

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ПОЛУПРОВОДНИКИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ: БИОСИНТЕЗ, СВОЙСТВА И ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2000 г.

В. В. НИКАНДРОВ

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва

I. Введение. II. Синтез нанокристаллитов гидратированного оксида железа в ферритине. III. Фотохимическая активность ферритина. IV. Биосинтез сульфидов металлов. V. Фотохимическая активность биосинтезированных кристаллитов сульфида кадмия. VI. Фотобиокатализ при сопряженном действии полупроводников и ферментов. VII. Сопряжение неорганических полупроводников с бактериями. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Общепринято, что в качестве хромофоров и фотосенсибилизаторов в живых организмах выступают органические соединения: хлорофиллы, порфирины, каротиноиды, флавины и др. В то же время практически все типы живых организмов способны к биосинтезу неорганических соединений, которые по своей природе являются неорганическими полупроводниками и проявляют фотохимическую активность. К биосинтезируемым неорганическим соединениям, обладающим свойствами полупроводников, можно отнести оксиды железа и сульфиды металлов. Микрочастицы гидратированного оксида железа, связанные с белком ферритином, являются одной из основных форм, в которых железо содержится в клетках прокариот и эукариот. Некоторые организмы синтезируют

Принятые обозначения: 3-fold и 4-fold каналы — промежутки в белковой оболочке ферритина в месте контакта трех или четырех белковых субъединиц, соответственно; GSH — глутатион; PC — фитохелатин; Cd-GSH, Cd-PC, CdS-GSH, CdS-PC — комплексы кадмия и сульфида кадмия с глутатионом и фитохелатином; ЛП — липопротеин; PVS^o — пропиловвиологен сульфат; DV⁴⁺ — димерный виологен.

частицы магнетита — оксида железа, обладающего магнитными свойствами. Дрожжи и растения в процессе детоксикации тяжелых металлов образуют микрочастицы сульфидов металлов на поверхности или внутри клеток.

Неорганические полупроводники, подобно молекулам органических красителей, способны хорошо поглощать электромагнитное излучение и фотосенсибилизировать окислительно—восстановительные реакции [3, 50]. По сравнению с органическими фотосенсибилизаторами неорганические полупроводники обладают рядом преимуществ. Как правило, они более стабильны, чем органические молекулы. Полупроводники обеспечивают возможность многоэлектронных фотопроцессов, что существенно для реализации многих химических реакций, в т.ч. фоторазложения воды. Поверхность частицы полупроводника может играть роль стабилизатора образующихся промежуточных соединений, оказывая влияние на эффективность химических реакций и их избирательность.

Фотохимические реакции с участием неорганических полупроводников широко изучаются в связи с их практической значимостью [50, 61, 92]. Исследование окислительно—восстановительных реакций, фотосенсибилизированных неорганическими полупроводниками в биохимических системах, привело к развитию нового направления в катализе — фотобиокатализа при сопряженном действии неорганических полупроводников и ферментов [12, 75, 104]. Имеются также сведения о фотохимической активности неорганических полупроводников в биологических системах.

В настоящем обзоре суммированы данные о механизмах биосинтеза неорганических полупроводников, структуре, физико—химических и фотохимических свойствах биосинтезированных полупроводниковых частиц, об их участии в биохимических процессах. Представлены также исследования биохимических окислительно—восстановительных реакций, фотосенсибилизированных неорганическими полупроводниками. Рассмотрены механизмы фотообразования водорода, фотовосстановления NAD^+ , NADP^+ , фотофиксации CO_2 , фотосинтеза органических кислот и аминокислот при сопряженном действии неорганических полупроводников и ферментов или клеток бактерий. Обзор не охватывает всех работ, посвященных биосинтезу неорганических полупроводников. В частности, не рассмотрены биосинтез и свойства магнетита и сульфидов железа [121]. Основное внимание в обзоре уделено биосинтезируемым неорганическим полупроводникам, для которых в литературе есть свидетельства их фотохимической активности.

II. СИНТЕЗ НАНОКРИСТАЛЛИТОВ ГИДРАТИРОВАННОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА В ФЕРРИТИНЕ

Одной из основных форм, в которых железо содержится в живых организмах, являются частицы гидратированного оксида железа, связанные с белком ферритином. Главная функция ферритинов это хранение железа и обеспечение им клеток. Ферритины также участвуют в детоксикации двухвалентного железа и в окислительно–восстановительных процессах клетки. Железосодержащие белки ферритины найдены практически во всех типах живых организмов [18, 34, 85, 136]. У млекопитающих ферритин обнаруживается в цитоплазме клеток различных тканей; количество ферритина обычно прямо зависит от содержания клеточного железа. В растениях ферритин (фитоферритин) практически весь находится в хлоропластах. Его белковые субъединицы синтезируются в цитоплазме и импортируются в матрикс пластиды [26, 27]. Бактерии обладают двумя типами железо–запасающих белков: бактериоферритином, содержащим гем *b* и ранее охарактеризованным как цитохром *b*₅₅₇, и ферритином, не имеющим гема [18, 54, 132, 133].

Различаясь в деталях, ферритины всех типов имеют сходную молекулярную архитектуру: 24 белковые субъединицы образуют плотную сферическую оболочку диаметром около 120 Å, в которой заключено ядро, состоящее из одной или нескольких наночастиц гидратированного оксида железа (рис. 1) [31, 56, 85, 109]. В пептидной оболочке ферритина имеются небольшие промежутки (3–4 Å) или каналы в местах контакта субъединиц: три полипептидных субъединицы образуют 3–fold каналы (их всего восемь); в местах контакта четырех субъединиц образуются 4–fold каналы (их всего шесть).

Ферритин млекопитающих имеет два типа субъединиц — Н (≈ 19 кДа) и

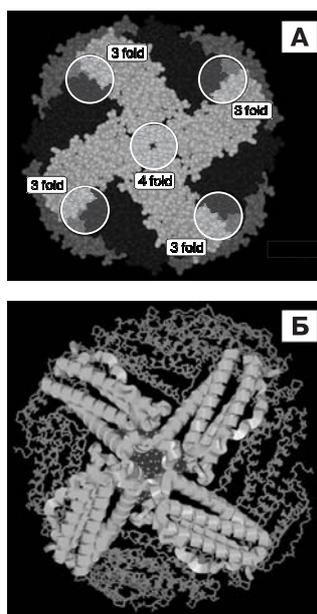


Рис. 1. Молекулярные модели ферритина.

А. Сфера, образованная 24 белковыми субъединицами. Кружками обозначены места расположения 3–fold и 4–fold каналов.

Б. 4–fold канал, сквозь который видно минеральное ядро ферритина [42a].

L (≈ 24 кДа). Бактериоферритин состоит из идентичных или сходных субъединиц (≈ 19 кДа), с которыми связаны 12 гемов. Бактерия *E. coli* и некоторые другие бактерии, кроме бактериоферритина, имеют ферритин, который также включает двадцать четыре одинаковых субъединицы (19,4 кДа), но не содержит гемов [18, 68]. Частицы оксида железа, образующие ядро ферритина млекопитающих, имеют кристаллическую структуру природного минерала ферригидрита — $9\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [47, 84, 85, 137]. Размер частиц ограничивается размером внутренней полости ферритина, диаметр которой составляет 80 Å. Минеральное ядро одной молекулы ферритина может содержать до 4500 атомов железа. Не все организмы имеют ядра ферритина с кристаллическостью ферригидрита. Ферритины некоторых беспозвоночных имеют ядра, которые проявляют слабую кристаллическую или не имеют кристаллической структуры [83]. Ядра ферритина, выделенного из семян гороха, аморфны [142]. Однако ядра, образующиеся в апоферритине гороха *in vitro* в отсутствие ионов фосфата, имеют кристаллическую структуру ферригидрита. Дифракционные картины некоторых бактериоферритинов (например, *E. coli*) не имеют поликристаллических колец и считается, что их ядра имеют беспорядочную структуру [94]. Это заключение подтверждается результатами мессбауэрских измерений, показавших большое различие между окружением железа в ядрах бактериального ферритина и ферритина млекопитающих [86]. В то же время другие бактерии (например, *Azotobacter*) имеют ядро хорошей кристаллическости с той же самой структурой на атомном уровне, как и ферритин млекопитающих [132, 145].

Исследования с использованием мессбауэрской спектроскопии показали, что степень кристаллическости биоминералов оксида железа, образованных *Pseudomonas*, различна и зависит от условий роста клеток [116]. Имеется хорошая корреляция между кристаллическостью оксида железа в ядре ферритина и содержанием фосфора в ферритине [42, 84]. Ионы фосфата покрывают поверхность ядерных кристаллитов, однако они могут также находиться в промежутках белковой оболочки или связываться с ней [85]. Предполагается, что высокий уровень фосфата ингибирует образование больших кристаллитов через ограничение их роста и облегчает растворение минерального ядра ферритина [42, 117]. С другой стороны, имеются данные о включении фосфата в ферритин на ранних стадиях образования ядра [32]; предполагается также связывание фосфата с ионом двухвалентного железа в бактериоферритине, что облегчает транспорт электронов при окислении металла [146].

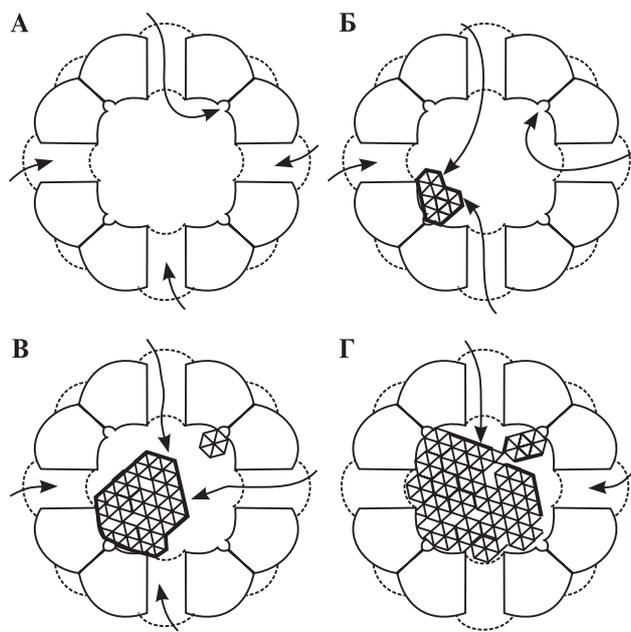


Рис. 2. Образование минерального ядра ферритина.

А, Б, В, Г — этапы биосинтеза кристаллитов гидратированного оксида железа. Стрелками указаны пути прохождения ионов железа в полость ферритина.

Ионы Fe^{2+} легко минерализуются при окислении кислородом при $\text{pH} > 6$. Ферритин, обладающий феррооксидазной каталитической активностью, значительно ускоряет окисление Fe^{2+} , образуя частицы гидратированного оксида железа внутри белковой оболочки. Механизм синтеза минерального ядра ферритина разделяется на несколько этапов (рис. 2). Апоферритин в цитоплазме клеток превращается в ферритин, захватывая ионы Fe^{2+} и транспортируя их через белковую оболочку в центральную полость, где происходит их окисление на каталитических центрах и связывание с центрами зарождения кристаллитов. Небольшие кристаллиты ферригидрита затем растут при отложении дополнительного железа [30, 31, 55–57, 136, 109].

Связывание ионов двухвалентного железа (Fe(II)) белковой оболочкой апоферритина показано *in vitro* [28–30, 130]. Предполагается, что ионы Fe(II) транспортируются внутрь ферритина через восемь гидрофильных 3-fold каналов.

Каждая Н–субъединица ферритина млекопитающих и все субъединицы бактериоферритина содержат биядерный феррооксидазный центр, который катализирует окисление ионов двухвалентного железа кислородом с образованием Fe^{3+} и перекиси водорода. L–субъединица не имеет этого центра, но содержит дополнительные остатки глутамата на внутренней поверхности, которые образуют микроокружение, облегчающее минерализацию и оборот Fe^{3+} в феррооксидазном центре Н–субъединицы. Спектральные исследования показали, что биядерный Fe(III) –пероксоинтермедиат, образующийся на феррооксидазном центре, преобразуется в оксо–димер, который затем распадается и перемещается к участкам белка, где формируются зародыши минерального ядра. При достаточном развитии ядра окисление и минерализация железа происходит прежде всего на поверхности растущего кристаллита, таким образом минимизируя формирование потенциально вредной перекиси водорода [30, 31].

Сайт–направленный мутагенез позволил локализовать феррооксидазный центр на аминокислотных остатках: Glu62, Glu27, и His65 Н–субъединицы белка. Эти остатки отсутствуют на L–субъединице. Аналогичные исследования позволили идентифицировать сайты зарождения минералов, которые состоят из кластеров глутаматов (Glu61, Glu 64, Glu 67) внутри полости белка. Эти сайты имеются на обоих типах субъединиц. Заряженный кластер глутаматов вероятно служит для снижения энергии активации зарождения кристаллов путем сильного электростатического взаимодействия с зарождающимися ядрами кристаллов [30, 31].

Ферритин посредством заряда аминокислотных остатков и электрических полей, возникающих вследствие различных значений электростатического потенциала на поверхности и внутри белка, может управлять связыванием и движением катионов железа. Расчет электростатического потенциала ферритина человека показал, что участки повышенной плотности заряда коррелируют с областями, идентифицированными как активные центры. 3–fold каналы, феррооксидазные каталитические центры и центры зарождения кристаллов имеют отрицательные значения электростатического потенциала, что обеспечивает связывание катионов железа [43]. Внешний вход в 3–fold каналы окружен областями положительного потенциала, в результате чего образуется электростатическое поле, направленное к внутренней полости ферритина и облегчающее вхождение катионов внутрь белка. Кластер остатков глутаминовой кислоты, расположенный на участке зарождения кристалла, образует область отрицательного потенциала, которая

окружает малый, положительно заряженный центр, состоящий из двух остатков аргинина, расположенных на расстоянии 4,9 Å. Такая структура центра зарождения кристалла позволяет предположить, что электростатические поля в ферритине могут также играть роль в процессе образования кристаллитов ферригидрита [43].

Таким образом, в результате катализируемого и регулируемого белком процесса окисления ионов двухвалентного железа внутри ферритина образуются частицы гидратированного оксида железа. В то же время функционирование ферритина как железо—запасяющего белка в клетках предполагает как связывание железа в ферритине, так и его предоставление для нужд клеточного метаболизма. Процессы мобилизации железа из минерального ядра ферритина интенсивно исследуются, однако их механизм не выяснен. Предполагается, что растворение частиц оксида железа, составляющих ядро ферритина, происходит в результате их восстановления и связывания внутриклеточными восстановителями и хелаторами. Остается неясным, каким образом редокс агенты, растворенные в цитоплазме, обеспечивают протекание окислительно—восстановительных реакций внутри ферритина, хотя в литературе имеется ряд гипотез и исследований по этому поводу [85, 135, 144].

III. ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕРРИТИНА

Оксиды железа обладают полупроводниковыми свойствами и фотохимически активны [80]. Минерал ферригидрит при фотовосстановлении растворяется с образованием ионов Fe^{2+} [46]. Ферритин также проявляет фотохимическую активность. Освещение ферритина, выделенного из семян гороха, приводит к восстановлению части эндогенного железа [78, 79]. Тот факт, что фотообразование Fe^{2+} происходит лишь при действии света, который поглощается минеральным ядром ферритина ($\lambda < 500$ нм), а также одинаковая фотохимическая активность растительного ферритина и выделенного из него ядра, позволили авторам сделать заключение о том, что за фотовосстановление эндогенного железа отвечает минеральное ядро ферритина, а не белок. Освещение ферритина, выделенного из селезенки лошади, ближним УФ светом также приводит к образованию ионов Fe^{2+} [22]. Начальный квантовый выход фотовосстановления ферритина животных зависит от длины волны действующего света и не зависит от pH и присутствия кислорода. Конечный выход Fe^{2+} увеличивается при подкислении среды и снижается в присутствии кислорода, что объясняется

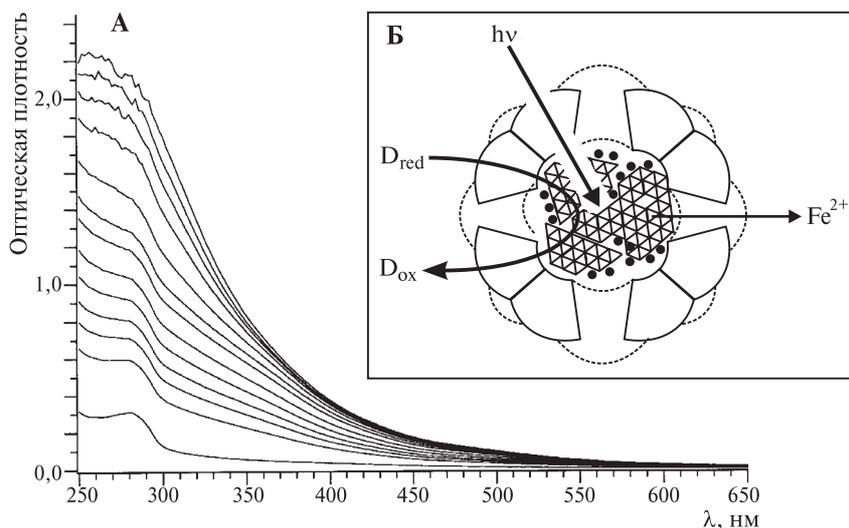


Рис. 3. Фотовосстановление ферритина.

А. Спектры поглощения ферритина в ходе освещения в присутствии тартрата.

Б. Схема фотореакции [103].

реокислением восстановленного железа. Авторы предположили, что при фотовосстановлении ферритина окисляется глутамат в апоферритине или же гидроксильные группы ферригидрита. В работе [103] описаны условия, при которых в результате фотовосстановления ферритина наблюдается его обесцвечивание и происходит полное растворение минерального ядра ферритина (рис. 3). Для этого требуется освещение ферритина в анаэробных условиях в присутствии доноров электрона (органических кислот или тиосоединений) при $\text{pH} < 6$.

Фотогенерация ионов Fe^{2+} при фотовосстановлении ферритина инициирует деструктивные процессы в клетке. Так, в результате освещения ферритина гороха происходит расщепление его белковых субъединиц, агрегация молекул ферритина и снижение их растворимости [78, 79]. Ферритин, выделенный из селезенки лошади сенсibiliзирует фотоокисление липопротеинов (ЛП) человека [94, 95]. Освещение смесей ЛП и ферритина ближним УФ светом вызывает окисление остатков триптофана в ЛП и приводит к образованию гидроперекисей липидов и продуктов перекисного окисления липидов. Подавление фотодеструкции ЛП в присутствии

формиата и хелаторов ионов железа позволило предположить цепной механизм реакции окисления липидов с участием ионов Fe^{2+} и гидроксильных радикалов, образующихся при фотовосстановлении минерального ядра ферритина. Основываясь на полученных результатах и рассчитанной вероятности поглощения света ферритином, содержащимся в фибробластах и макрофагах кожи, авторы выдвинули гипотезу о ферритине как сенсibiliзаторе фотодеструктивных реакций, приводящих к развитию процессов старения кожи и канцерогенеза [94, 95]. В то же время показано, что физиологические дозы ближнего УФ света не вызывают восстановления железа ферритина в фибробластах кожи человека [140]. Более того, установлено увеличение внутриклеточного содержания ферритина при освещении фибробластов или кератиноцитов кожи человека ближним УФ светом [19, 20, 138, 139]. Эти данные интерпретированы в свете защитной роли ферритина от повреждающего действия УФ света. Предполагается, что благодаря синтезу дополнительного ферритина снижается количество свободного железа в клетке и тем самым предотвращаются окислительные процессы. Выдвинута гипотеза о наличии в человеческой коже ферритиновой системы защиты, индуцируемой УФ светом [21]. Противоречивость выводов об участии ферритина в фотоиндуцированных деструктивных процессах в коже человека объясняется, по-видимому, двойственной ролью ферритина как источника ионов железа и антиоксиданта, снижающего внутриклеточное содержание ионов Fe^{2+} . К такому выводу пришли авторы опубликованной недавно работы [108], в которой показано, что кратковременное облучение фибробластов кожи человека ближним УФ светом приводит к разрушению ферритина и увеличению количества свободных ионов железа, а при долговременном облучении синтезируется дополнительное количество ферритина и снижается уровень окислительных реакций в клетках. Авторы предполагают, что выход железа из ферритина при кратковременном освещении УФ светом происходит вследствие деструкции его белковой оболочки, катализируемой внутриклеточными протеазами. Однако нельзя исключить, что это происходит в результате фотовосстановления ферритина, сопровождающегося фотодеструкцией его белковой части и фоторастворением его минерального ядра.

Ферритин может выступать в качестве фотокатализатора не только деструктивных процессов, но и окислительно-восстановительных фотореакций, в процессе которых происходит восстановление цитохрома *c* или виологенов [103]. Эти возможности ферритина продемонстрированы на ферритине, выделенном из селе-

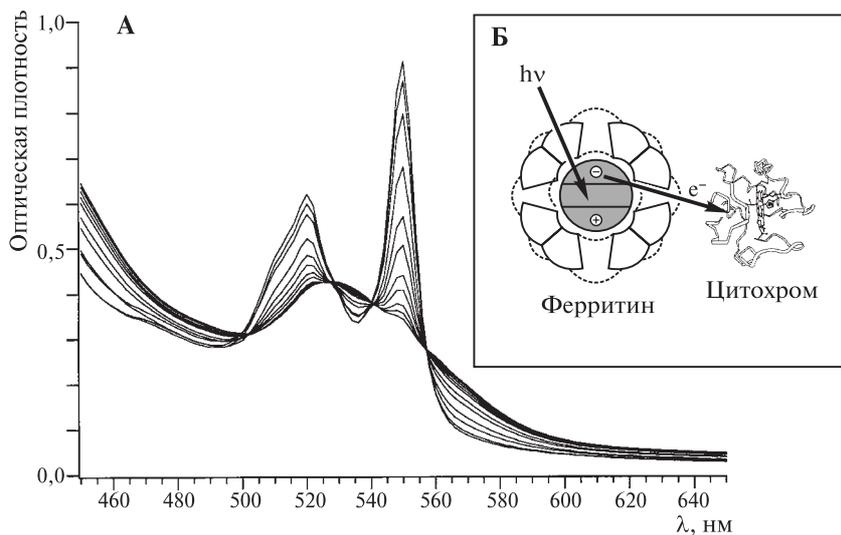


Рис. 4. Фотосенсибилизированное ферритином восстановление цитохрома *c*.
 А. Спектры поглощения цитохрома *c* в ходе фотореакции.
 Б. Схема фотореакции [103].

зенки лошади. Микрочастицы оксида железа, образующие ядро этого ферритина, имеют кристаллическую структуру природного минерала ферригидрита.

Освещение водных растворов ферритина, содержащих цитохром *c*, приводит к характерным изменениям спектра поглощения цитохрома, указывающим на его восстановление (рис. 4). При концентрации ферритина 1 мкМ полностью восстанавливается 32 мкМ цитохрома, что предполагает каталитический характер реакции. Скорость фотовосстановления цитохрома зависит от интенсивности света, концентрации ферритина и акцептора электрона. Фотовосстановление цитохрома наблюдается как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Тартрат, оксалат, цитрат и малонат активируют фотовосстановление цитохрома. В присутствии глутатиона, цистеина и сульфита наблюдается восстановление цитохрома в темноте, скорость которого увеличивается при освещении.

Ферритин также сенсibiliзирует фотовосстановление виологенов: димерного виологена — DV^{4+} , восстановительный потенциал которого $E^\circ = 0,0$ В, и пропилвиологен сульфоната — PVS° ($E^\circ = -0,340$ В). В отличие от фотовосстановления цитохрома,

фотокатализируемое ферритином восстановление DV^{4+} и PVS° наблюдается только в анаэробных условиях. Фотовосстановление DV^{4+} происходит в отсутствие экзогенного донора электрона, однако максимально достижимая концентрация фотовосстановленного DV^{4+} в этом случае не превышает 1 мкМ. Тартрат значительно увеличивает скорость и повышает глубину восстановления DV^{4+} . Применение метода лазерного импульсного фотолиза позволило получить кинетические кривые фотовосстановления PVS° в микро-секундном временном интервале. Анализ кинетических кривых показывает, что фотовосстановление PVS° происходит за 4 мксек после лазерной вспышки ($k_{\text{obs}} = 10^6 \text{ сек}^{-1}$).

Для выяснения возможности участия в реакциях фотовосстановления цитохрома и виологенов ионов железа, которые связаны с полипептидной оболочкой ферритина или образуются в ходе фотоиндуцированного растворения микрокристаллов ферригидрита, исследовано фотовосстановление ферритина. Освещение растворов ферритина, содержащих донор электрона, при pH 5,5 в анаэробных условиях приводит к полному восстановлению Fe^{3+} , содержащегося в ферритине. Образующиеся в ходе восстановительной фотокоррозии минерального ядра ферритина ионы Fe^{2+} способны восстанавливать цитохром и DV^{4+} . Однако, фотокоррозия ферритина и фотосенсибилизированное ферритином восстановление акцепторов электронов имеют существенно различающиеся зависимости от pH. Скорость фотокоррозии ферритина уменьшается с увеличением pH, при pH > 7,5 фотокоррозия не наблюдается. В отсутствие экзогенных доноров электрона скорость фотовосстановления цитохрома постоянна при pH 7–9 и уменьшается при подкислении среды. В присутствии тартрата фотовосстановление цитохрома не зависит от кислотности среды в области pH от 5,5 до 8,5. Фотокатализируемое ферритином восстановление PVS° наблюдается при pH > 9, в условиях, когда фотокоррозия оксида железа термодинамически невозможна. Эти факты позволили сделать вывод о том, что цитохром и виологены восстанавливаются фотогенерированными в минеральном ядре ферритина электронами, хотя вклад фотоиндуцированного транспорта электронов с участием ионов железа при pH < 7,0 не исключается. Кроме того, отмечается, что в аэробных условиях в качестве восстановителя цитохрома может, по-видимому, выступать супероксид радикал, образование которого возможно при фотокатализируемом ферритином восстановлении кислорода.

Использование света различного спектрального диапазона показало, что фотохимически активным элементом ферритина

является его минеральное ядро, благодаря которому ферритин поглощает свет в ближнем УФ и видимом диапазоне спектра. Предложен следующий механизм сенсibilизированных минеральным ядром ферритина фотореакций [103]. Микрористаллы ферригидрита, образующие ядро ферритина, как и другие оксиды железа, обладают полупроводниковыми свойствами. Поглощение фотонов, имеющих энергию большую, чем ширина запрещенной зоны полупроводника, приводит к генерации электрон–дырочных пар, которые способны вступать в окислительно–восстановительные реакции с компонентами среды. Дырки, образующиеся в валентной зоне, окисляют экзогенные доноры электрона или, при их отсутствии, белковую оболочку ферритина. Фотогенерированные в зоне проводимости электроны вступают в межфазные редокс реакции с акцепторами электрона — цитохромом *c* или виологенами. Поскольку минеральное ядро ферритина заключено в белковую оболочку толщиной 2,5 нм, которая имеет поры диаметром 4–5 Å, фотовосстановление цитохрома и DV^{4+} , размер которых значительно больше диаметра пор, объясняется транспортом фотогенерированных в ядре ферритина электронов через белковую оболочку (см. рис. 4).

Таким образом, ферритин млекопитающих способен выступать в качестве фотокатализатора окислительно–восстановительных реакций, обеспечивая фотовосстановление акцепторов электронов, имеющих восстановительный потенциал от +0,240 V (потенциал цитохрома *c*) до –0,340 V (потенциал PVS^0), и окисление разнообразных органических соединений. Реакции подобного типа возможны в коже млекопитающих. Учитывая присутствие минерального ядра сходного состава в растительном и бактериальном ферритинах, можно предположить также возможность аналогичных окислительно–восстановительных фотореакций с участием ферритина в растениях и бактериях.

IV. БИОСИНТЕЗ СУЛЬФИДОВ МЕТАЛЛОВ

Образование отложений сульфидов металлов в культурах сульфатредуцирующих бактерий и некоторых дрожжей обнаружено достаточно давно [13, 48, 93]. Но лишь недавно установлено, что некоторые микроорганизмы и растения способны образовывать микрочастицы сульфида металла на поверхности или внутри клеток. *Klebsiella pneumonia* и *Clostridium thermoaceticum* обезвреживают ионы кадмия, образуя кристаллиты сульфида кадмия на поверхности клетки [15, 16, 17, 38, 63, 64, 127]. Глубоководная морская флуорес-

цирующая бактерия *Pseudomonas aeruginosa* удаляет кадмий из среды путем образования кристаллитов CdS на клеточной стенке [143]. Обнаружено образование кристаллитов CdS в слизистой оболочке фотосинтезирующей цианобактерии *Nostoc muscorum* [1, 2]. Дрожжи *Schizosaccharomyces pombe* и *Candida glabrata* синтезируют наноразмерные частицы CdS внутри клеток [39, 40, 114]. Способность к биосинтезу наночастиц CdS проявляют также высшие растения. [115, 128].

Кадмий, как и другие тяжелые металлы, является токсичным для всех организмов, и многие из них имеют механизмы защиты от его воздействия. Выяснение механизма биосинтеза сульфидов металлов неразрывно связано с проблемой детоксикации ионов металлов. И в том и в другом случае необходимо выяснить механизмы транспортировки иона металла и его связывания.

Образование внеклеточных отложений сульфидов металлов в средах, содержащих восстанавливающие сульфат бактерии, происходит в результате взаимодействия ионов металла с выделяемым бактериями сероводородом [13, 48, 93, 147]. Выяснение механизма образования сульфидов металлов вне клеток невосстанавливающими сульфат микроорганизмами прежде всего сводится к выяснению источника сульфида. При рассмотрении механизма внутриклеточного синтеза частиц сульфида металла возникают также и вопросы о механизме прохождения ионов металлов внутрь клетки, их связывании органическими молекулами и о стабилизации образующихся кристаллитов.

ОБРАЗОВАНИЕ СУЛЬФИДОВ МЕТАЛЛОВ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ. ИСТОЧНИКИ СУЛЬФИДА

Невосстанавливающая сульфат бактерия *C. thermoaceticum* полностью преципитирует кадмий при его концентрации в среде до 1 мМ [38]. Образующиеся при этом частицы сульфида кадмия локализуются как на поверхности клетки, так и вне клеток. Преципитация кадмия энергозависима и требует присутствия цистеина. Этот факт, а также обнаружение индуцируемой кадмием цистеиндесульфогидазной активности в экстрактах *C. thermoaceticum* позволили предположить, что процесс биосинтеза сульфида кадмия этой бактерией обеспечивается сульфидом в результате отрыва тиогруппы от цистеина, катализируемого цистеиндесульфогидазой. Электрономикроскопические исследования *C. thermoaceticum* показали, что сульфид кадмия располагается на определенных местах клеточной стенки, которые, как предполагают, близки к местам локализации цистеиндесульфогидазы внутри клеток [38].

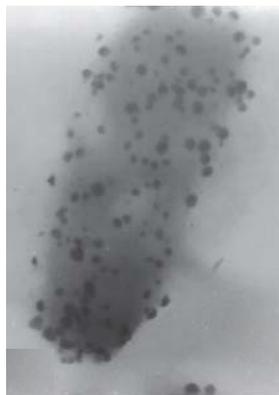


Рис. 5. Бактерия *Klebsiella pneumoniae*, содержащая на поверхности частицы CdS диаметром 200 нм, которые являются конгломератами меньших частиц, имеющих размер менее 4 нм [63, 64, 127].

По-видимому, невосстанавливающая сульфат бактерия *Pseudomonas stutzeri* образует частицы сульфида серебра также благодаря присутствию цистеиндесульфогидразы [125, 126].

В условиях пониженного содержания глюкозы, сульфата и фосфата бактерия *Klebsiella pneumoniae* (прежнее название *K. aerogenes*) проявляет два различных механизма детоксикации ионов кадмия: формирование сульфида металла и формирование фосфата металла [15–17]. Усиление выделения H_2S в присутствии ионов кадмия в среде и анализ содержания металлов и сульфида дали основание предположить образование частиц CdS вне клеток. В дальнейшем биосинтез частиц CdS бактерией *K. pneumoniae* детально исследовался спектрофотометрически, электронной микроскопией и методом энергодисперсионного рентгеновского характеристического излучения [63, 64, 127]. Подтверждено, что образующиеся в присутствии ионов кадмия на поверхности бактерии частицы — действительно CdS. В течение фазы замедления бактериального роста на внешней поверхности клеточной стенки *K. pneumoniae* образуются частицы CdS, имеющие диаметр до 5 нм. Размер этих частиц увеличивается, и в стационарной фазе роста некоторые из частиц имеют размер ~ 200 нм (рис. 5), а масса всех образованных CdS частиц составляет 3–4 % общей клеточной биомассы. Клетки бактерий *K. pneumoniae* благодаря присутствию CdS на их поверхности приобретают окраску, поглощая свет с длиной волны до 470 нм. Спектроскопия частиц CdS указала на то, что большие частицы, наблюдаемые в электронный микроскоп, являются совокупностью меньших частиц, имеющих размер менее 4 нм [64, 127].

Результаты исследований [64, 127], по-видимому, исключают возможность внеклеточного образования частиц CdS бактерией *K. pneumoniae* при катализируемом цистеиндесульфогидразой выделении H_2S , как установлено для *S. thermoaceticum*. Хотя активность цистеиндесульфогидразы обнаруживается в бесклеточных экстрактах *K. pneumoniae*, она не зависит от присутствия ионов кадмия, то есть металл не индуцирует образование этого фермента. Дополнительным доказательством того, что формирование CdS не проис-

ходит при участии H_2S , выделяемого во внеклеточную среду, является тот факт, что средний размер образующихся частиц CdS составляет 5 нм или образуются их агрегаты диаметром 200 нм. При выделении H_2S следовало бы ожидать формирования более крупных частиц CdS (как это происходит в культурах сульфатредуцирующих бактерий), в предпочтении к отдельным наноразмерным частицам.

Частицы сульфида металла не образуются бактерией *K. pneumoniae*, выращенной в присутствии ионов свинца, цинка, ртути, меди или серебра. В присутствии ионов свинца происходит формирование внеклеточных частиц, содержащих свинец, но не сульфид или фосфат. В присутствии меди и ртути формируются внутриклеточные фосфор–содержащие частицы; в присутствии ионов цинка внутри клеток также образуются частицы, но они не содержат ни серу, ни фосфор. При совместном присутствии ионов кадмия и цинка в среде образуются частицы сульфида металла, которые состоят преимущественно из кадмия, например, 48,6 % кадмия и 0,04 % цинка. Точно так же, в присутствии ионов кадмия и свинца в течение роста образуются только частицы CdS. Эти результаты также исключают возможность образования CdS через индуцированное кадмием выделение сероводорода клетками во внешнюю среду (если бы H_2S выделялся, то помимо CdS должны были бы образовываться частицы сульфидов других металлов) и указывают на специфичность процесса образования сульфида металла бактерией *K. pneumoniae* по отношению к кадмию. Предложена альтернативная гипотеза формирования CdS на поверхности клеток *K. pneumoniae* [64], постулирующая, что ионы кадмия, поступающие в клетку через транспортную систему марганца или магния [13, 48], связываются содержащим цистеин белком, на котором происходит образование наночастиц CdS. Далее комплекс CdS–белок движется к мембране клетки, где он экскретируется или транспортируется через мембрану и улавливается внеклеточной полисахаридной матрицей. Эти отдельные, заключенные в белковые оболочки частицы CdS затем олигомеризуются, формируя большие мультимеры, наблюдаемые в электронный микроскоп. Предполагается, что наличие белковой оболочки у наноразмерных кристаллитов CdS предотвращает формирование больших кристаллов CdS. Следует заключить, что предложенная модель, однако, не определяет источник сульфида при образовании CdS. Возможно использование сульфида, образующегося при биосинтезе аденина, как это показано для *S. pombe* [106, 129].

Цианобактерия *Nostoc muscorum* — единственная фотосинтезирующая бактерия, для которой установлено образование CdS [1, 2]. Инкубирование цианобактерии с $Cd(NO_3)_2$ приводит к образо-

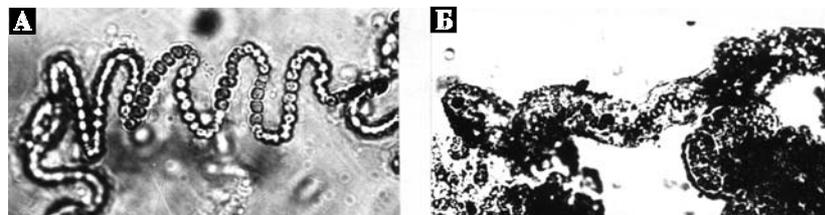


Рис. 6 Цианобактерия *Nostoc muscorum*, растущая в среде без кадмия (А) и в присутствии 10 мМ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (Б) [1, 2].

ванию частиц различных размеров и формы на ее слизистой оболочке (рис. 6).

Микроскопирование и анализ энергодисперсионных спектров рентгеновского характеристического излучения клеток *N. muscorum* и отдельных участков поверхности клеток показали, что кадмий аккумулируется на слизистой оболочке бактерии путем образования частиц сульфида кадмия и металлического кадмия (Cd^0). Микродифракционные картины, полученные для этих частиц, позволили идентифицировать их как кристаллиты. Кристаллиты CdS образуются при инкубировании *N. muscorum* с кадмием как в темноте, так и при освещении; кристаллиты Cd^0 образуются исключительно при освещении. Размер кристаллитов CdS , определенный при помощи электронной микроскопии, составляет 0,2—5 мкм. Спектральные измерения показали также присутствие частиц CdS размером менее 6 нм. Спектр поглощения цианобактерии после инкубирования с $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ в течение трех недель, когда все пигменты в основном обесцвечены, подобен спектру поглощения химически синтезированных частиц CdS размером менее 6 нм, так называемых «Q-частиц» или нанокристаллов [58—61], и похож на спектр поглощения бактерии *K. pneumonia*, содержащей частицы CdS диаметром 4—5 нм на поверхности клеток [64, 127]. Присутствие частиц CdS размером менее 6 нм на поверхности цианобактерии также подтверждается сходством спектра излучения флуоресценции (максимум при 465 нм) и спектра возбуждения флуоресценции (максимум при 360—380 нм) *N. muscorum*, инкубированной с кадмием, с известными из литературы соответствующими спектрами люминесценции химически синтезированных частиц CdS , имеющих диаметр менее 6 нм [58, 61], и наноразмерных частиц CdS , выделенных из *C. glabrata* [39, 40].

Механизм биосинтеза CdS фотосинтезирующей цианобактерией *N. muscorum* пока не выяснен. Возможно, процесс биосинтеза CdS подобен процессу, предложенному для *K. pneumoniae* [64].

Источником сульфида для образования CdS могут быть также бактерии — естественные спутники *N. muscorum*, живущие в ее слизистой оболочке.

СИНТЕЗ СУЛЬФИДОВ МЕТАЛЛОВ ВНУТРИ КЛЕТОК. РОЛЬ ГЛУТАТИОНА И ФИТОХЕЛАТИНОВ

Возможность внутриклеточного синтеза CdS впервые показана для дрожжей *S. pombe* и *C. glabrata* [39, 40, 114]. Дрожжи в присутствии ионов кадмия (до 1—5 мМ) в реакционной среде синтезируют кристаллиты CdS, покрытые пептидами. В зависимости от вида дрожжей и состава реакционной среды образуются кристаллиты, связанные с молекулами глутатиона и γ -глутамилцистеина или с низкомолекулярными пептидами, имеющими сходный состав — $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$. Выделенные из *C. glabrata* кристаллиты CdS имеют отношение S/Cd от 0,3 до 0,7 [39—41]. Кристаллиты, включающие 80 единиц CdS, имеют диаметр около 20 Å и связывают 30 пептидов $(\gamma\text{Glu-Cys})_2\text{-Gly}$. Подобно синтетическим нанокристаллам CdS биосинтезированные кристаллиты обладают поглощением в ближней УФ области спектра и люминисценцией при 460 нм. Рентгеноструктурный анализ кристаллитов *S. pombe* и *C. glabrata* показал, что их кристаллическая структура отличается от структуры крупных кристаллов CdS [40]. Структура кристаллитов *S. pombe* близка структуре каменной соли, а рентгеноструктурные характеристики кристаллитов *C. glabrata* занимают промежуточное положение между соответствующими характеристиками природного минерала сфалерита и каменной соли.

Вскоре после опубликования работ по внутриклеточному синтезу кристаллитов CdS дрожжами обнаружена способность высших растений к биосинтезу CdS. Кристаллиты CdS выделены из листьев и корней томата *Lycopersicon esculentum* [115] и дикой горчицы *Brassica juncea* [128]. Показано присутствие многоядерного кластера кадмия в фитохелатине, выделенном из корней кукурузы, выращенной в присутствии кадмия [107]. Выращенные в присутствии кадмия томат и горчица синтезируют комплексы пептидов с кадмием, которые по аминокислотному составу, содержанию сульфида и спектральным свойствам сходны с комплексами нанокристаллитов CdS с пептидами, синтезируемыми дрожжами. Полученные данные дали основание авторам сделать вывод о сходстве процессов детоксикации кадмия дрожжами и высшими растениями. Предполагается, что образование CdS может быть общим для микроорганизмов и растений механизмом детоксикации ионов кадмия.

Дальнейшие исследования были направлены на выяснение отдельных этапов детоксикации ионов кадмия и биосинтеза CdS внутри клеток, которые включают хелатирование и транспорт Cd глутатионом и родственными соединениями, формирование кристаллитов сульфида кадмия и комплексов CdS с пептидами.

Глутатион — первая молекула, включающаяся в детоксикацию ионов Cd внутри клеток [33, 66, 67]. Мутанты дрожжей и растений, не способные к биосинтезу GSH, высокочувствительны к Cd [33, 66, 67]. Ингибиторы биосинтеза GSH также делают дрожжи [33], растения [113] и животные клетки [124] высокочувствительными к токсичному влиянию кадмия. Механизм детоксицирующего действия GSH основан на его способности связывать свободные ионы металлов. Образование комплекса иона кадмия с глутатионом — $Cd(GSH)_2$ и его транспорт через мембраны вакуолей является важным фактором, обеспечивающим устойчивость к Cd дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [81, 82].

Начальная детоксикация Cd в клетках происходит через взаимодействие металла с GSH. Однако, поскольку GSH участвует также в других клеточных процессах, таких как поддержание окислительно—восстановительного потенциала и связывание метаболитов, этот пептид может только временно связывать ионы металлов, до тех пор, пока в ответ на присутствие металла в клетках не синтезируются другие связывающие металлы пептиды или белки, которым GSH передает ионы металлов. Высшие растения, морские водоросли и некоторые дрожжи в присутствии тяжелых металлов синтезируют фитохелатины (PC) и родственные им полипептиды, обогащенные цистеином [33, 45, 87, 88, 90, 110—112, 131]. Эти полипептиды связывают кадмий и так же, как глутатион, необходимы для детоксикации тяжелых металлов [110, 118—120, 124]. По роли и по механизму связывания тяжелых металлов фитохелатины являются аналогами хорошо известных металлотионинов дрожжей, млекопитающих и других животных [44, 52, 53, 134]. Однако структура фитохелатинов отличается от структуры металлотионинов. Они имеют также иной механизм биосинтеза. Фитохелатины характеризуются связью глутаминовой кислоты с γ -карбоксовой группой боковой цепи [12, 13], а не с α -карбоксовой группой, используемой в пептидных связях полипептидов, которые синтезируются в рибосоме. Фитохелатины структурно относятся к глутатиону — γ -Glu-Cys-Gly и имеют общую формулу $(\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly с $n = (2—14)$, хотя C-концевая аминокислота в составе PC может быть иной в некоторых организмах [33, 51, 74, 87, 88, 90, 111]. Структурное сходство между GSH и PC дает основание предполагать, что

они связаны как предшественник—продукт [33, 87, 90, 111]. *In vitro* получено доказательство существования фермента растений, известного как фитохелатинсинтаза, который способен катализировать формирование РС из GSH [52, 53, 66, 67, 154]. Получен мутант *Arabidopsis thaliana CADI*, не способный к синтезу фитохелатинсинтазы [53].

Длина цепи РС в растениях и *S. pombe* увеличивается со временем выдержки бактерии с металлами [33, 87, 90, 111]. Предполагается, что ионы металла, связанные GSH, перемещаются на короткие РС, которые впоследствии передают их более длинным РС [25]. Транспорт металла глутатионом к РС показан в случае Cd (II), Pb (II), Cu (I) и Hg (II) [23, 90, 91].

На следующем этапе детоксикации ионов металла происходит внедрение сульфида в комплексы кадмия с фитохелатинами. Именно на этом этапе происходит формирование кластеров, а затем и кристаллитов CdS. Присутствие лабильного сульфида в комплексе кадмия с РС впервые отмечено в работе [96], в которой РС называли кадистином. С тех пор многочисленные исследования показали, что комплексы Cd—РС, выделенные из растений и дрожжей, часто содержат неорганический сульфид [33, 39—41, 88, 90, 111]. Внедрение сульфида в комплекс металл—пептид с образованием сульфида металла выгодно для организма, потому что в результате происходит связывание большего количества кадмия на пептид и увеличивается кислотная стабильность комплекса Cd—РС [39—41]. Действительно, включение сульфида в полученные *in vitro* или изолированные из культур дрожжей комплексы Cd—РС с образованием CdS приводит к значительному увеличению Cd—связывающей способности РС [39—41, 90, 91] и увеличению стехиометрии Cd(II)/РС вследствие синтеза CdS [41]. Кинетические измерения содержания кадмия, сульфида и фитохелатина в культурах клеток растений *Rauvolfia serpentina* и *Silene cucubalus*, инкубированных с Cd, показали, что имеются два возможных способа уменьшения количества серы, необходимой для связывания Cd²⁺: увеличение длины цепи РС или включение сульфида в комплексы Cd—РС, последний процесс более эффективен [73].

О значимости образования CdS для организмов говорит тот факт, что мутанты дрожжей, дефектные по содержащим сульфид Cd—РС комплексам (т.е. комплексам CdS—РС), не способны выдерживать повышенное содержание Cd в среде [69, 97, 105, 129]. Напротив, увеличение эффективности образования комплексов CdS—РС приводит к повышению устойчивости к Cd [89]. Полная экспрессия устойчивости к Cd дрожжей и растений требует формирования комплексов кристаллитов CdS с РС [69, 105, 129].

В ряде случаев показано, что биосинтезу комплексов CdS—PC предшествует формирование комплексов CdS—GSH [25]. Сульфидные комплексы глутатиона (CdS—GSH) так же, как и сульфидные комплексы фитохелатина (CdS—PC), проявляют значительное увеличение способности к связыванию Cd (II) и химически более устойчивы, чем комплексы, не содержащие сульфид [39, 41]. В конечном счете, CdS—GSH комплексы заменяются комплексами CdS—PC [25]. Изолированные комплексы CdS—GSH и CdS—PC могут иметь различные размеры, в зависимости от количества сульфида при их синтезе [24, 40, 41, 89].

Образование кристаллитов CdS в клетках *S. pombe* зависит от того, на какой фазе роста культуры дрожжей добавляется кадмий [149]. Добавление сульфата кадмия в начале экспоненциальной фазы роста приводит к немедленному внутриклеточному поглощению кадмия, сопровождаемому быстрым его выходом из клеток, долговременному снижению метаболизма клетки и снижению внутриклеточного содержания неорганического сульфида. Максимальное образование CdS наблюдается после добавления сульфата кадмия к культуре в середине экспоненциальной фазы роста. Фракционирование делящихся клеток дрожжей, растущих в присутствии Cd, показало, что различные клетки могут содержать комплексы Cd—PC, имеющие различное соотношение сульфид/Cd или не иметь сульфида [111, 148, 154]. В свою очередь фракции, содержащие сульфид, разделяются на компоненты, которые отличаются по размеру и заряду [89, 111, 148, 154]. Эти наблюдения предполагают, что включение сульфида является процессом, зависящим от времени, и приводит к образованию комплексов PC с нанокристаллитами CdS, которые синтезируются в стационарных культурах, имеющих высокое содержание сульфидов [111, 148, 154]. Это заключение поддерживается наблюдениями, сделанными на Cd—устойчивом штамме *C. glabrata*, производящем сверхвысокие уровни сульфида в присутствии Cd [89]. Комплексы CdS—PC, изолированные из этого штамма, имели одинаковый размер кристаллита.

В работе [24] рассмотрены следующие вопросы: какова точная стехиометрия Cd(II), сульфида и PC (или GSH) в комплексах CdS—GSH и CdS—PC; может ли GSH в CdS—GSH комплексах быть заменен на PC по мере того, как эти пептиды синтезируются, и может ли длина цепи PC определять размер сформированного бионанокристаллита. Включение неорганического сульфида в комплексы Cd—GSH вело к формированию ряда комплексов CdS—GSH, которые различались по отношению сульфид/Cd (II), спектральным свойствам и Cd(II)—связывающей способности. CdS

кристаллиты формируются при молярных отношениях Cd(II)/GSH до 1 : 1, но наиболее воспроизводимые результаты получены при отношениях Cd(II)/GSH 0,5 или 0,25. Фракционирование по размеру CdS—GSH комплексов показало, что молярное отношение Cd(II)/GSH увеличивается от минимального 0,3 до максимального 25 по мере того, как молярное отношение сульфид/Cd(II) увеличивается от 0 до 1,0. Радиус кристаллитов CdS в комплексах CdS—GSH варьирует от 10,8 до 17,3 Å в зависимости от содержания сульфида. В отличие от GSH на фитохелатинах формируются кристаллиты CdS одинакового размера с радиусом 11,8 Å. При добавлении фитохелатинов к комплексам CdS—GSH происходит замена GSH на PC.

Источники сульфида для образования кристаллитов CdS в дрожжах и локализация участка биосинтеза кристаллитов внутри клеток точно не выяснены. Предполагается включение пути биосинтеза аденина в производство сульфида, используемого для синтеза CdS в *S. pombe* [72, 105, 129], и пути восстановления сульфата для синтеза CdS в *C. glabrata* [89].

Внутри клетки связывающие кадмий фитохелатины накапливаются в вакуолях [141, 153], по-видимому, в процессе транспорта, зависящего от АТФ [119]. Предполагается, что вакуоль может быть и местом сборки CdS—PC в дрожжах *S. pombe* [105]. Однако флуоресцентно—микроскопические исследования показали, что комплексы CdS—PC формируются в цитоплазме до их включения в вакуоли [89, 141].

Основываясь на результатах работ [72, 89, 105, 111, 119, 129], можно представить схемы биосинтеза комплексов нанокристаллитов CdS с фитохелатинами в дрожжах *S. pombe* и *C. glabrata* (рис. 7).

V. ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИОСИНТЕЗИРОВАННЫХ КРИСТАЛЛИТОВ CdS

По физико—химическим свойствам биосинтезируемые частицы сульфидов металлов во многом подобны искусственно синтезируемым сульфидам металлов. Спектры поглощения кристаллитов CdS, выделенных из дрожжей и растений, совпадают со спектрами синтетических CdS. Биосинтезированные кристаллиты так же, как и синтетические, проявляют зависимость спектра поглощения от размера кристаллита: при уменьшении диаметра кристаллита ниже определенного порогового значения наблюдается сдвиг длинноволнового края спектра поглощения в коротковолновую сторону. Кристаллиты CdS, синтезируемые дрожжами, образованные на

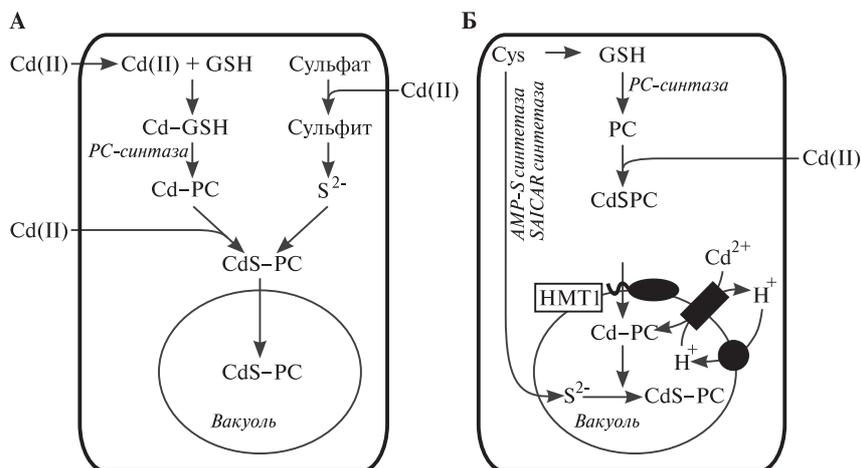


Рис. 7. Схемы возможных путей биосинтеза нанокристаллитов CdS в клетках дрожжей.

А. Комплексы нанокристаллитов CdS с PC синтезируются в цитоплазме *S. glabrata* при использовании сульфида, образующегося при восстановлении сульфата, и накапливаются в вакуолях [89, 111, 141].

Б. Комплексы Cd—PC синтезируются в цитоплазме *S. pombe* и транспортируются в вакуоль, где происходит образование кристаллитов CdS, при использовании сульфида, образующегося из цистеина в реакциях, которые катализируют ферменты пути биосинтеза аденина [72, 105, 111, 119, 129].

поверхности клеток *K. pneumoniae* или в слизистой оболочке *N. muscorum*, подобно типичным неорганическим полупроводникам люминесцируют и проявляют фотохимическую активность.

Первые свидетельства фотохимической активности биосинтезированных частиц CdS представлены в работах, посвященных исследованию механизмов детоксикации кадмия дрожжами [39, 40]. Авторы продемонстрировали способность стабилизированных молекулами глутатиона и γ -глутамилцистеина кристаллитов CdS, которые выделялись из дрожжей *S. glabrata* и *S. pombe*, к фотосенсибилизации восстановления метилвиологена в анаэробных условиях. В аэробных условиях наблюдали фотодиссоциацию кристаллитов CdS вследствие фотоокисления сульфида, входящего в состав CdS.

Кристаллиты CdS, синтезированные на поверхности бактерии *K. pneumoniae*, эффективно поглощают УФ свет, что защищает бактерию от его губительного действия [62]. Благодаря присутствию на поверхности клеток нанокристаллитов CdS бактерия *K. pneumoniae* восстанавливает метилвиологен и метиловый оранжевый при

освещении светом с длиной волны более 350 нм [127]. Фотохимическая активность биосинтезированных *K. pneumonia* полупроводниковых частиц показана также методом ЭПР [65]. Бактериальные образцы, содержавшие или не содержавшие кристаллиты CdS, освещались видимым светом в присутствии спин-ловушек. Бактерии, выращенные в отсутствие ионов кадмия и не обладающие CdS, генерируют слабые, не зависящие от освещения сигналы ЭПР. Эти сигналы тушатся в присутствии CdS. Освещение бактерий, содержащих CdS, приводит к генерации сигналов от радикалов спин-ловушек, вступивших в редокс реакции. Полученные результаты интерпретированы как доказательство того, что синтезированные бактериями кристаллиты CdS фотоактивны и, аналогично синтетическим полупроводникам, способны к сенсбилизации окислительно-восстановительных реакций.

Освещение бактерий *K. pneumonia*, содержащих CdS, ближним УФ светом в отсутствие акцепторов электрона приводит к образованию металлического кадмия [62]. Предполагалось, что металлический кадмий Cd^0 образуется при фотовосстановлении CdS. В работах [1, 2], подтвердивших это предположение, показано образование Cd^0 при выращивании на свету фотосинтезирующей цианобактерии *N. muscorum* в присутствии $Cd(NO_3)_2$. Дифракция электронов и энергодисперсионные спектры рентгеновского характеристического излучения отдельных участков слизистой оболочки клеток, содержащих CdS и металлический кадмий, показали образование Cd^0 непосредственно в кристаллитах CdS. Фотообразование Cd^0 происходит также при фотовосстановлении химически синтезированным CdS ионов кадмия из раствора или катионов Cd^{2+} решетки полупроводника [59, 60, 98, 150]. Механизмы, предлагаемые для фотовосстановления Cd^{2+} решетки полупроводника, включают последовательное или одновременное присоединение двух электронов. Образование Cd^0 может быть также результатом восстановления катионов Cd^{2+} в процессе кооперативного действия электронов зоны проводимости и CO_2^- анион-радикалов, образующихся при фотоокислении карбоновых кислот дырками полупроводника [98].

Нанокристаллиты CdS, стабилизированные глутатионом, сенсбилизуют деструкцию *p*-нитрофенола при освещении светом 366 нм. Образцы с большим отношением сульфид/Cd и меньшим количеством глутатиона наиболее фотоактивны. Перекись водорода значительно повышает эффективность сенсбилизированного CdS фотоокисления *p*-нитрофенола [100].

VI. ФОТОБИОКАТАЛИЗ ПРИ СОПРЯЖЕННОМ ДЕЙСТВИИ ПОЛУПРОВОДНИКОВ И ФЕРМЕНТОВ

Первая работа, в которой была реализована окислительно–восстановительная фотореакция при сопряженном действии неорганического полупроводника и фермента, опубликована 1976 году [4]. Авторы показали фотовыделение водорода из водных суспензий полупроводников (TiO_2 , ZnO), содержащих гидрогеназу из *Thiocapsa roseopersicina* — фермент, катализирующий реакцию $2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2$.

Фотообразование водорода системой неорганический полупроводник — гидрогеназа происходит в результате фотосенсибилизированного полупроводником окисления донора электрона и катализируемого ферментом восстановления субстрата — H^+ с использованием электронов, фотогенерированных в зоне проводимости полупроводника (рис. 8). Переносчик электронов метилвиологен значительно (в 10–20 раз) активирует фотообразование водорода. В первой работе роль донора электрона выполнял фермент, поэтому реакция длилась не более 2 часов. В последующем показано, что введение в систему тиосоединений, органических кислот, спиртов и др. приводит к значительной активации процесса, повышает его длительность и предотвращает инактивацию фермента [8, 10, 14, 35–37, 101]. При использовании оксидных широкозонных полупроводников TiO_2 и ZnO для осуществления фотореакции необходимо освещение ближним УФ светом (в цитируемых выше работах использовали линии ртути 365 нм). Применение в последующем в качестве фотосенсибилизатора сульфида кадмия

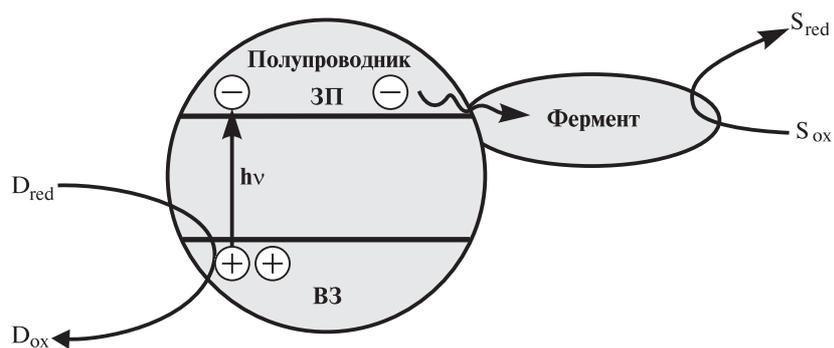


Рис. 8. Фотокатализ при безмедиаторном сопряженном действии неорганического полупроводника и фермента.

D — донор электрона; S — субстрат фермента; ЗП — зона проводимости; ВЗ — валентная зона.

позволило реализовать фотообразование водорода на видимом свете ($\lambda < 515$ нм) [5, 9, 11, 36].

На примере фотообразования водорода впервые показана возможность использования фермента в качестве катализатора редокс процесса, фотосенсибилизированного неорганическим полупроводником. В последующем механизм фотообразования водорода в подобных системах детально изучался [8, 10, 14, 35–37, 98, 101–104, 122, 123]. Осуществлено также фотовосстановление NAD^+ и NADP^+ [49, 122, 123, 151], фотофиксация CO_2 [70, 71, 77], фотовосстановление нитратов [152], фотосинтез органических кислот и аминокислот при сопряженном действии неорганических полупроводников и ферментов [49, 151].

Фотохимическая регенерация NADH и NADPH достигается при сопряжении TiO_2 и CdS с оксидоредуктазами с помощью метилвиологена [49, 151]. В описанных системах при освещении суспензий полупроводников в присутствии донора электрона меркаптоэтанола или формиата происходит восстановление метилвиологена, который используется в последующих реакциях восстановления NAD или NADP , катализируемых липоамиддегидрогеназой или ферредоксин– NADP –редуктазой, соответственно. Цикл восстановления коферментов сопрягается с реакциями синтеза органических соединений — восстановлением оксалоацетата до малата в присутствии малатдегидрогеназы или же аминированием пирувата с образованием аланина в присутствии аланиндегидрогеназы. Лимитирующей стадией реакции фотовосстановления NAD и NADP является окисление донора электрона (формиата) дырками, фотогенерированными в полупроводнике. Квантовый выход реакции достигает 1%.

Фотокаталитическая фиксация CO_2 достигнута при сопряженном действии CdS , ZnS и ряда ферментов [70, 71, 77]. В работе [70] использовали изоцитрат–дегидрогеназу, которая при окислении метилвиологена, фотовосстановленного сульфидом кадмия, катализирует присоединение CO_2 к оксоглутаровой кислоте с образованием изоцитрата. На основании анализа измеренных значений констант Михаэлиса было сделано предположение о том, что лимитирующей стадией является карбоксилирование оксоглутарата. В последующем [71] описана аналогичная система, содержащая малат–дегидрогеназу, катализирующую присоединение CO_2 к пирувату с образованием малата. Интересной идеей явилось использование в качестве донора электрона молочной кислоты, которая при фотоокислении дырками полупроводника превращалась в субстрат ферментативной реакции — пируват. Отмечено, однако,

уменьшение активности фермента в присутствии молочной кислоты. В более сложной системе [77] осуществлено фотосенсибилизированное ZnS восстановление CO_2 до метанола с использованием метанол-дегидрогеназы и пирролохинолинхинона (переносчик электрона). Реакция разделяется на две стадии. На первой стадии происходит фотосенсибилизированное ZnS восстановление CO_2 до формиата с окислением донора электрона — изопропанола. На второй — катализируемое ферментом восстановление формиата до метанола и окисление переносчика электронов. Квантовый выход суммарной реакции достигает 5,9%, что является, как сообщили авторы статьи, самым высоким значением из наблюдавшихся для реакции фотовосстановления CO_2 до метанола. Отмеченным недостатком системы является то, что при накоплении определенного количества метанола дальнейшее его образование прекращается вследствие протекания обратной ферментативной реакции, а также окисления спирта фотогенерированными в полупроводнике дырками.

Суспензии и коллоиды TiO_2 , содержащие нитратредуктазу, фотосенсибилизируют восстановление нитрата до нитрита [152]. Сопряжение частицы полупроводника с ферментом достигается с помощью переносчика электрона N-метил-N'-пропил-4,4'-дипиридила, ковалентно связанного с полиэтиленамином, который покрывает поверхность полупроводника.

ФОТОКАТАЛИЗ ПРИ ПРЯМОМ ПЕРЕНОСЕ ЭЛЕКТРОНОВ ОТ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПОЛУПРОВОДНИКА К ФЕРМЕНТУ

Необходимым условием участия фермента в фотореакции, сенсibilизированной полупроводником, является обеспечение переноса фотогенерированного в частице полупроводника электрона к активному центру фермента. В большинстве работ по сопряженному действию полупроводников и ферментов для этого использовали переносчики электрона — метилвиологен, бипиридинный комплекс родия и др. Однако еще в первых публикациях показан прямой перенос электрона от полупроводника к ферменту [4, 8, 37]. Реализация ферментативной реакции при прямом переносе электронов, фотогенерируемых в зоне проводимости полупроводника, к реакционному центру фермента представляет особый интерес, указывая на возможность создания фотобиокатализаторов на основе неорганических полупроводников и связанных с ними ферментов. Действительно, частицу неорганического полупроводника, с поверхностью которой связан фермент, можно рассматривать как катализатор, способный при действии света осуществлять

восстановление субстрата фермента, используя в качестве донора электрона самые разнообразные соединения (см. рис. 8).

Фотореакцию при безмедиаторном сопряжении неорганического полупроводника и фермента можно разделить на несколько стадий, оказывающих влияние на эффективность процесса: связывание фермента с поверхностью частицы полупроводника; поглощение света частицами полупроводника; окисление донора электрона полупроводником; перенос фотогенерированных электронов из зоны проводимости полупроводника к реакционным центрам фермента; восстановление ферментативного субстрата с образованием продукта реакции. Исследования фотообразования водорода при сопряженном действии неорганических полупроводников и гидрогеназ показали, что необходимым и во многих случаях лимитирующим условием эффективного использования электронов, фотогенерированных в частицах полупроводника, в ферментативной реакции является характер связывания фермента с поверхностью полупроводника [9–12, 14, 35–37, 98, 102]. От характера взаимодействия фермента с полупроводником зависит возможность и эффективность как прямого переноса электронов от полупроводника к активному центру фермента, так и их дальнейшего использования в энзиматической реакции.

С целью получения фотокатализатора образования водорода гидрогеназы из *Clostridium pasterianum*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Alcaligenes eutrophus* и *Thiocapsa roseopersicina* иммобилизовались различными способами на частицах TiO_2 и CdS [70, 71, 77]. Иммобилизация ферментов адсорбцией или ковалентной сшивкой с силанированным полупроводником приводила к частичной инактивации фермента. Высокая степень связывания фермента при сохранении 37% ферментативной активности в системе достигалась в случае ковалентного связывания гидрогеназы *D. desulfuricans* на полупроводниках, однако проводимая при этом предварительная обработка поверхности полупроводника ухудшала его фотохимические свойства. Наибольшие скорости фотообразования H_2 получены с адсорбированной на TiO_2 гидрогеназой *D. desulfuricans*. В этом случае скорость фотообразования H_2 , сенсibilизированного TiO_2 и катализированного иммобилизованной гидрогеназой в присутствии доноров электрона (0,1 М ЭДТА) и переносчика электронов — метилвиологена, была сравнима со скоростью образования водорода аналогичной системой, содержащей вместо гидрогеназы платину. Гидрогеназа, ковалентно связанная с поверхностью частицы полупроводника, не была способна воспринимать фотогенерированные электроны в отсутствие переносчика электрона. Одновременная

иммобилизация фермента и переносчика электрона виологена позволила наблюдать фотосенсибилизированное TiO_2 выделение водорода, однако в ходе фотореакции происходило фотоокисление медиатора. Фотообразование водорода при безмедиаторном сопряжении фермента и полупроводника удалось наблюдать лишь в случае адсорбции гидрогеназ на поверхности полупроводника TiO_2 .

Исследования взаимосвязи условий сорбции гидрогеназ на полупроводниках TiO_2 и CdS и безмедиаторного фотообразования H_2 позволили выяснить, каким образом характер взаимодействия фермента с полупроводником определяет эффективность прямого переноса электронов и их использования адсорбированным ферментом [9, 10, 11, 89, 98, 102, 122].

Адсорбция гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* на оксидных полупроводниках (TiO_2 , ZnO), заряд поверхности которых зависит от рН вследствие амфотерности поверхностных гидроксильных групп, происходит главным образом за счет электростатического взаимодействия фермента с полупроводником [10, 14, 102]. Катионы щелочноземельных металлов, адсорбция которых на поверхности частиц полупроводника приводит к изменению поверхностного заряда, оказывают влияние на связывание фермента с TiO_2 . При нейтральных и щелочных рН центрами связывания отрицательно заряженных при рН > 4,2 молекул гидрогеназы на поверхности TiO_2 , изоэлектрическая точка которого равна 3,5, могут служить адсорбированные на частицах TiO_2 катионы Ca , Cd , Zn или органические катионы. В кислой области рН возможна сорбция гидрогеназы на положительно заряженных центрах TiO_2 , образующихся вследствие протонирования поверхностных гидроксильных групп.

При обеспечении электростатического связывания гидрогеназы с поверхностью TiO_2 посредством катионов кальция (рис. 9а) квантовая эффективность фотообразования H_2 при прямом переносе электронов от частиц полупроводника достигает 20% [14]. Тот факт, что в этих условиях удельная активность фермента, использующего в качестве восстановителя фотогенерированные в полупроводнике электроны, близка к активности гидрогеназы, использующей в качестве донора электрона растворимый субстрат — восстановленный метилвиологен, указывает, с одной стороны, на высокую эффективность прямого переноса электронов от полупроводника к ферменту, с другой — на лимитирование процесса в целом ферментом. По-видимому, связывание гидрогеназы с поверхностью TiO_2 посредством катионов кальция обеспечивает ориентацию фермента, благоприятствующую переносу электронов от полупроводника к реакционным центрам фермента.

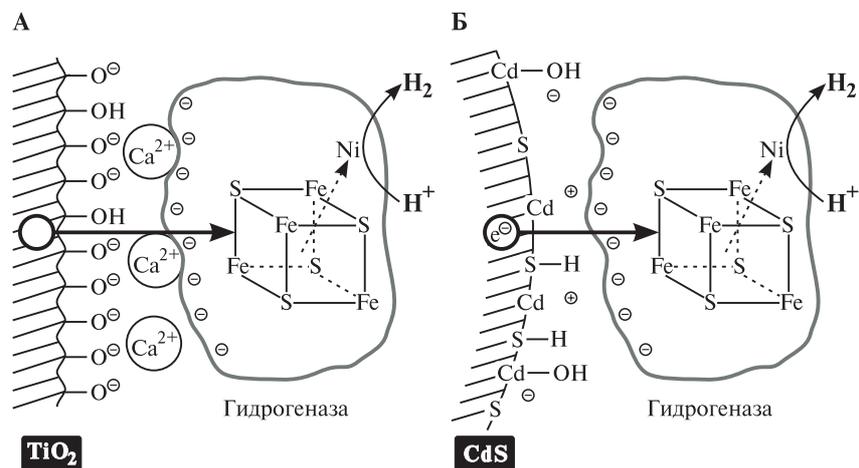


Рис. 9. Фотообразование водорода при прямом фотоиндуцированном переносе электрона от диоксида титана — (А) и от сульфида кадмия — (Б) к гидрогеназе [10, 11, 14, 98, 102].

Иной характер имеет взаимодействие гидрогеназы с CdS — неорганическим полупроводником, имеющим отличные от оксидных полупроводников поверхностные и энергетические свойства, способным поглощать свет в видимом диапазоне спектра ($\lambda < 515$ нм). Сульфид кадмия эффективно адсорбирует ферменты различной природы: гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* и *Alcaligenes eutrophus*, ферредоксин–NADP–оксидоредуктазу из *Chlorella* и др., что обеспечивает фотообразование молекулярного водорода и фотвосстановление никотинамидного кофермента NAD^+ при безмедаторном сопряженном действии CdS и ферментов [9, 11, 98, 122].

Гидрогеназа *T. roseopersicina* сорбируется на CdS в различных буферных растворах — фосфатном, трис, MES, HEPES, а также в воде в широком диапазоне pH. Двухвалентные катионы Ca, Cd, Zn, которые значительно активируют сорбцию гидрогеназы на TiO_2 , практически не влияют на сорбцию гидрогеназы на CdS . Некоторое улучшение связывания фермента при снижении pH объясняется присутствием на поверхности CdS двух типов функциональных центров: центров Бренстеда и центров Льюиса, для которых потенциалопределяющими являются ионы H^+ и OH^- , или Cd^{2+} и S^{2-} , соответственно (рис. 9б). Количество центров Бренстеда на поверхности CdS невелико, но возможно, что при понижении pH их роль в обеспечении сорбции гидрогеназы становится заметной. Десорбция гидрогеназы при повышении pH показывает, что гидрогеназа

обратимо сорбируется на положительно заряженных центрах CdS. Однако данные по сорбции гидрогеназы при pH 6—7 в различных буферных растворах, а также в воде, когда количество положительно заряженных центров на поверхности полупроводника мало (ИЭТ CdS находится при pH 6), указывают на то, что протонированные центры не являются единственными в обеспечении сорбции гидрогеназы на CdS.

В водных суспензиях CdS так же, как и в суспензиях TiO₂ и ZnO, наблюдается фотообразование H₂ при прямом переносе электрона от неорганического полупроводника CdS к ферменту (рис. 96) в присутствии доноров электрона: дитиотреитола, цистеина, глицерина, метанола, ЭДТА, аскорбата [10, 11, 98]. Однако квантовая эффективность реакции (1—2%) значительно ниже, чем в суспензиях оксидных полупроводников; переносчик электронов метилвиологен значительно активизирует фотообразование H₂ в суспензиях CdS. Эти факты, а также линейная зависимость фотообразования H₂ от интенсивности света в суспензиях CdS дают основание предположить, что лимитирующей стадией безмедиаторного фотообразования H₂, осуществляемого CdS и гидрогеназой, является перенос электронов от полупроводника к ферменту. Причиной этого может быть случайная или неблагоприятная ориентация сорбированной на поверхности CdS гидрогеназы, при которой перенос электрона на редокс-центр белка, служащий первичным акцептором электрона, затруднен.

УЧАСТИЕ МЕТАЛЛОВ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЯХ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ СУЛЬФИДОМ КАДМИЯ

Особенностью неорганических полупроводников как фотосенсибилизаторов является их способность связывать продукты фотореакции на своей поверхности. В частности, показано фотоосаждение металлов на поверхности ряда неорганических полупроводников в результате фотовосстановления катионов металлов. Модификация поверхности полупроводниковых частиц металлами влияет на реакции, фотосенсибилизированные полупроводниками [50]. Покрытие поверхности частиц CdS некоторыми металлами (кадмием, свинцом, серебром) оказывает также существенное влияние на фотореакции при сопряженном действии неорганических полупроводников и ферментов, увеличивая скорости образования продуктов ферментативных реакций (водорода, NADH, NADPH) [11, 98, 99, 122]. В ходе этих исследований обнаружено, что некоторые оксидоредуктазы способны использовать в фермен-

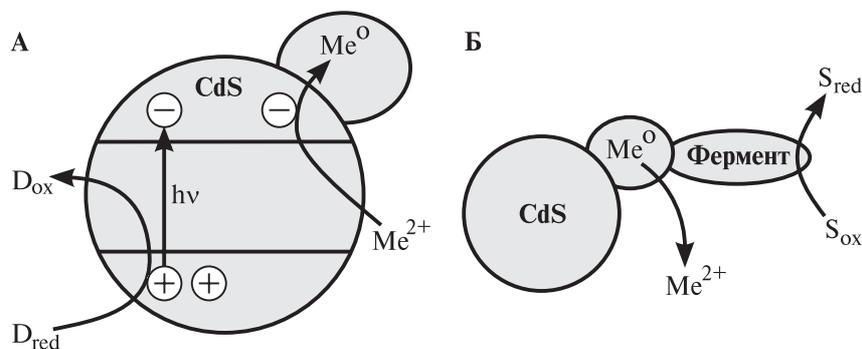


Рис. 10. Участие металла в фотосенсибилизированной сульфидом кадмия ферментативной реакции в качестве регенируемого субстрата ферментов.

А. Фотосенсибилизированное полупроводником восстановление иона металла (Me^{2+}).

Б. Катализируемое оксидоредуктазой окисление металла (Me^0 в темновой реакции с образованием продукта — S_{red} (H_2 , NAD , NADH) [11, 98, 99, 122].

D — донор электрона.

тативной реакции в качестве субстратов—доноров электрона фотогенерированные на поверхности частиц полупроводника металлические кадмий и свинец [11, 98, 99, 122, 123].

В условиях фотообразования металлического кадмия на поверхности полупроводниковых частиц процессы фотовосстановления NAD^+ и фотообразования H_2 при безмедиаторном сопряженном действии CdS и NAD—зависимой гидрогеназы *Alcaligenes eutrophus* или гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* можно разделить на световую и темновую стадии [11, 98, 99, 122]. В ходе световой стадии происходит фотообразование металла, в ходе темновой стадии — катализируемое ферментом окисление металла с образованием продукта ферментативной реакции (рис. 10). Серебро — металл, не окисляемый используемыми ферментами, также активирует фотообразование водорода. Однако в этом случае фотореакция заканчивается при прекращении освещения. Результаты этих исследований позволили представить механизм активации металлом фотореакции с участием фермента и полупроводника. Предполагается, что металл повышает эффективность фотореакции, активируя перенос фотогенерированных в полупроводнике электронов к реакционным центрам ферментов и участвуя в ферментативной реакции в качестве субстрата—донора электронов.

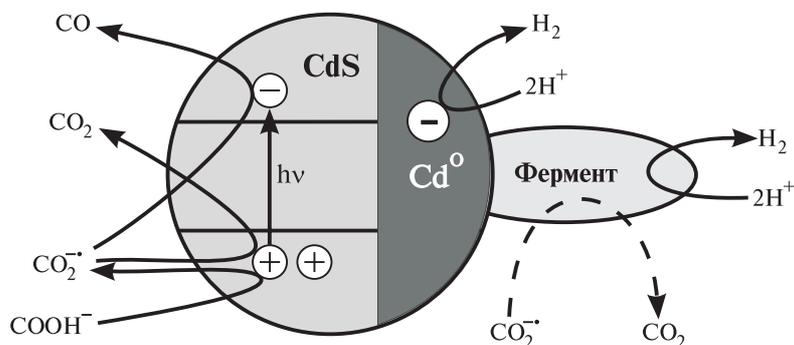


Рис. 11. Схема фоторазложения формиата, сенсibilизированного покрытыми металлическим кадмием частицами CdS в присутствии гидрогеназы [98].

Фермент в системе донор электрона—полупроводник—фермент прямо не участвует в фотоокислении донора электрона, обеспечивая использование фотогенерированных электронов для образования специфического продукта (NADH, H_2 и др.), который, как правило, не образуется в отсутствие фермента. Однако, как показало исследование влияния гидрогеназы на сенсibilизированную сульфидом кадмия фотодеструкцию формиата, присутствие фермента может оказать влияние на фотореакцию, для которой не требуется фермент [98]. Сульфид кадмия в анаэробных условиях фотосенсibilизирует деструкцию формиата с образованием CO_2 , CO , H_2 . Выделение H_2 в этой реакции катализируется металлическим кадмием, образующимся при фотовосстановлении Cd^{2+} решетки полупроводника. Гидрогеназа изменяет соотношения продуктов сенсibilизированной CdS анаэробной фотодеструкции формиата и увеличивает квантовый выход фотореакции в целом. Эти результаты объясняются совместным действием металлического кадмия и гидрогеназы как катализаторов образования водорода и влиянием фермента на стадию фотореакции, определяющую ее скорость. На рис. 11 представлена схема реакций при фотодеструкции формиата в суспензии сульфида кадмия, содержащей гидрогеназу.

Основной целью исследований сопряженного действия неорганических полупроводников и ферментных систем было выяснение механизма фотореакций в условиях межфазного переноса от полупроводниковых частиц к ферментам и разработка фотобиотехнологических систем, способных преобразовывать энергию света в химическую. Однако, исследования такого рода указывают также на возможные пути участия биосинтезированных неорганических полупроводников в фотопроцессах, протекающих в живых организмах.

VII. СОПРЯЖЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛУПРОВОДНИКОВ С БАКТЕРИЯМИ

В 1985 году установлена возможность осуществления фотореакции при сопряженном действии полупроводников и бактерий [6, 7, 76]. При освещении водных суспензий оксидов титана, цинка или сульфида кадмия, содержащих бактерии *Clostridium butyricum*, доноры электрона и метилвиологен, наблюдалось образование водорода. Предложен следующий механизм фотореакции: под действием света полупроводники окисляют доноры электронов и восстанавливают метилвиологен, который благодаря способности в восстановленном состоянии проникать сквозь липидные мембраны переносит электроны от частицы полупроводника к содержащейся в клетках бактерий гидрогеназе, катализирующей образование молекулярного водорода (рис. 12). В ряде случаев наблюдалось фотообразование водорода и в отсутствие переносчика электронов, т.е. при прямом переносе электронов от полупроводника к ферменту, находящемуся внутри бактерий. Авторы [6, 7] не рассматривали возможность такого рода процессов с участием биосинтезированных полупроводников и лишь высказали предположение, что в процессе биологической эволюции неорганические полупроводники, содержащиеся в земной коре, могли поддерживать примитивный метаболизм пробионтов и первичных микроорганизмов, обеспечивая их активными восстановителями. Учитывая данные о биосинтезе неорганических полупроводников внутри и на поверхности клеток и фотохимической активности биосинтезированных полупроводников, можно предположить также участие неорганических полупроводников в обеспечении энергией микроорганизмов, существующих в настоящее время.

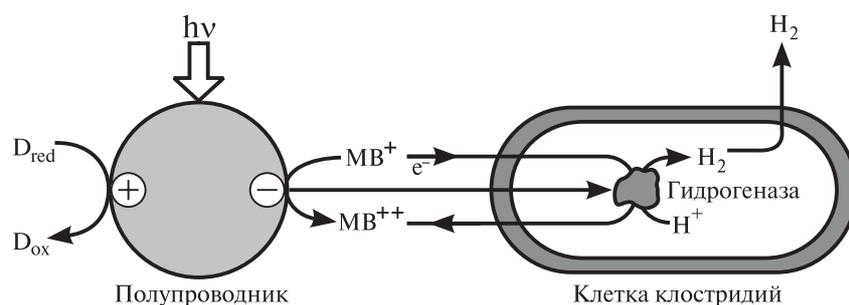


Рис. 12. Фотообразование водорода при сопряжении неорганического полупроводника с клетками бактерий.

D — донор электрона, MV — метилвиологен [6, 7, 76].

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, практически все типы живых организмов способны к биосинтезу неорганических соединений, которые по своей природе и свойствам являются неорганическими полупроводниками. Неорганические полупроводники синтезируются внутри клеток, на их поверхности или вне клеток в зависимости от вида полупроводника и организма, его синтезирующего. Частицы биосинтезированных неорганических полупроводников в большинстве случаев связаны с клетками, белками или пептидами. Их размеры варьируют от десятков микрон вне клеток до десятков ангстрем внутри клеток или на их поверхности. Некоторые из биосинтезированных неорганических полупроводников, такие как частицы гидроокиси железа, связанные с ферритином, или магнетит в магнитных бактериях, постоянно необходимы для жизнедеятельности организмов, их содержащих. Другие, подобно сульфиду кадмия, образуются лишь в определенных условиях для перенесения организмами неблагоприятных условий среды.

Как видно из вышеизложенного, данных по фотореакциям с участием неорганических полупроводников *in vivo* пока немного. Однако, учитывая высокую фотохимическую активность неорганических полупроводников, вероятность конструктивных или деструктивных фотохимических процессов с их участием в клетках организмов весьма велика. Возможно, что фотокаталитические реакции при сопряженном действии неорганических полупроводников и ферментов, подобные рассмотренным в этом обзоре, имеют место *in vivo*.

Следует отметить, что некоторые из продемонстрированных *in vitro* фотореакций с участием биосинтезированных неорганических полупроводников могут иметь большие отрицательные последствия в случае их протекания в клетках. Фотовосстановление нанокристаллов гидроокиси железа, включенных в молекулу ферритина, в определенных условиях может привести к их растворению и образованию большого количества ионов Fe^{2+} , которые способны инициировать каталитические окислительные процессы, что может вызвать гибель клеток или заболевание организма. Такие процессы весьма вероятны в содержащих ферритин микроорганизмах, растениях и клетках кожи на солнечном свете. Фотодиссоциация кристаллитов CdS , приводящая к образованию токсичных ионов Cd^{2+} , также может быть губительной для микроорганизмов и растений, синтезирующих CdS .

Дальнейшее исследование фотореакций с участием неорганических полупроводников *in vitro* и *in vivo* важно для понимания процессов, протекающих в клетках на свету, и выявления способов защиты от деструктивного действия света.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 99–04–49428).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бекасова О.Д., Орлеанский В.К., Никандров В.В. // Микробиология. 1999. Т. 68. С. 851–859.
2. Бекасова О.Д., Орлеанский В.К., Никандров В.В. // Физиол. растений. 2000. Т. 47. С. 1–9.
3. Гуревич, Ю.Я., Плесков, Ю.В. // Фотоэлектрохимия полупроводников. М.: Наука. 1983.
4. Красновский А.А., Брин Г.П., Никандров В.В. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 229. С. 990–993.
5. Красновский А.А., Брин Г.П., Луганская А.Н., Никандров В.В. // Докл. АН СССР. 1979. Т. 249. С. 896–899.
6. Красновский А.А., Никандров В.В., Никифорова С.А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. С. 1467–1471.
7. Красновский А.А., Никандров В.В. // Природа. 1988. С. 39–41.
8. Никандров В.В., Брин Г.П., Красновский А.А. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 256. С. 1249–1253.
9. Никандров В.В., Аристархов А.И., Шлык М.А., Красновский А.А. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 319. С. 242–245.
10. Никандров В.В., Шлык М.А., Зорин Н.А., Гоготов И.Н., Красновский А.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. С. 990–994.
11. Никандров В.В., Шумилин И.А., Недолужко А.И., Зорин А.А., Попов В.О., Красновский А.А. // Докл. АН СССР. 1994. Т. 335. С. 802–805.
12. Никандров В.В. // Биол. мембраны. 1998. Т. 15. С. 598–609.
13. Сенцова О.Я., Максимов В.Н. // Успехи микробиологии. 1985. Т. 20. С. 227–252.
14. Шлык М.А., Никандров В.В., Зорин Н.А., Красновский А.А. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 1598–1606.
15. Aiking H., Kok K., van Heerikhuizen H., van't Reit J. // Appl. Environ. Microbiol. 1982. Vol. 44. P. 938–944.
16. Aiking H., Stijnman A., van Garderen C., van Heerikhuizen H., van't Riet J. // Appl. Environ. Microbiol. 1984. Vol. 47. P. 374–377.
17. Aiking H., Govers H., van't Riet J. // Appl. Environ. Microbiol. 1985. Vol. 50. P. 1262–1267.
18. Andrews S.C. // Adv. Microb. Physiol. 1998. Vol. 40. P. 281–351.
19. Applegate L.A., Frenk E. // Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 1995. Vol. 11. P. 95–101.
20. Applegate L.A., Noel A., Vile G., Frenk E., Tyrrell R.M. // Photochem. Photobiol. 1995. Vol. 61. P. 285–291.
21. Applegate L.A., Scaletta C., Panizzon R., Frenk E. // J. Invest. Dermatol. 1998. Vol. 111. P. 159–163.
22. Aubailly M., Salmon S., Haigle J., Bazin M., Mazjere J.C., Santus R. // J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 1994. Vol. 26. P. 185–191.
23. Bae W., Mehra R.K. // J. Inorg. Biochem. 1997. Vol. 68. P. 201–210.

24. *Bae W., Mehra R.K.* // *J. Inorg. Biochem.* 1998. Vol. 69. P. 33–43.
25. *Barbas J., Santhanagopalan V., Blaszczyński M., Ellis W.R. Jr., Winge D.R.* // *J. Inorg. Biochem.* 1992. Vol. 48. P. 95–105.
26. *Briat J.F., Fobisloisy I., Grignon N., Lobreaux S., Pascal N., Savino G., Thoiron S., Vonwiren N., Vanwuytswinkel O.* // *Biol. Cell.* 1995. Vol. 84. P. 69–81.
27. *Briat J.F., Lobreaux S.* // *Met. Ions. Biol. Syst.* 1998. Vol. 35. P. 563–584.
28. *Cavallo S., Mei G., Stefanini S., Rosato N., Finazzi-Agro A., Chiancone E.* // *Protein. Sci.* 1998. Vol. 7. P. 427–432.
29. *Chasteen N.D., Theil E.C.* // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 7672–7677.
30. *Chasteen N.D.* // *Met. Ions. Biol. Syst.* 1998. Vol. 35. P. 479–514.
31. *Chasteen D.N., Harrison P.M.* // *J. Struct. Biology.* 1999. Vol. 126. P. 182–194.
32. *Cheng Y.G., Chasteen N. D.* // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. P. 2947–2953.
33. *Coblentz A., Wolf K.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 1994. Vol. 14. P. 303–308.
34. *Crichton R.R., Ward R.J.* // *Met. Ions. Biol. Syst.* 1998. Vol. 35. P. 633–665.
35. *Cuendet P., Grötzel M., Pelaprat M.L.* // *J. Electroanal. Chem.* 1984. Vol. 181. P. 173–185.
36. *Cuendet P., Grötzel M., Rao K.K., Hall D.O.* // *Photobiochem. Photobiophys.* 1984. Vol. 7. P. 331–340.
37. *Cuendet P., Rao K.K., Grötzel M., Hall D.O.* // *Biochimie.* 1986. Vol. 68. P. 217–221.
38. *Cunningham D.P., Lundie L.L.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. Vol. 59. P. 7–14.
39. *Dameron C.T., Reese R.N., Mehra R.K., Kortan A.R., Carroll P.J., Steigerwald M.L., Brus L. E., Winge D.R.* // *Nature.* 1989. Vol. 338. 596–597.
40. *Dameron C.T., Smith B.R., Winge D.R.* // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 17355–17360.
41. *Dameron C.T., Winge D.R.* // *Inorg. Chem.* 1990. Vol. 29. P. 1343–1348.
- 42a. *Donlin M.J., Frey R.F., Putnam C., Proctor J., Bashkin J.K.* // *J. Chem. Educ.* 1998. Vol. 75. P. 437–441.
42. *de Silva D., Guo J.H., Aust S.D.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1993. Vol. 303. P. 451–455.
43. *Douglas T., Ripoll D.R.* // *Protein. Sci.* 1998. Vol. 7. P. 1083–1091.
44. *Engel D.W., Brouwer M.* // *Environ. Health. Perspect.* 1986. Vol. 65. P. 87–92.
45. *Ferreira A.M., Ciriolo M.R., Marrocchi L., Rotilio G.* // *Biochem. J.* 1993. Vol. 292. P. 673–679.
46. *Finder D.A.S., Tipping E., Jarowski G.H.M., Reynolds C.S.* // *Nature.* 1984. Vol. 309. P. 783–784.
47. *Ford G.C., Harrison P.M., Rice D.W., Smith J.M., Treffry A., White J.L., Yariv J.* // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1984. Vol. 304. P. 551–565.
48. *Gadd G.M., Griffiths A.J.* // *Microbiol. Ecol.* 1978. Vol. 4. P. 303–317.
49. *Goren Z., Lapidot N., Willner I.* // *J. Mol. Cat.* 1988. Vol. 47. P. 21–32.
50. *Grötzel M. (Ed)* // *Energy resources through photochemistry and catalysis.* N. Y.: Acad. Press. 1983. P. 632.
51. *Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H.* // *Science.* 1985. Vol. 230. P. 674–676.
52. *Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. Vol. 84. P. 439–443.
53. *Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H.* // *Methods Enzymol.* 1991. Vol. 205. P. 333–341.
54. *Grossman M.J., Hinton S.M., Minak-Bernero V., Staughter C., Stiefel, E.I.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 2419–2423.

55. *Harrison P.M., Hoy T.G., Macara I.G., Hoare R.J.* // *Biochem. J.* 1974. Vol. 143. P. 445—451.
56. *Harrison P.M., Arosio P.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. Vol. 1275. P. 161—203.
57. *Harrison P.M., Hempstead P.D., Artymiuk P.J., Andrews S.C.* // *Met. Ions. Biol. Syst.* 1998. Vol. 35. P. 435—477.
58. *Henglein A.* // *J. Chem. Phys.* 1987. Vol. 84. P. 1043—1047.
59. *Henglein A.* // *Topics in Current Chemistry.* 1988. Vol. 143. P. 114—181.
60. *Henglein A., Fojtic A., Weller H.* // *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 1987. Vol. 91. P. 41—54.
61. *Henglein A.* // *Chem. Rev.* 1989. Vol. 89. P. 1861—1873.
62. *Holmes J.D., Smith P.R., Ewans-Gowing R., Richardson D.J.* // *Photochem. Photobiol.* 1995. Vol. 62. P. 1022—1026.
63. *Holmes J.D., Smith P.R., Evans-Gowing R., Richardson D.J., Russell D.A., Sodeau J.R.* // *Archiv. Microbiol.* 1995. Vol. 163. P. 143—147.
64. *Holmes J.D., Richardson D.J., Saed S., Evans-Gowing R., Russell D.A., Sodeau J.R.* // *Microbiology—UK.* 1997. Vol. 143. P. 2521—2530.
65. *Holmes J.D., Farrar J.A., Richardson D.J., Russell D.A., Sodeau J.R.* // *Photochem. Photobiol.* 1997. Vol. 65. P. 811—817.
66. *Howden R., Goldsbrough P.B., Andersen C.R., Cobbett C.S.* // *Plant. Physiol.* 1995. Vol. 107. P. 1059—1066.
67. *Howden R., Andersen C.R., Goldsbrough P.B., Cobbett C.S.* // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 107. P. 1067—1073.
68. *Hudson A.J., Andrews S.C., Hawkins C., Williams J.M., Izuhara M., Meldrum F.C., Mann S., Harrison P.M., Guest J.R.* // *Eur. J. Biochem.* 1993. Vol. 218. P. 985—995.
69. *Hunter T.C., Mehra R.K.* // *J. Inorg. Biochem.* 1998. Vol. 69. P. 293—303.
70. *Inoue H., Kubo Y., Yoneyama H.* // *J. Chem. Soc. Faraday. Trans.* 1991. Vol. 87. P. 553—558.
71. *Inoue H., Yamachika M., Yoneyama H.* // *J. Chem. Soc. Faraday. Trans.* 1992. Vol. 88. P. 2215—2222.
72. *Juang R.H., Mccue K.F., Ow D.W.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1993. Vol. 304. P. 392—401.
73. *Kneer R., Zenk M.H.* // *Phytochemistry.* 1997. Vol. 44. P. 69—74.
74. *Kondo N., Imai K., Isobe M., Goto T., Murasugi A., Wada-Nakagawa C., Hayashi Y.* // *Tetrahedron Lett.* 1984. Vol. 25. P. 3869—3872.
75. *Krasnovsky A.A.* // *Photosynth. Res.* 1992. Vol. 33. P. 177—193.
76. *Krasnovsky A.A., Nikandrov V.V.* // *FEBS Lett.* 1987. Vol. 219. P. 93—96.
77. *Kuwabata S., Nishida K., Tsuda R., Inoue H., Yoneyama H.* // *J. Electrochem. Soc.* 1994. Vol. 141. P. 1489—1505.
78. *Laulhere J.P., Laboure A.M., Briat J.F.* // *Biochem. J.* 1990. Vol. 269. P. 79—84.
79. *Laulhere J.P., Barcelo F., Fontecave M.* // *Biometals.* 1996. Vol. 9. P. 303—309.
80. *Leland K., Bard A.J.* // *J. Phys. Chem.* 1987. Vol. 91. P. 5076—5083.
81. *Li Z.S., Lu Y.P., Szczyпка M., Thiele D.J., Rea P.A.* // *Plant. Physiol.* 1997. Vol. 114. P. 50—580.
82. *Li Z.S., Lu Y.P., Zhen R.G., Szczyпка M., Thiele D.J., Rea P.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. P. 42—47.
83. *Mann S.* // *Nature.* 1988. Vol. 332. P. 119—124.
84. *Mann S., Williams J.M., Treffry A., Harrison P.M.* // *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 198. P. 405—416.
85. *Massover H.* // *Micron.* 1993. Vol. 24. P. 389—486.

86. Matzanke B. F., Muller G. I., Bill E., Trautwein A.X. // Eur. J. Biochem. 1989. Vol. 183. P. 371—379.
87. Mehra R.K., Kodati V.R., Abdullah R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. Vol. 215. P. 730—736.
88. Mehra R.K., Winge D.R. // J. Cell. Biochem. 1991. Vol. 45. P. 30—40.
89. Mehra R.K., Mulchandani P., Hunter T.C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. Vol. 200. P. 1193—1200.
90. Mehra R.K., Mulchandani P. // Biochem. J. 1995. Vol. 307. P. 697—705.
91. Mehra R.K., Miclat J., Kodati V.R., Abdullah R., Hunter T.C., Mulchandani, P. // Biochem. J. 1996. Vol. 314. P. 73—82.
92. Mills A., Le Hunte S. // J. Photochem. Photobiol., A. Chem. 1997. Vol. 108. P. 1—35.
93. Minney S.F., Quirk A.V. // Microbios. 1985. Vol. 42. P. 37—44.
94. Moore G.R., Mann S., Bannister J.V. // J. Inorg. Biochem. 1986. Vol. 28. P. 329—336.
95. Morliere P., Salmon S., Aubailly M., Risler A., Santus R. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. Vol. 1334. P. 283—290.
96. Murasugi A., Wada—Nakagawa C., Hayashi Y. // J. Biochem. (Tokyo) 1984. Vol. 96. P. 1375—1379.
97. Mutoh N., Hayashi Y. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988. Vol. 151. P. 32—39.
98. Nedoluzhko A.I., Shumilin I.A., Nikandrov V.V. // J. Phys. Chem. 1996. Vol. 100. P. 17544—17550.
99. Nedoluzhko A.I., Shumilin I.A. Mazhorova L.E., Popov V.O., Nikandrov V.V. // Bioelectrochem. Bioenerg. 2000. In Press.
100. Nguen L., Kho R., Bae W., Mehra R.K. // Chemosphere. Vol. 1. P. 155—173.
101. Nikandrov V.V., Brin G.P., Krasnovsky A.A. // Photobiochem. Photobiophys. 1983. Vol. 6. P. 101—107.
102. Nikandrov V.V., Shlyk M.A., Zorin N.A., Gogotov I.N., Krasnovsky A.A. // FEBS Lett. 1988. Vol. 234. P. 111—114.
103. Nikandrov V.V., Grötzel C., Moser J.—E., Grötzel M. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1997. Vol. 41. P. 83—89.
104. Nikandrov V.V. // Membr. Cell. Biol. 1988. Vol. 12. P. 755—769.
105. Ortiz D.F., Kreppel L., Speiser D.M., Scheel G., McDonald G., Ow D.W. // EMBO. J. 1992. Vol. 11. P. 3491—3499.
106. Ow D.W. // In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant. 1993. Vol. 29. P. 213—219.
107. Pickering I.J., Prince R.C., George G.N., Rauser W.E., Wickramasinghe W.A., Watson A.A., Dameron C.T., Dance I.G., Fairlie D.P., Salt D.E. // BBA—Protein. Struct. Mol. Enzym. 1999. Vol. 1429. P. 351—364.
108. Pourzand C., Watkin R.D., Brown J.E., Tyrrell R.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 6751—6756.
109. Powell A.K. // Met. Ions. Biol. Syst. 1998. Vol. 35. P. 515—561.
110. Rauser W.E. // Annu. Rev. Biochem. 1990. Vol. 59. P. 61—86.
111. Rauser W.E. // Plant Physiol. 1995. Vol. 109. P. 1141—1149.
112. Rauser W.E. // Plant. Physiol. 1995. Vol. 109. P. 1150—1156.
113. Reese R.N., Wagner G.J. // Biochem. J. 1987. Vol. 241. P. 641—646.
114. Reese R.N., Winge D.R. // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263. P. 12832—12835.
115. Reese R.N., White C.A., Winge D.R. // Plant Physiol. 1992. Vol. 98. P. 225—229.
116. Reid N.M., Dickson, D.P., Greenwood C., Thompson A., Kadir F.H.A., Moore G.R. // Biochem. J. 1990. Vol. 272. P. 263—264.
117. Rohrer J.S., Islam Q.T., Watt G.D., Sayers D.E., Theil E.C. // Biochemistry. 1990. Vol. 29. P. 259—264.

118. Salt D.E., Rauser W.E. // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 107. P. 1293–1301.
119. Salt D.E., Prince R.C., Pickering I.J., Raskin I. // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 109. P. 1427–1433.
120. Salt D.E., Pickering I.J., Prince R.C., Gleba D., Dushenkov S., Smith R.D., Raskin I. // *Environ. Sci. Technol.* 1997. Vol. 311. P. 1636–1644.
121. Schuler D., Frankel R.B. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. Vol. 52. P. 464–473.
122. Shumilin I.A., Nikandrov V.V., Krasnovsky A.A., Popov V.O. // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 328. P. 189–192.
123. Shumilin I.A., Nikandrov V.V., Popov V.O., Krasnovsky A.A. // *FEBS Lett.* 1992. Vol. 306. P. 125–128.
124. Singhal R.K., Anderson M.E., Meister A. // *Faseb. J.* 1987. Vol. 1. P. 220–223.
125. Slawson R.M., Trevors J.T., Lee H. // *Archiv Microbiol.* 1992. Vol. 158. P. 398–404.
126. Slawson R.M., Lohmeiervogel E.M., Lee H., Trevors J.T. // *Biometals.* 1994. Vol. 7. P. 30–40.
127. Smith P.R., Holmes J.D., Richardson D.J., Russell D.A., Sodeau J.R. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1998. Vol. 94. P. 1235–1241.
128. Speiser D.M., Abrahamson S.L., Banuelos G., Ow D.W. // *Plant Physiol.* 1992. Vol. 99. P. 817–821.
129. Speiser D.M., Ortiz D.F., Kreppel L., Scheel G., McDonald G., Ow D.W. // *Molec. Cell. Biol.* 1992. Vol. 12. P. 5301–5310.
130. Stefanini S., Chiancone E., Vecchini P., Antonini E. // *Mol. Cell. Biochem.* 1976. Vol. 13. P. 55–61.
131. Steffens J.C. // *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 1990. Vol. 41. P. 553–575.
132. Stiefel E.I., Watt G.D. // *Nature.* 1979. Vol. 279. P. 81–83.
133. Stiefel E.I., Grossman M.J., Watt G.D. // *Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc.* 1995. Vol. 209. P. 274.
134. Stillman M.J. // *Coord. Chem. Rev.* 1995. Vol. 144. P. 461–511.
135. Takagi H., Shi D.S., Ha Y., Allewell N.M., Theil E.C. // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 18685–18688.
136. Theil E.C. // *Adv. Enzymol.* 1990. Vol. 63. P. 421–449.
137. Towe K.M. // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 9377–9378.
138. Vile G.F., Basumodak S., Waltner C., Tyrrell R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. P. 2607–2610.
139. Vile G.F., Tyrrell R.M. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 14678–14681.
140. Vile G.F., Tyrrell R.M. // *Free. Radic. Biol. Med.* 1995. Vol. 18. P. 721–730.
141. Vogeli-Lange R., Wagner G.J. // *Plant Physiol.* 1990. Vol. 92. P. 1086–1093.
142. Wade V.J., Treffry A., Laulhere J.P., Bauminger E.R., Cleton M.I., Mann S., Briat J.F., Harrison P.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. Vol. 1161. P. 91–96.
143. Wang C.L., Michels P.C., Dawson S.C., Kitisakkul S., Baross, J.A., Keasling J.D., Clark D.S. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol. 63. P. 4075–4078.
144. Watt G.D., Jacobs D., Frankel R.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. P. 7457–7461.
145. Watt G.D., McDonald J.W., Chiu C.H., Reddy K.R. // *J. Inorg. Biochem.* 1993. Vol. 51. P. 745–758.
146. Watt G.D., Frankel R.B., Jacobs D., Huang H., Papaefthymiou G.C. // *Biochemistry.* 1992. Vol. 31. P. 5672–5679.
147. White C., Gadd G.M. // *J. Ind. Microbiol.* 1996. Vol. 17. P. 116–123.
148. Williams R.K., Winge D.R. // *J. Cell. Biochem.* 1991. Vol. 45. P. 30–40.

-
149. *Williams P., Keshavarz-Moore E., Dunnill P.* // *J. Biotechnol.* 1996. Vol. 48. P. 259–267
150. *Willner I., Goren Z.J.* // *Chem. Soc., Chem. Commun.* 1986. P. 172–174.
151. *Willner I., Mandler D., Maidan R.* // *Nouv. J. Chim.* 1987. Vol. 11. P. 109–121.
152. *Willner I., Willner B.* // *React. Polym.* 1994. Vol. 22. P. 267–279.
153. *Wu J.S., Sung H.Y., Juang R.H.* // *Biochem. Molecul. Biol. Internation.* 1995. Vol. 36. P. 1169–1175.
154. *Zenk M.H.* // *Gene.* 1996. Vol. 179. P. 21–30.