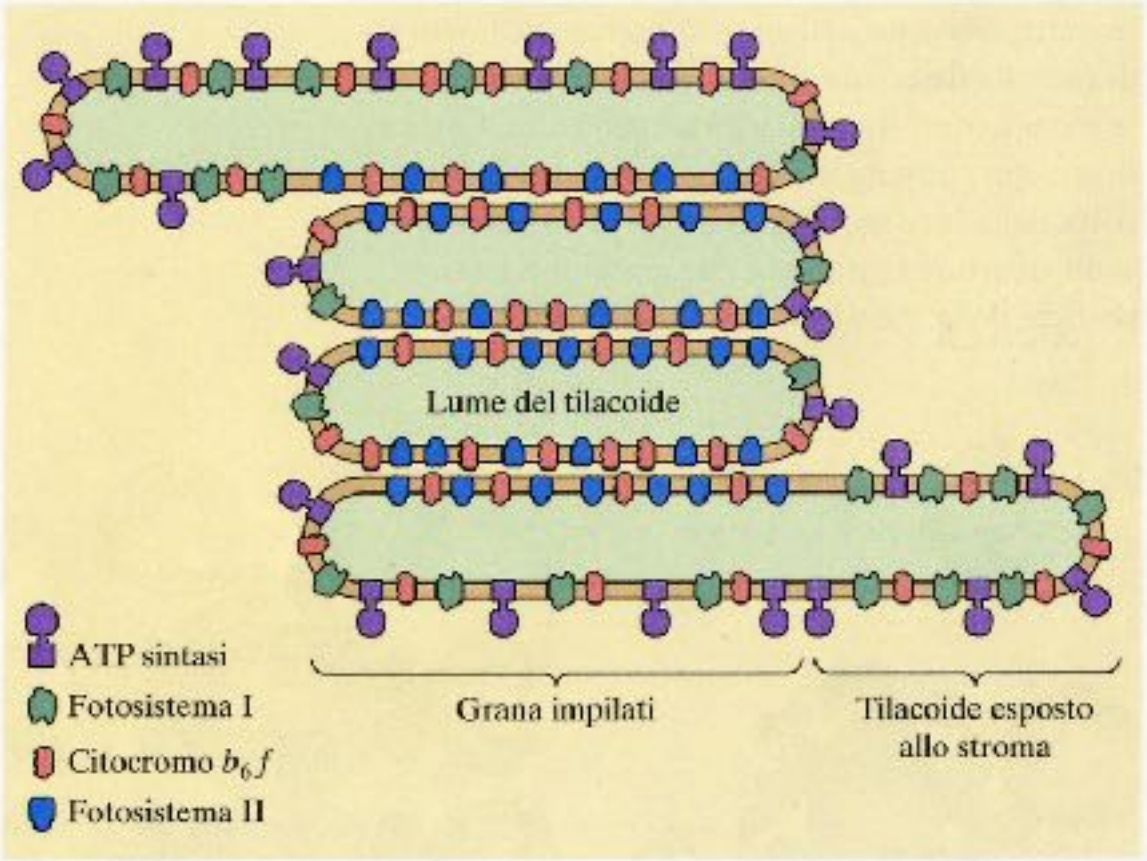
- Riduzione del $NADP^+$: a livello dello stroma
- Le catene REDOX e i fotosistemi che assorbono l'energia luminosa sono parti integranti delle membrane tilacoidali
- FOTOLISI dell'ACQUA: negli spazi intratilacoidali ("dentro i tilacoidi")



CLOROPLASTI



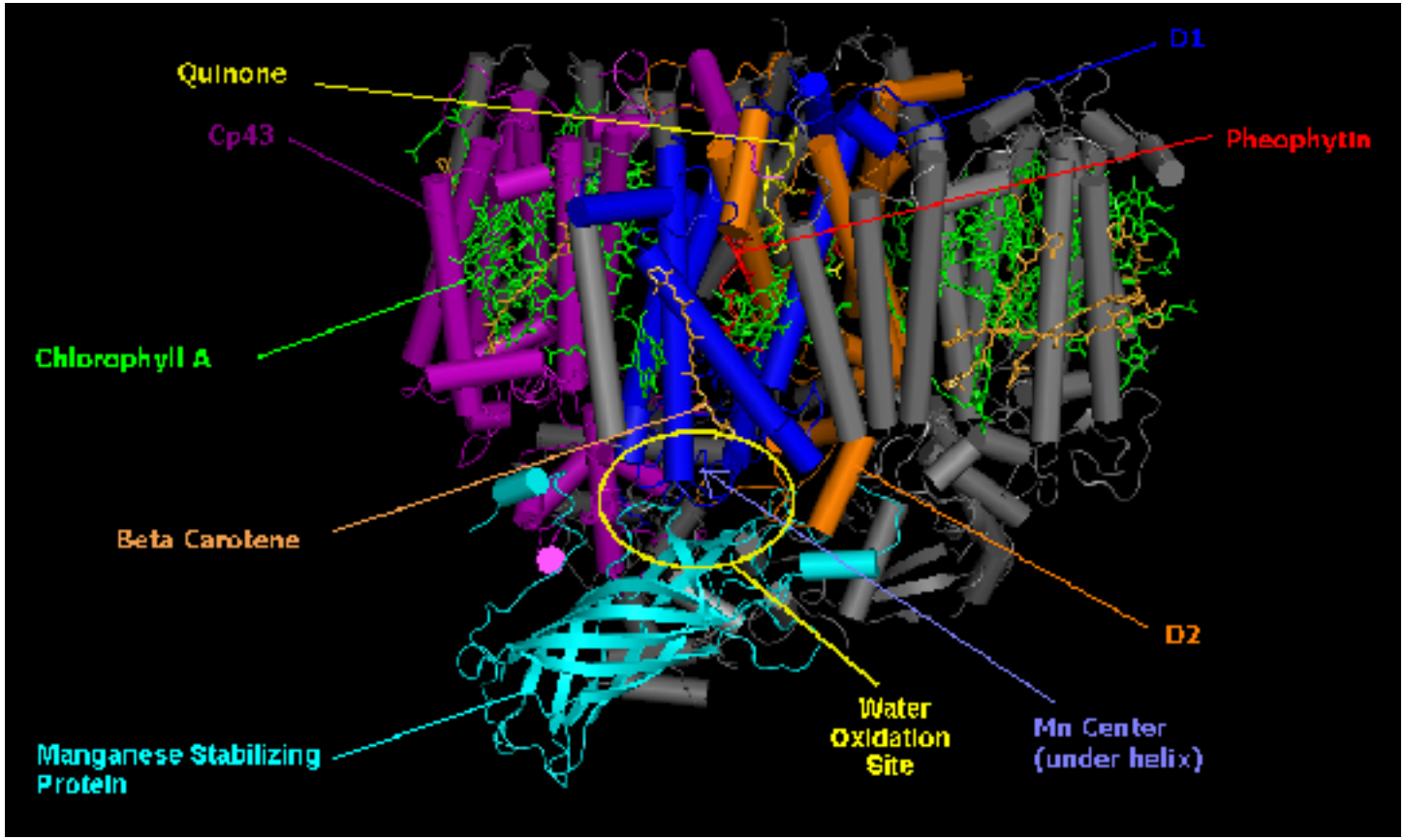




L'eterogeneità laterale dei complessi della membrana del cloroplasto. Il PSII è localizzato soprattutto nelle regioni impilate delle membrane tilacoidali, mentre il PSI e l'ATPasi sono localizzate quasi esclusivamente nelle membrane non impilate. Il complesso del citocromo b_6f è distribuito equamente attraverso le due regioni. La separazione dei fotosistemi necessita di trasportatori elettronici mobili come il plastochinone e la plastocianina, che trasportano gli elettroni tra i complessi della membrana separati spazialmente.



Fotosistema II





Il fotosistema II è il solo capace di ossidare l'ossigeno dell'acqua (fotolisi), e quindi di estrarre da essa elettroni, che poi verranno usati anche dal fotosistema I, fino a ridurre il NADP+ a NADPH.

Il nome è dovuto al fatto che è stato il secondo fotosistema a essere scoperto.

Nel suo centro di reazione, formato da un omodimero di clorofilla a, la carica positiva dovuta alla perdita di un elettrone è spostata principalmente su una delle due molecole, e non ripartita equamente su tutti e due. Di conseguenza il potenziale ossidativo di questa molecola è molto elevato, e sembra sia questo che permette l'ossidazione dell'ossigeno.

Il complesso di evoluzione dell'ossigeno (*oxigen evolving complex*) non è ancora stato chiarito in tutte le sue parti, per cui il meccanismo esatto è ancora in parte sconosciuto.



Il fotosistema II trasferisce quindi gli elettroni al fotosistema I tramite una cascata di accettori, il primo dei quali è la feofitina. Gli elettroni vengono poi trasferiti a dei plastochinoni, alla ferridossina, transitano per il complesso del Citocromo b/f, pompando protoni all'interno del lume tilacoidale, per poi fluire alla Plastocianina, e quindi diventare disponibili per il fotosistema I. Il trasporto degli elettroni è necessario perché fotosistema II e I non sono attigui nella membrana tilacoidale.

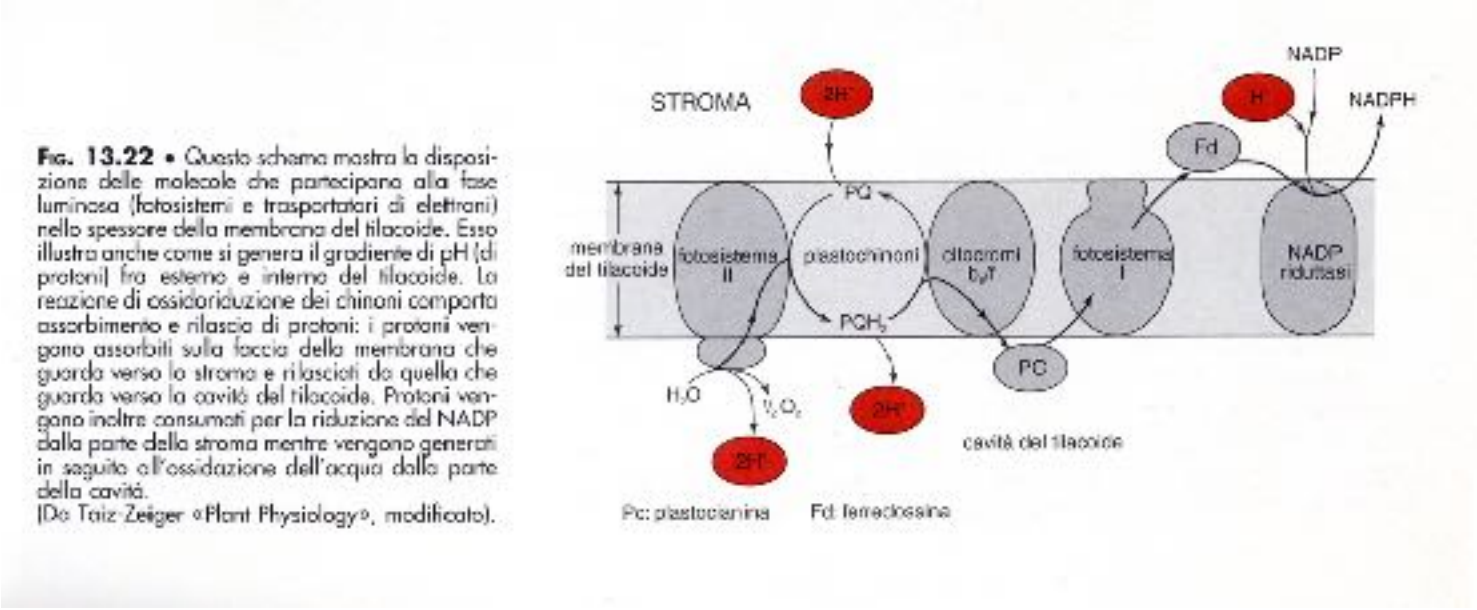
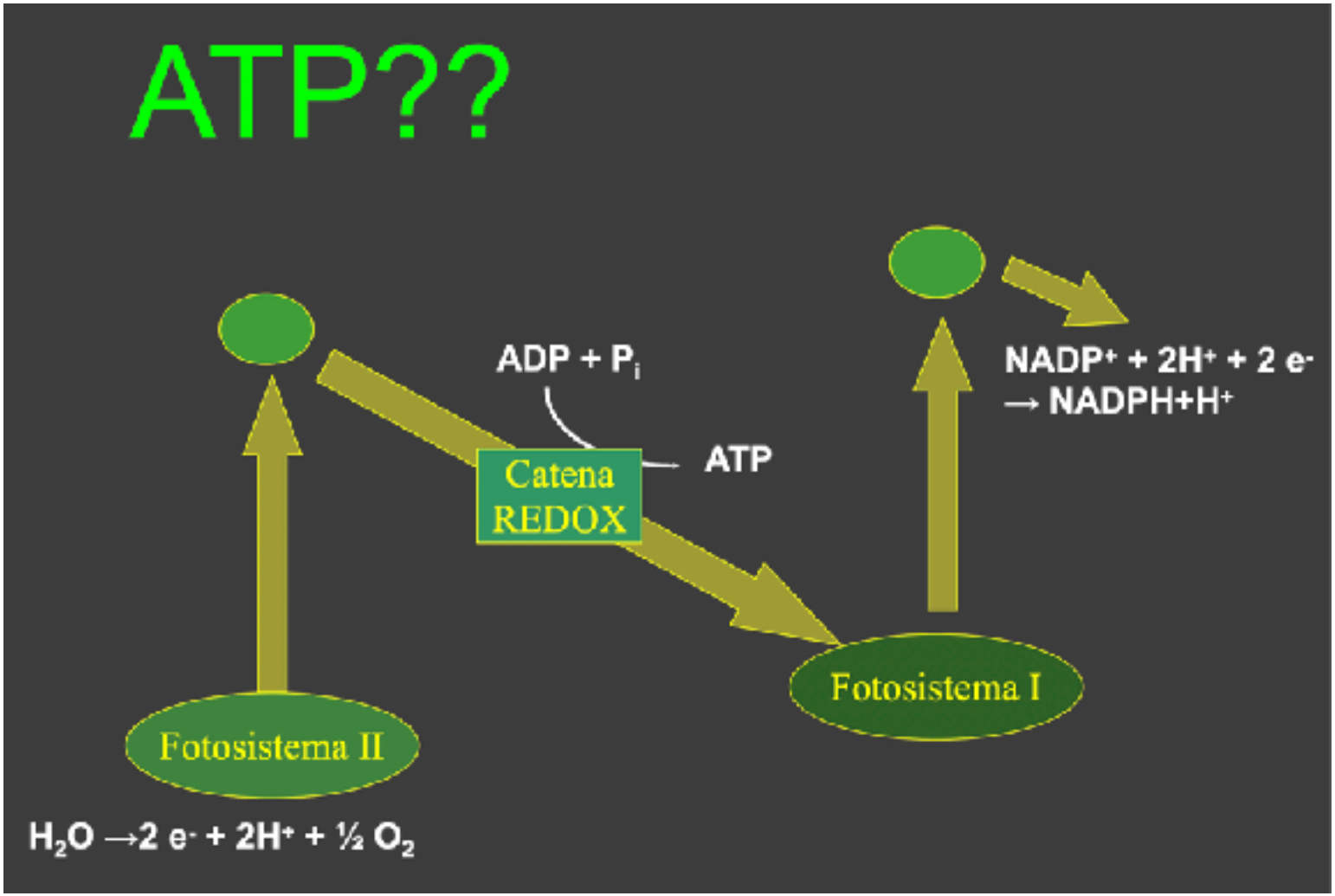


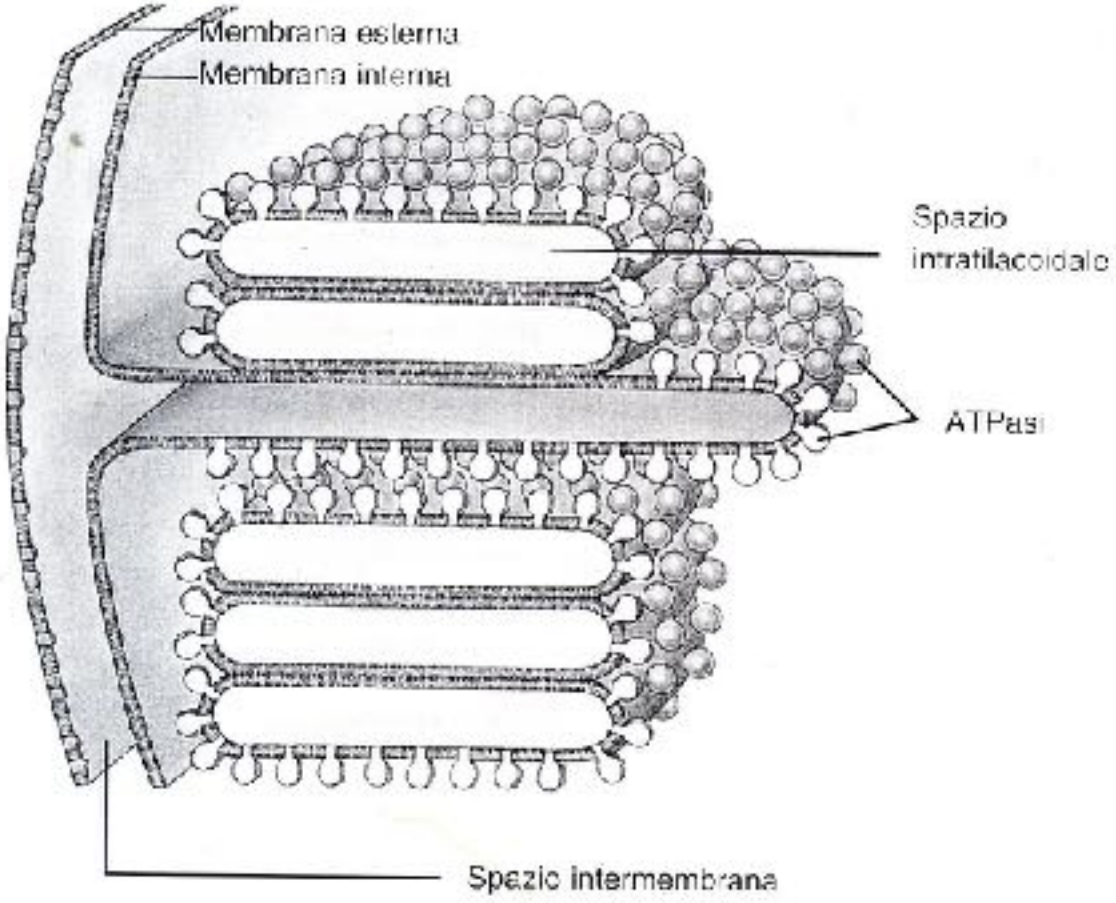
Fig. 13.22 • Questo schema mostra la disposizione delle molecole che partecipano alla fase luminosa (fotosistemi e trasportatori di elettroni) nello spessore della membrana del tilacoide. Esso illustra anche come si genera il gradiente di pH (di protoni) fra esterno e interno del tilacoide. La reazione di ossidoriduzione dei chinoni comporta assorbimento e rilascio di protoni: i protoni vengono assorbiti sulla faccia della membrana che guarda verso lo stroma e rilasciati da quella che guarda verso la cavità del tilacoide. Protoni vengono inoltre consumati per la riduzione del NADP dalla parte dello stroma mentre vengono generati in seguito all'ossidazione dell'acqua dalla parte della cavità.
(Da Taiz-Zeiger «Plant Physiology», modificato).




ATP??
ADP + P_i
ATP
Catena REDOX
$NADP^+ + 2H^+ + 2\ e^-$
$\rightarrow NADPH+H^+$
Fotosistema I
Fotosistema II
$H_2O \rightarrow 2\ e^- + 2H^+ + ½\ O_2$



Formazione dell'ATP





Ipotesi

“chemio-osmotica”

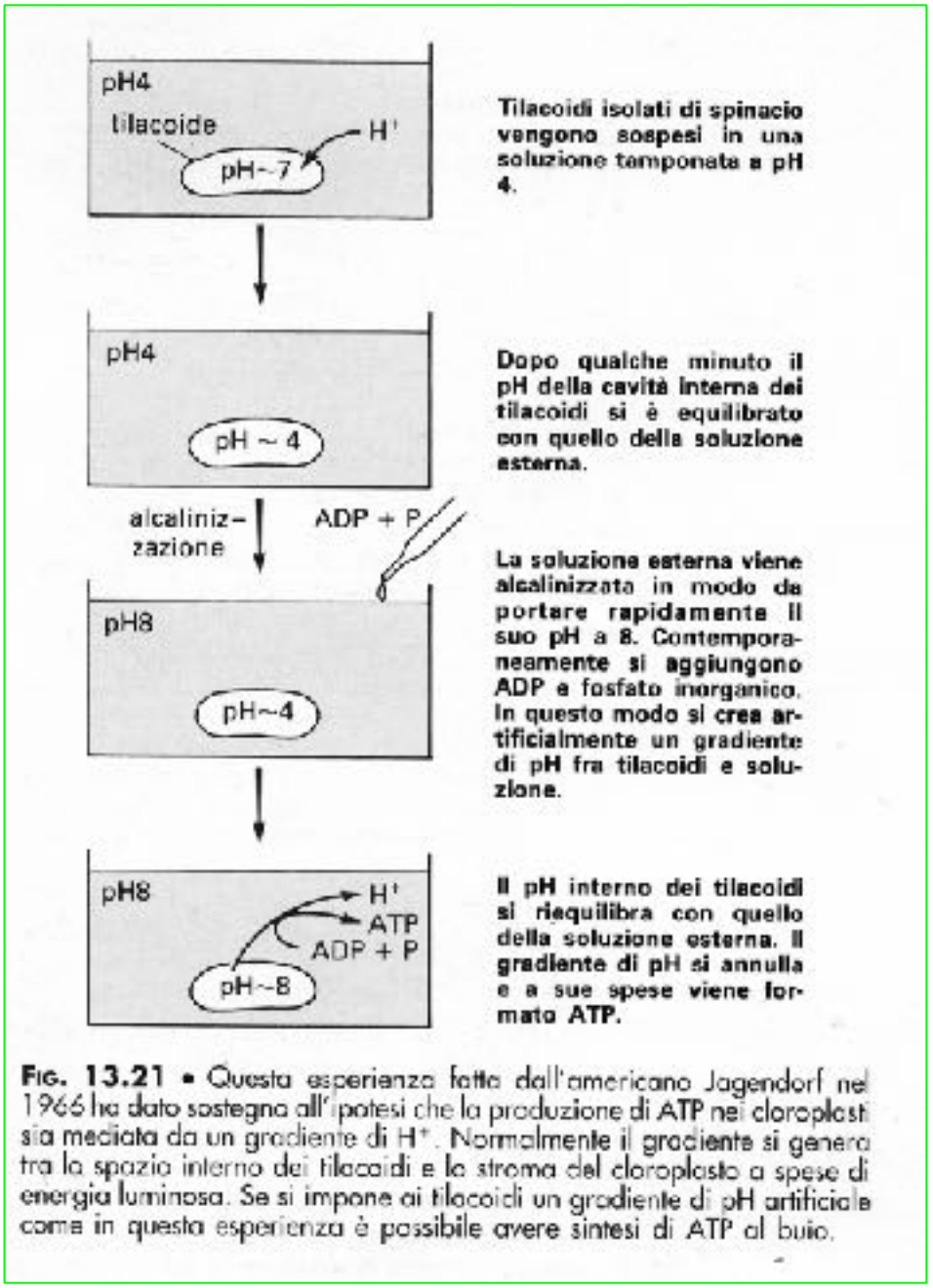


Fig. 13.21 • Questa esperienza fatta dall'americano Jagendorf nel 1966 ha dato sostegno all'ipotesi che la produzione di ATP nei cloroplasti sia mediata da un gradiente di H^+. Normalmente il gradiente si genera tra lo spazio interno dei tilacoidi e lo stroma del cloroplasto a spese di energia luminosa. Se si impone ai tilacoidi un gradiente di pH artificiale come in questa esperienza è possibile avere sintesi di ATP al buio.



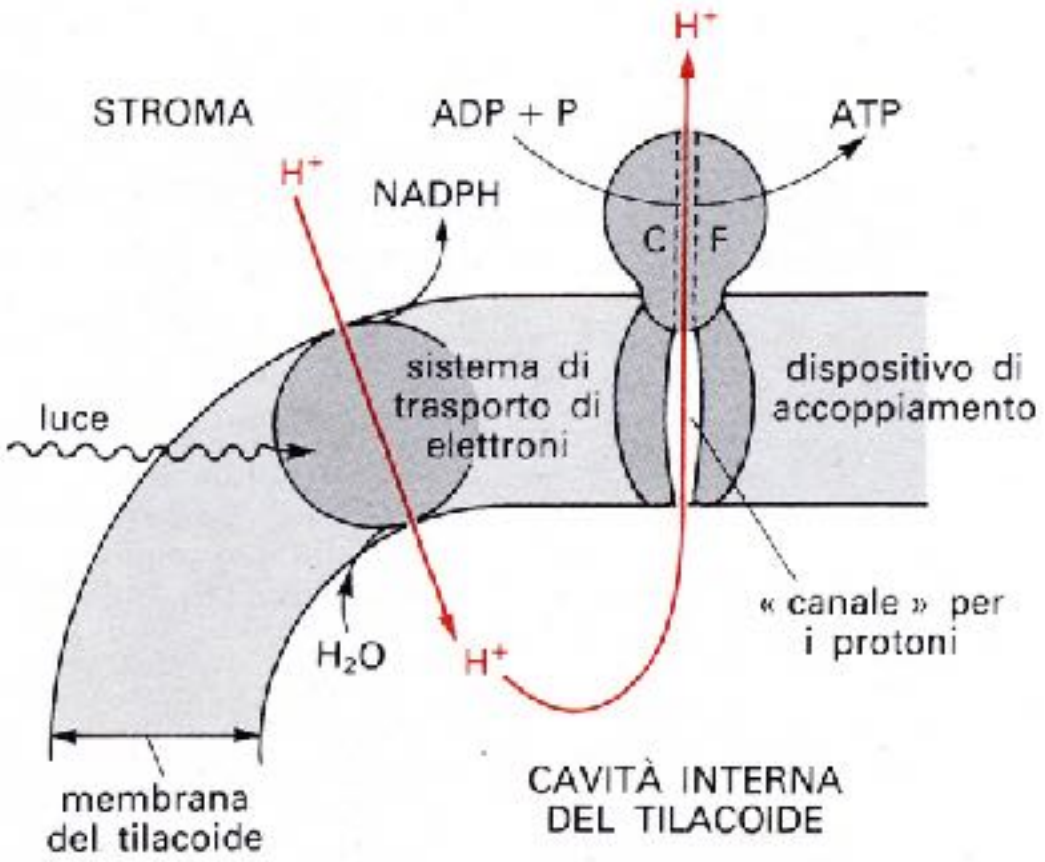


FIG. 13.23 • Nelle membrane dei tilacoidi è contenuta l'ATP sintasi, una «macchina» molecolare per accoppiare il gradiente di protoni alla sintesi di ATP. Di questa «macchina» fa parte un grosso complesso di proteine chiamato CF_1 che sporge sulla faccia esterna della membrana. Questo complesso isolato in provetta catalizza l'idrolisi dell'ATP, ma inserito nel tilacoide illuminato ne catalizza la sintesi.
(Per l'accoppiamento fra gradiente di protoni e sintesi di ATP vedi anche la fig. 5-17).



La formazione dell'ATP è quindi legata all'instaurarsi di un gradiente protonico tra le vescicole tilacoidali chiuse e lo stroma.

Fino a quando il gradiente sussiste, le ATP-sintasi di membrana, usando il flusso di protoni in uscita, possono formare ATP che si concentra a livello stromatico.

Cosa genera il gradiente? Sono tre fenomeni spesso concomitanti.

(1) la fotolisi dell'acqua all'interno dello spazio intratilacoidale, che genera H^+;

(2) la riduzione del $NADP^+$ nello stroma, che si accompagna ad una riduzione di H^+ presenti a livello stromatico;

(3) il trasporto attivo di H^+ dallo stroma verso l'interno dello spazio intratilacoidale per opera dei PQ (PLASTOCHINONI).



La produzione dell'**ATP** non è quindi un processo ossidoriduttivo, ma è comunque legato ai fenomeni ossidoriduttivi precedentemente descritti.

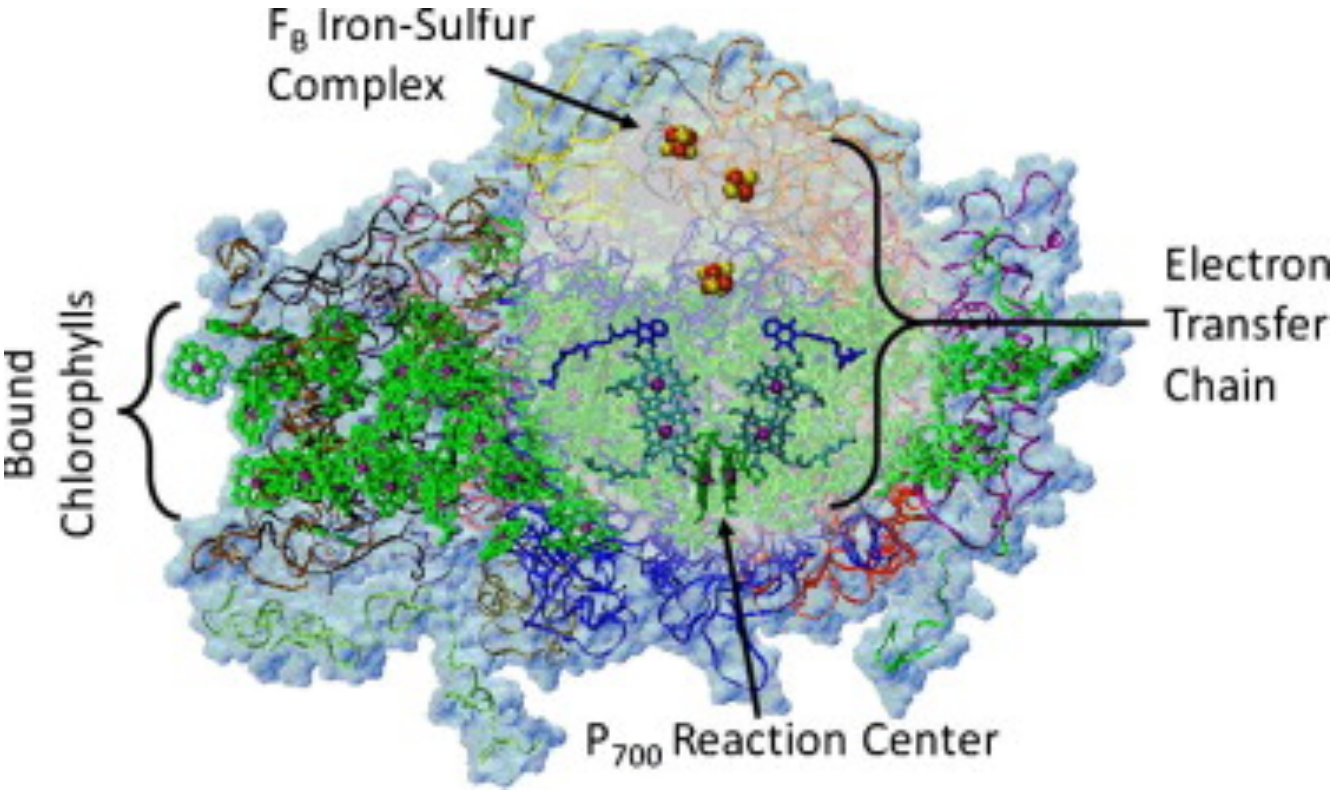
Per avvenire deve essere creato un gradiente di concentrazione di protoni **[H^+]** tra spazio intratilacoidale e stroma.

Tutto ciò che crea tale gradiente permette il funzionamento delle ATP-sintasi di membrana, che producono ATP a partire da ADP e P_i usando un efflusso di protoni in uscita dallo spazio intratilacoidale.

Va rimarcato che la fotofosforillazione non ciclica da sola non è in grado di produrre tutti i materiali necessari a supportare le reazioni della fase oscura.



Fotosistema I





Il fotosistema I non svolge la fotolisi dell'acqua.

Quindi, nella **fotofosforillazione non ciclica**, gli elettroni che le clorofille del centro di reazione passano alla catena che conduce alla riduzione del NADP+ devono provenire da qualche altra parte. Nel caso dell'accoppiamento con il fotosistema II, ovviamente, gli elettroni sono prodotti dalla fotolisi dell'acqua.

Tuttavia, il fotosistema I è anche in grado di produrre ATP in un processo definito **fotofosforillazione ciclica**, che prevede un "riciclo" degli elettroni, senza la necessità di attingere a quelli prodotti dalla fotolisi dell'acqua.

Il fotosistema I è composto, come il II, da proteine strutturali, un complesso antenna, e un centro di reazione. Manca ovviamente il centro di ossidazione dell'acqua.
Il complesso antenna contiene clorofille e carotenoidi, che trasferiscono l'energia, andando a eccitare le clorofille del centro di reazione. Queste trasferiscono elettroni a un accettare primario, che in questo caso è una molecola modificata di Chl a, detta a0, mentre nel PS II era la feofitina.

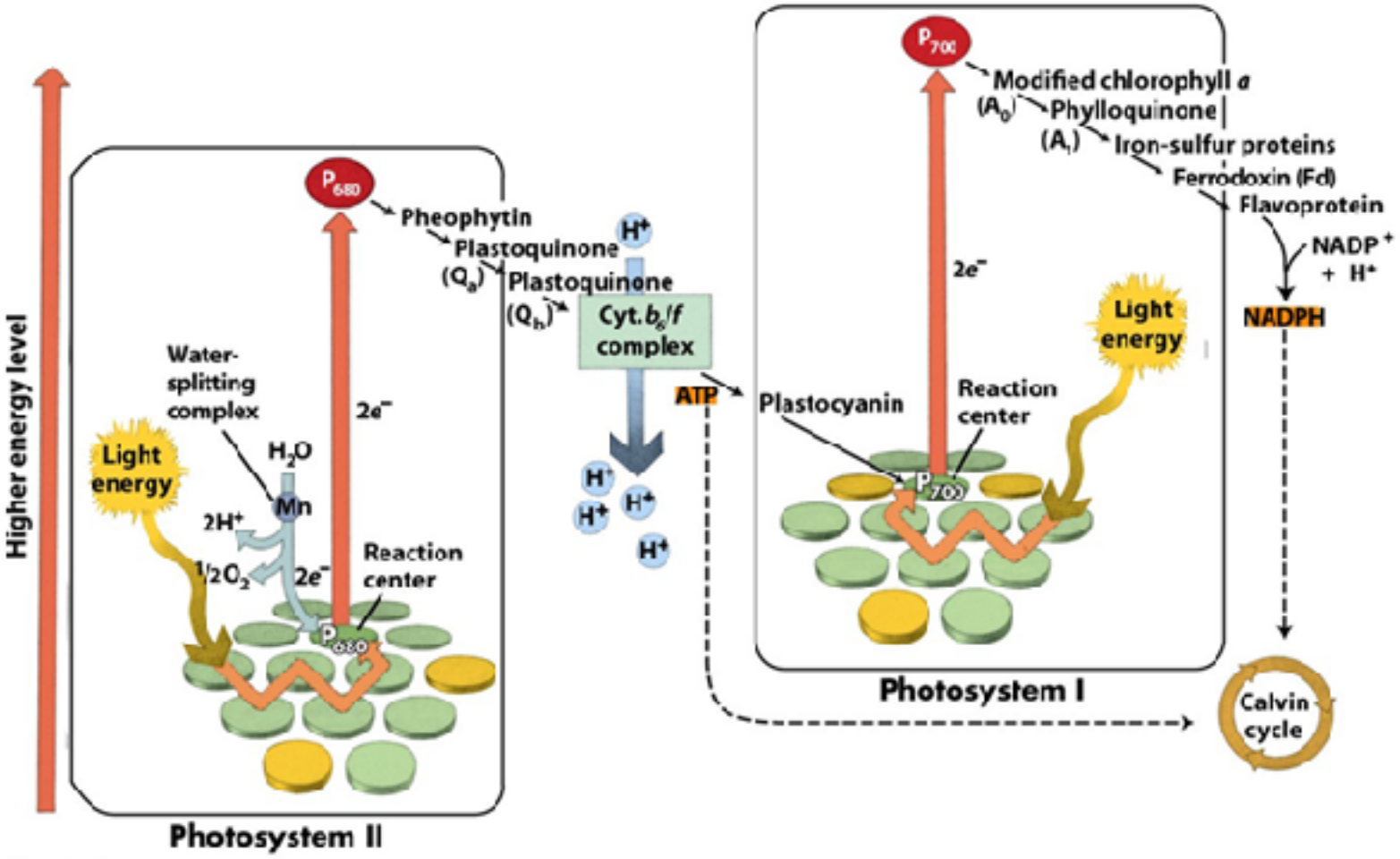


Il centro di reazione del PS I è formato da due molecole di Chl a con massimo di assorbimento a 700 nanometri. Ogni fotone proveniente dal complesso antenna eccita un elettrone. Gli elettroni vengono trasferiti alle molecole di accettore primario in coppia.

Il secondo accettore di elettroni della cascata che conduce alla riduzione del NADP+ a NADPH+H è il fillochinone A1, noto anche come vitamina K1. Questi ossida la Chl a0, rendendola disponibile a accettare altri elettroni dal centro di reazione.
Passa poi gli elettroni a una cascata di centri di reazione ferro-zolfo, che li incanalano poi alla ferrodossina.

La funzione principale della ferrodossina è quindi quella di trasportare un elettrone dai centri di reazione ferro-zolfo a un enzima, la ferridossina-NADP+ riduttasi, che, come dice il nome, riduce il NADP+.




Higher energy level
P680
Pheophytin
Plastoquinone (Qa)
Plastoquinone (Qb)
H+
Cyt. b6/f complex
Water-splitting complex
H2O
Mn
2H+
1/2O2
2e−
Light energy
Reaction center
P680*
2e−
H+
Photosystem II
ATP
P700
Modified chlorophyll a (A0)
Phylloquinone (A1)
Iron-sulfur proteins
Ferredoxin (Fd)
Flavoprotein
NADP+ + H+
NADPH
Light energy
Plastocyanin
Reaction center
P700*
Photosystem I
Calvin cycle



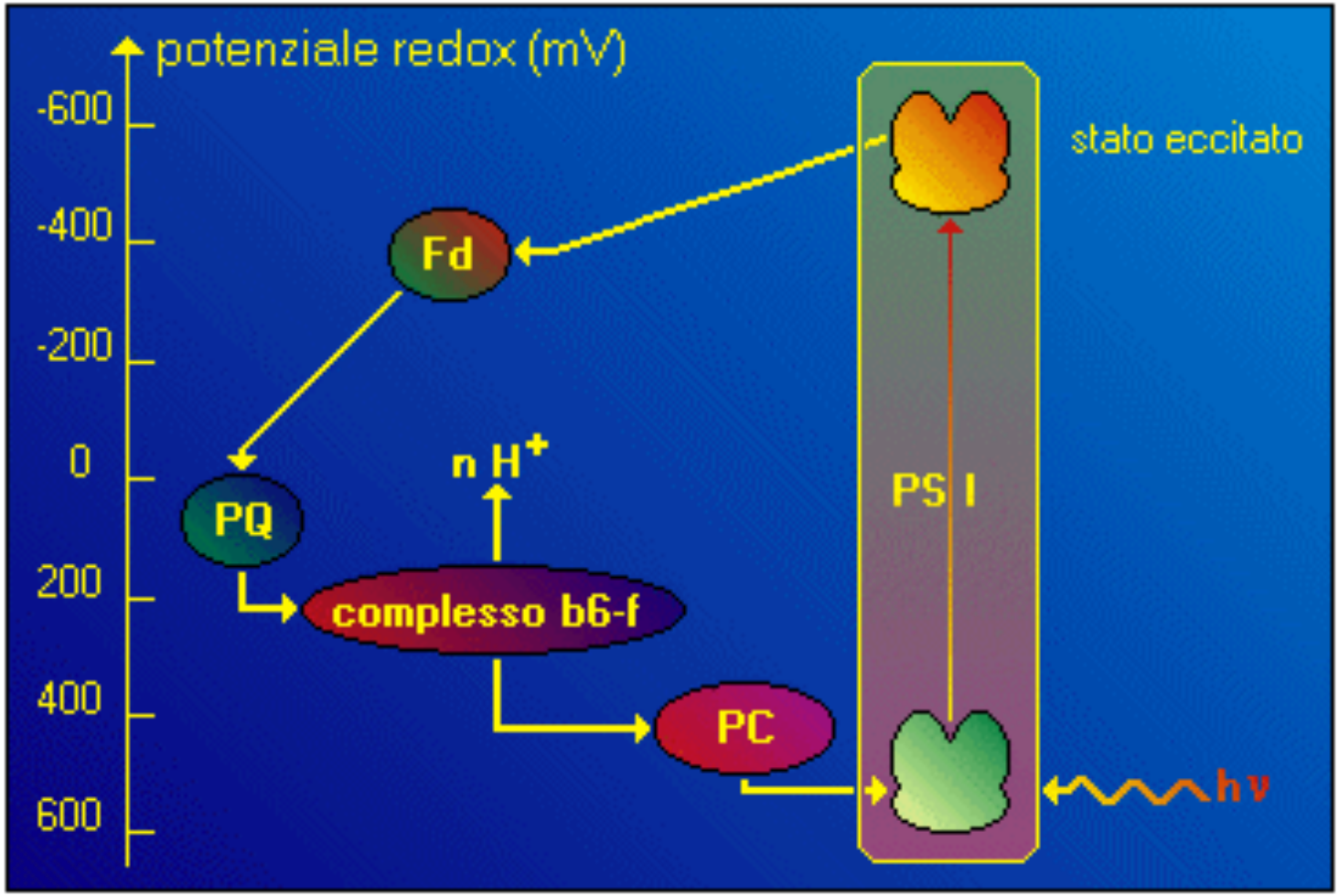
Esiste una via alternativa alla **via Z**, per gli elettroni che arrivano dal centro di reazione **P700** del **fotosistema I**, che aumenta la versatilità della fotosintesi.

L'elettrone ad alto potenziale della **ferrodossina Fd** può essere trasferito al **citocromo bf** (invece che a **$NADP^+$**) e ritornare alla forma ossidata del **P700** attraverso la **plastocianina PC**.

Il flusso di elettroni determina solo il trasferimento di **H^+** nel lume tilacoidale da parte del citocromo. In questo processo viene generato **ATP** senza la formazione contemporanea di **NADP**.

Il **fotosistema II** non partecipa alla fotofosforilazione ciclica; questa avviene quando non vi è più **$NADP^+$** per accettare elettroni dalla ferrodossina ridotta.



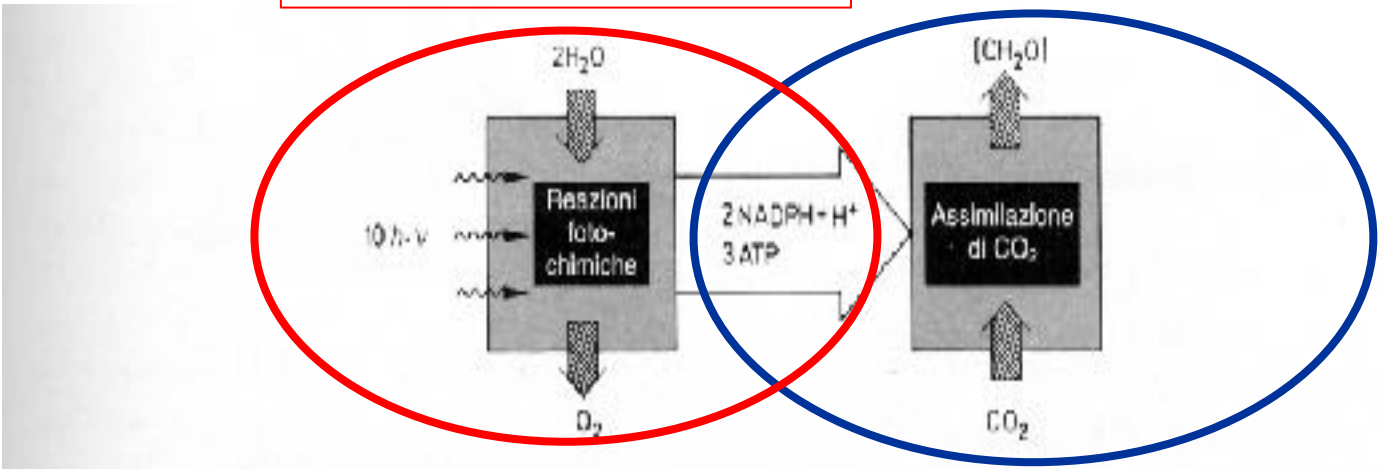

potenziale redox (mV)
-600
-400
-200
0
200
400
600
stato eccitato
Fd
PQ
n H+
complesso b6-f
PC
PS I
hv



La fotofosforillazione ciclica produce il quantitativo di ATP "mancante" dalla fotofosforillazione non ciclica per alimentare la fase oscura.

Come visto, questa richiede 2 NADPH e 3 ATP per ridurre un atomo di carbonio, mentre la sola fotofosforillazione non ciclica produce 2 NADPH e 2 ATP.

FASE LUMINOSA **FASE OSCURA**



Dipendenza dell'assimilazione fotosintetica di CO_2 dall'apporto di NADPH + H^+ e di ATP a partire da reazioni fotochimiche. Il consumo di 10 fotoni si spiega per il fatto che 8 fotoni vengono impiegati per la produzione di 2 NADPH + H^+ e di 2 ATP attraverso il trasporto non ciclico di elettroni, e che 2 fotoni ancora sono impiegati per produrre 1 ATP attraverso il trasporto ciclico degli elettroni.



Fase “oscura”



Nella fase oscura sono predominanti reazioni biochimiche, catalizzate da enzimi.

Queste sono temperatura – sensibili, e vengono a cessare sopra i 45°C a causa della denaturazione degli stessi.

Alcuni di questi enzimi devono essere attivati dalla luce (al buio non funzionano!).

Il processo continua fino a quando ci sono a disposizione i vari substrati: la CO_2, l'ATP e il $NADPH + H^+$ e un substrato organico «energicizzato» da gruppi fosfato.

Il tutto avviene nello STROMA, dove i prodotti finali si accumulano se i processi di "esportazione" sono più lenti di quelli di produzione.



Il cuore dalla fase oscura è un ciclo detto, dal nome del suo scopritore, **Melvin Calvin**, premio nobel nel 1961, **ciclo di Calvin**.





Le **reazioni della fase oscura** portano alla **riduzione biochimica** della **CO_2** a **carboidrati**.

Il processo, noto come "**fissazione**" o "**organicazione della CO_2**", è fondamentale per la biosfera: piante verdi e alghe producono ogni anno enormi quantità di sostanza organica (**produttività primaria**).

Le reazioni possono essere così riassunte:

$$6\,CO_2 + 12\,NADPH + 12\,H_2O + 18\,ATP \rightarrow$$

$$\rightarrow C_6H_{12}O_6 + 12\,NADP^+ + 18\,ADP + 18P_i + 6H^+$$

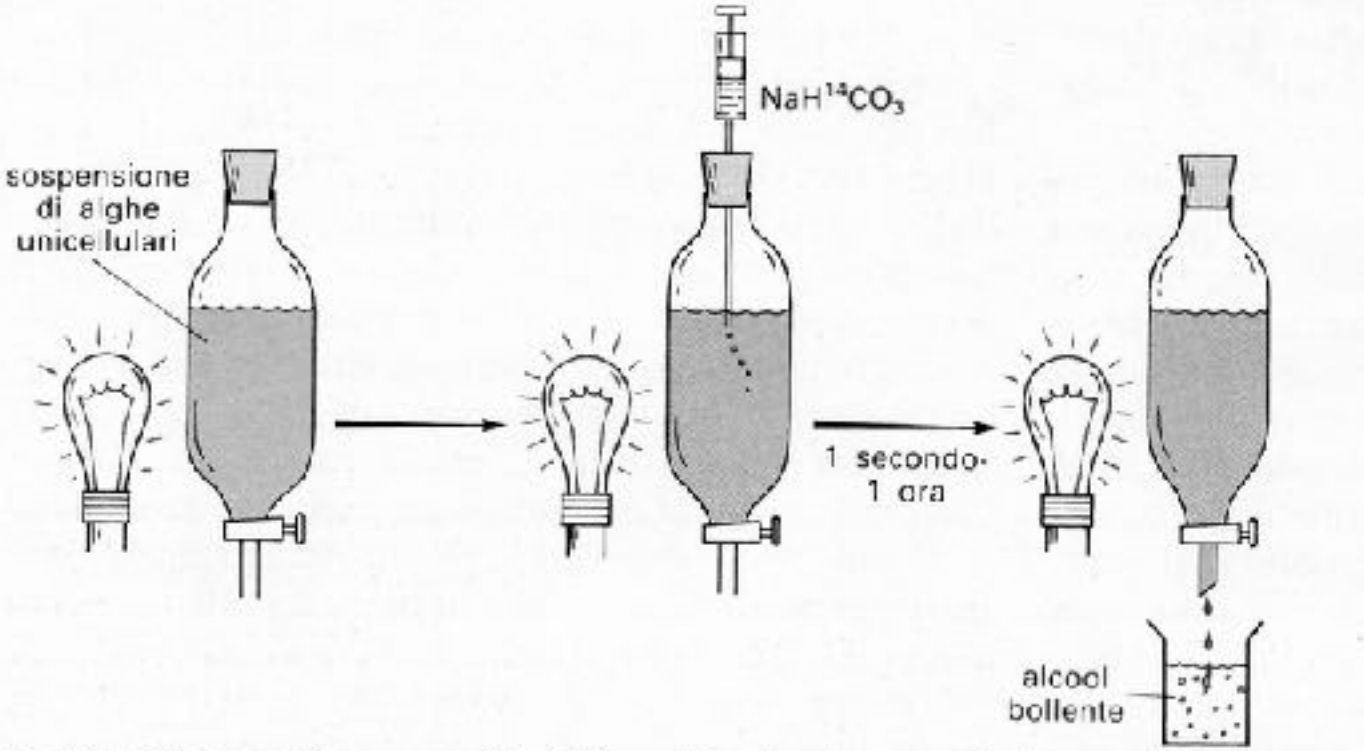
Carboidrato ridotto: viene in genere indicato un esoso, intendendo il glucosio (perché viene polimerizzato nell'amido primario)



La caratterizzazione delle reazioni e la determinazione delle varie tappe, ciò che viene oggi indicato con il nome di Ciclo di Calvin (-Benson), è il risultato di un enorme lavoro di equipe di un gruppo di 300 scienziati americani che aveva al suo interno i migliori specialisti dei diversi campi, che poterono usare tecnologie allora di assoluta avanguardia.

Siamo negli anni ’50, la II guerra mondiale è terminata da poco e ha messo a disposizione i radioisotopi, grazie allo studio dell’atomo.



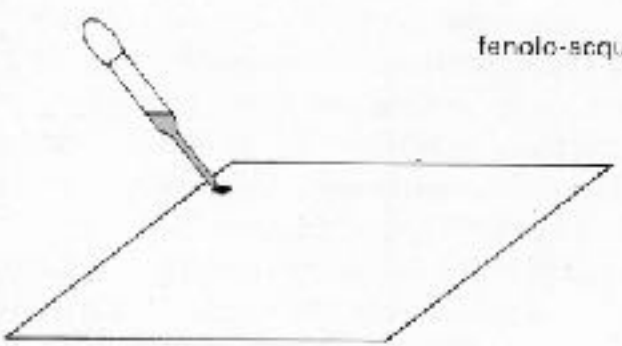


1 – Il recipiente contiene una sospensione di alghe verdi le quali fotosintetizzano usando la CO_2 atmosferica non radioattiva sciolta nell'acqua.

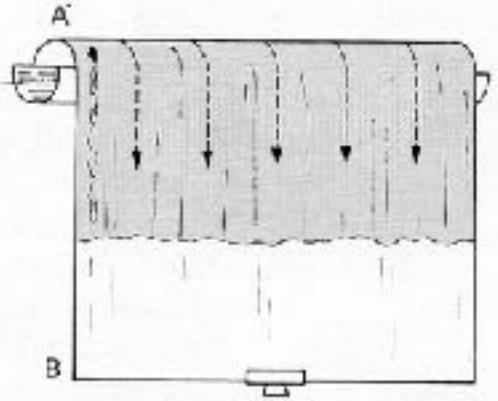
2 – Si immette nel recipiente una certa quantità di CO_2 radioattiva (sotto forma di $NaH^{14}CO_3$).

3 – Passato un certo intervallo dalla somministrazione di CO_2 radioattiva si apre il rubinetto. Una parte della sospensione cade nell'alcool bollente. I composti a piccola molecola contenuti nelle cellule (zuccheri, amminoacidi, ecc.) passano in soluzione nell'alcool. L'operazione viene ripetuta varie volte a diversi intervalli di tempo.

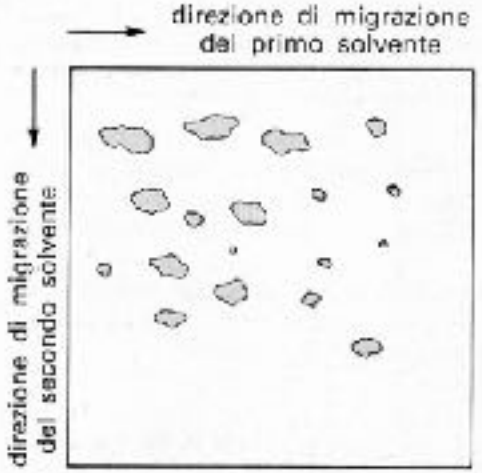




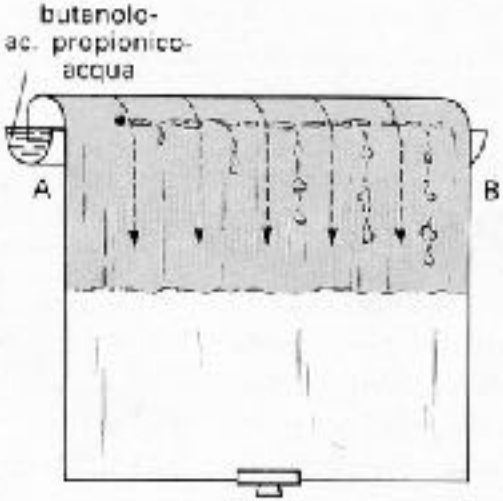
4 – Una piccola quantità dell'estratto alcoolico di alghe viene applicata vicino a un angolo di un foglio di carta cromatografica.



5 – Un lato del foglio pesca in una vaschetta contenente un solvente il quale migra lungo la carta trascinandosi dietro per diverse distanze le varie sostanze contenute nell'estratto, le quali in questo modo vengono parzialmente separate.

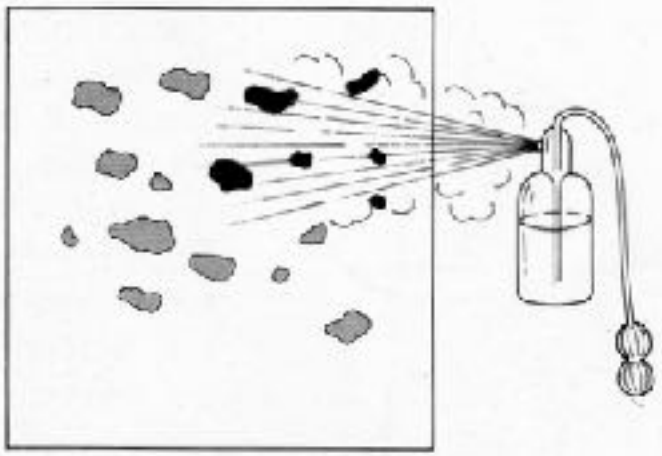


7 – Terminata la separazione cromatografica a ogni sostanza contenuta nell'estratto corrisponde una macchia in una determinata posizione. Ma tutte queste macchie sono praticamente invisibili.



6 – La separazione diventa totale con una seconda cromatografia in direzione perpendicolare alla prima. Il foglio, ruotato di 90°, pesca in un solvente diverso.





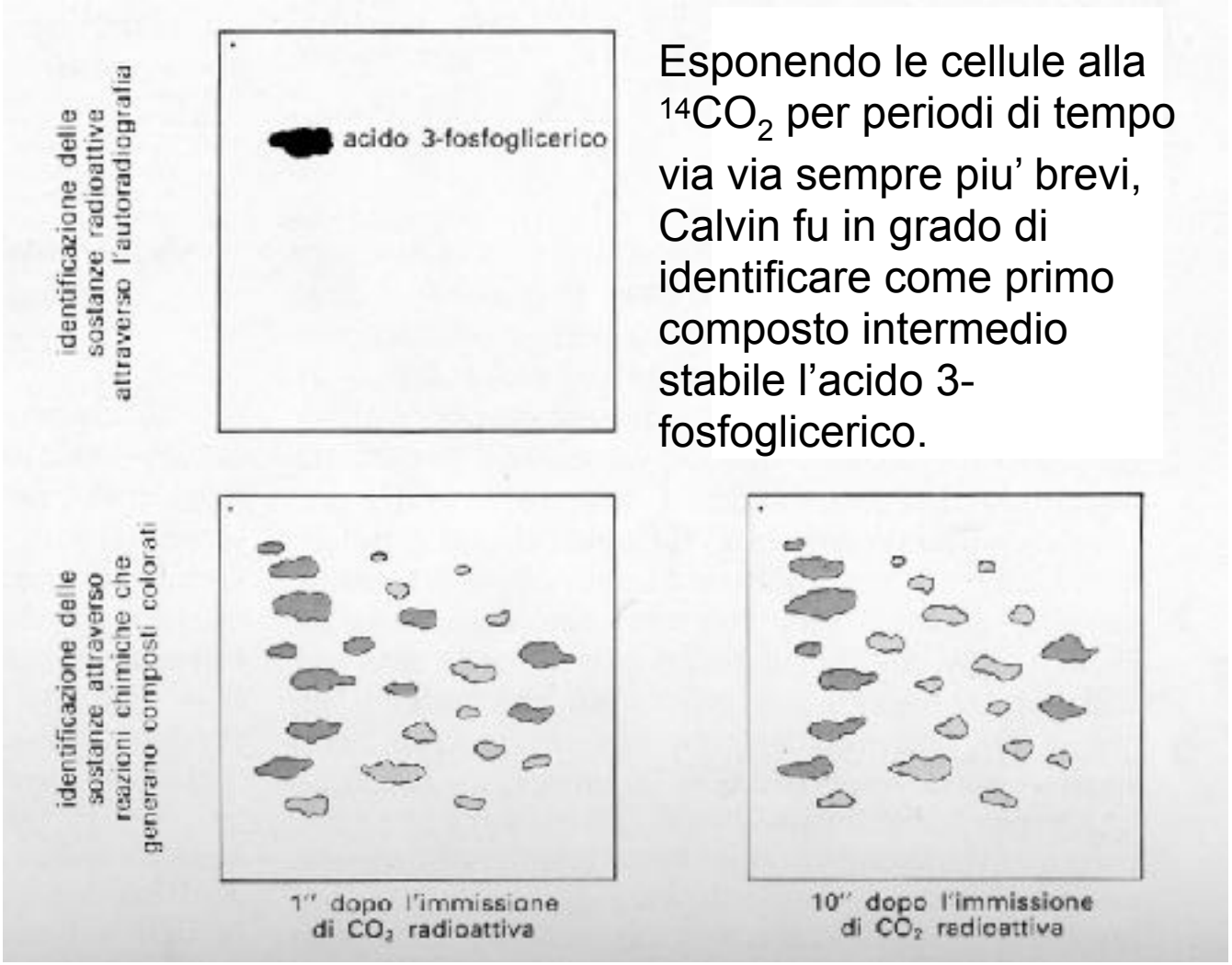
8 – Le macchie possono essere messe in evidenza spruzzando la carta con soluzioni di particolari sostanze che reagiscono con i vari tipi di composti dando origine a prodotti colorati. Le macchie vengono identificate cromatografando sostanze note nelle stesse condizioni sperimentali. In questo modo si possono identificare praticamente tutti i composti separati.



9 – Alternativamente il foglio di carta cromatografica viene coperto con una lastra fotografica e lasciato al buio per alcune settimane. Le radiazioni emesse dal ^{14}C incorporato nei vari composti impressionano la lastra che viene poi sviluppata. Il questo modo vengono messe in evidenza solo le sostanze che sono state sintetizzate DOPO l'immissione di CO_2 radioattiva.

I composti marcati con il ^{14}C vennero quindi separati e identificati a seconda della posizione che raggiungono in una cromatografia bidimensionale su carta. In questo modo, vennero identificati come intermedi del processo della fissazione numerosi acidi e zuccheri fosfati.

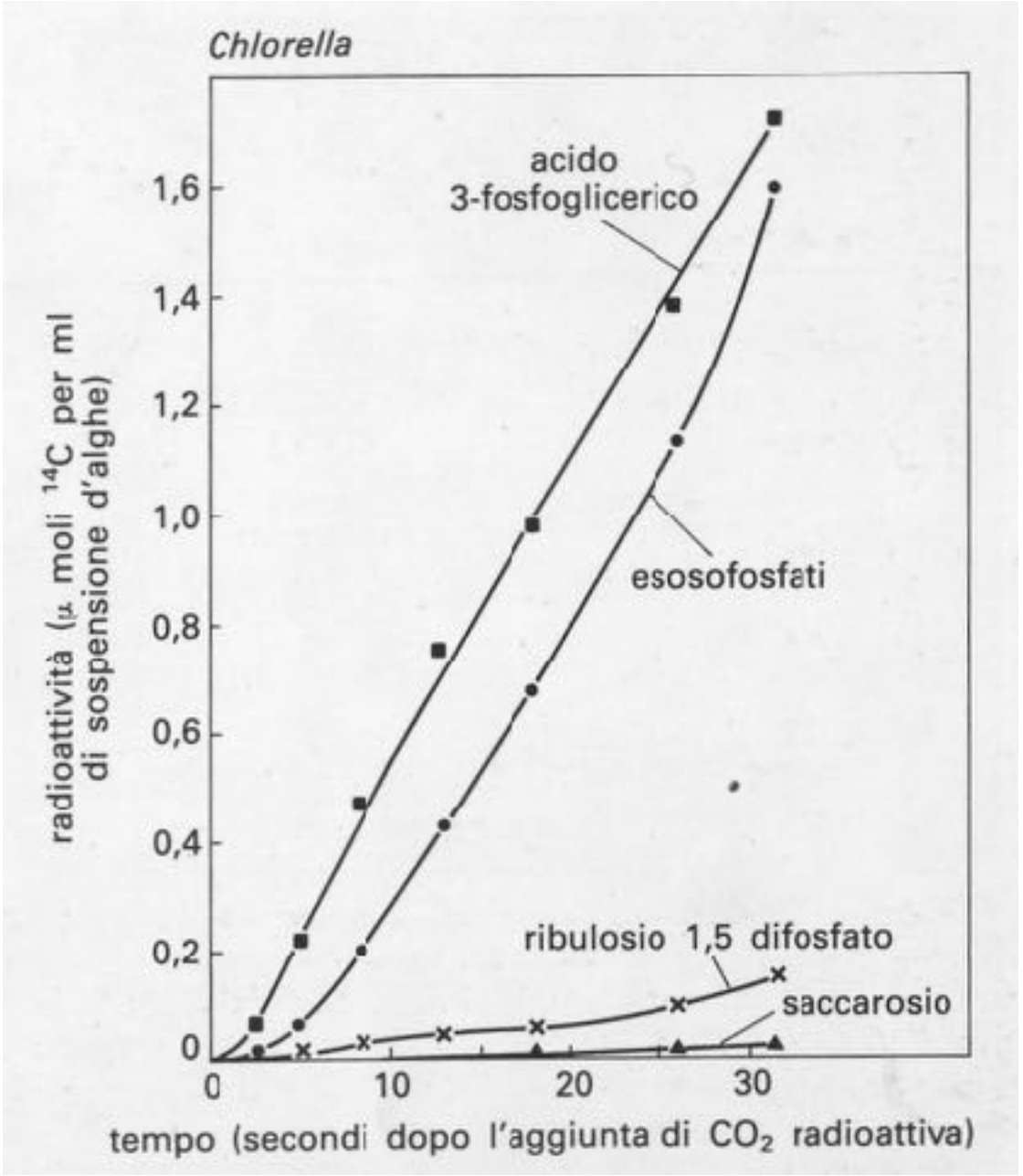




Esponendo le cellule alla $^{14}CO_2$ per periodi di tempo via via sempre piu' brevi, Calvin fu in grado di identificare come primo composto intermedio stabile l'acido 3-fosfoglicerico.

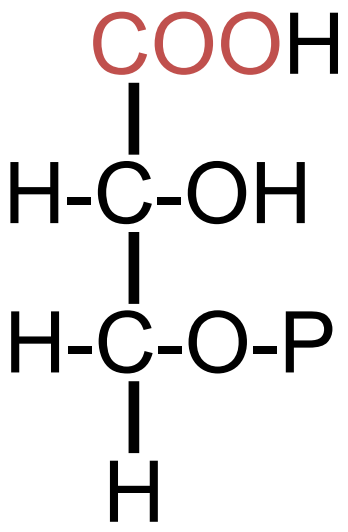
A questo punto furono progressivamente ridotti i tempi di esposizione




Chlorella
acido
3-fosfoglicerico
esosofosfati
ribulosio 1,5 difosfato
saccarosio
radioattività (μ moli ^{14}C per ml di sospensione d'alghe)
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
10
20
30
tempo (secondi dopo l'aggiunta di CO_2 radioattiva)



I risultati dimostrarono che l'acido 3-fosfoglicerico era marcato principalmente nel gruppo carbossilico.



Questo suggerì che l'accettore iniziale della CO_2 fosse un composto a 2 atomi di C, generando una estenuante, futile ricerca di questo composto.

$$3\ C = 2\ C + CO_2$$

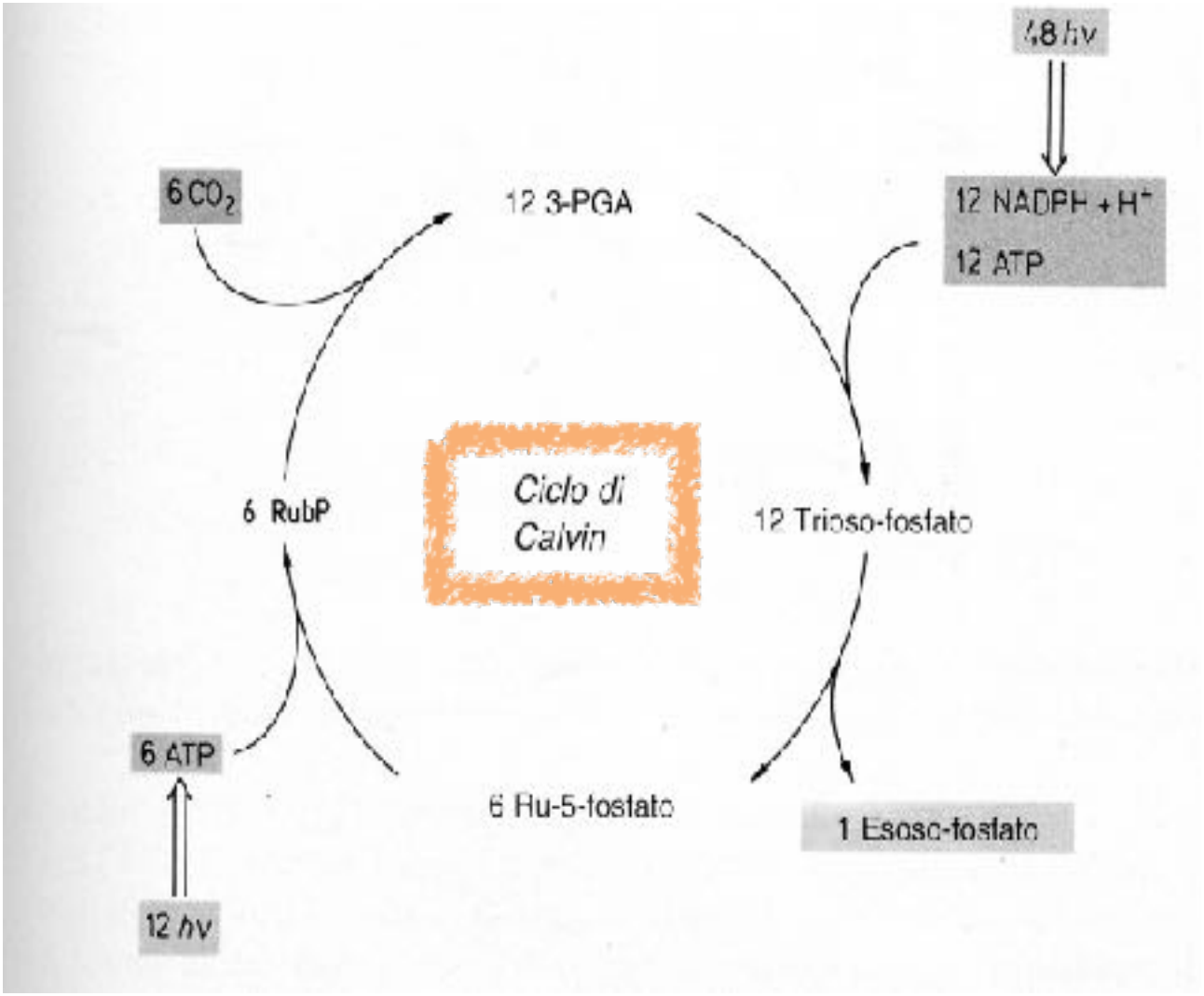


La seguente scoperta che i pentosi monofosfati partecipano al ciclo suggerì la possibilità che l'accettore iniziale della CO_2 fosse un composto a 5 atomi di C che, dopo aver reagito con la CO_2, generava 2 molecole di acido 3-fosfoglicerico.

$$5\ C + CO_2 = 2 \times 3\ C$$

Questo sconvolgimento concettuale portò rapidamente all'identificazione del **ribulosio 1,5-difosfato** (**<u>un pentoso</u>**) come l'accettore della CO_2 e alla formulazione completa del ciclo.




48 hv
6 CO_2
12 3-PGA
12 NADPH + H^+
12 ATP
Ciclo di Calvin
6 RubP
12 Triose-fosfato
6 ATP
6 Ru-5-fosfato
1 Esoso-fosfato
12 hv