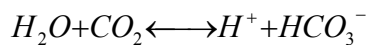


## ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ pH И РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА В СУСПЕНЗИИ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОБЪЕКТОВ

Протекание многих фотобиологических процессов в клетках и хлоропластах зеленых растений связано с изменением активности  $H^+$  во внутренней и наружной средах. Отрицательный логарифм концентрации  $H^+$  называется водородным показателем

$pH = -\lg [H^+]$ . Изменения pH в суспензиях хлоропластов и одноклеточных водорослей под действием света могут быть обусловлены целым рядом процессов: фотосинтетической фиксацией  $CO_2$ , работой  $H^+$ -насоса хлоропластов, фотофосфорилированием, редокс-превращениями искусственных медиаторов транспорта электронов.

1. Фотосинтетическая фиксация  $CO_2$ . В водных растворах, находящихся в равновесии с воздухом, поддерживается баланс между растворенным углекислым газом и анионами бикарбоната:



Потребление  $CO_2$  при фотосинтезе нарушает равновесие и приводит к подщелачиванию среды. Фотоиндуцированное подщелачивание, связанное с фиксацией  $CO_2$ , удобно наблюдать на суспензиях одноклеточных водорослей (хлорелла, дуналиелла, анабена). Изменения pH на свету продолжаются в течение 5-10 мин. и могут достигать 1 единицы pH (обычно 0.2 ед. pH).

2. " $H^+$ -насос" хлоропластов. Согласно хемиосмотической гипотезе Митчела, электронтранспортная цепь фотосинтеза организована в мембране таким образом, что окисление воды и пластохинона происходит на внутренней ее поверхности и сопровождается выбросом  $H^+$  внутрь тилакоида; а восстановление пластохинона и акцепторов фотосистемы I происходит на внешней поверхности тилакоидной мембраны и сопровождается поглощением  $H^+$  из наружной среды.

Согласно схеме, показанной на рис.1, перенос одного электрона по электронтранспортной цепи сопровождается транспортом двух  $H^+$  из среды внутрь тилакоида и образованием трансмембранной разности электрохимических потенциалов  $H^+$  ( $\Delta\mu_{H^+}$ ). Электрохимический потенциал иона определяется уравнением:

$$\bar{\mu} = \mu_0 + RT \ln c + ZF\phi$$

где  $\mu_0$  - стандартный химический потенциал, зависящий от природы растворителя,  $c$  - концентрация,  $\phi$  - электрический потенциал в данной фазе,  $Z$  - заряд иона, а  $R$  и  $F$  - физические константы, равные  $8,3 \text{ Дж}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$  и  $96500 \text{ Кл}\cdot\text{моль}^{-1}$ , соответственно.

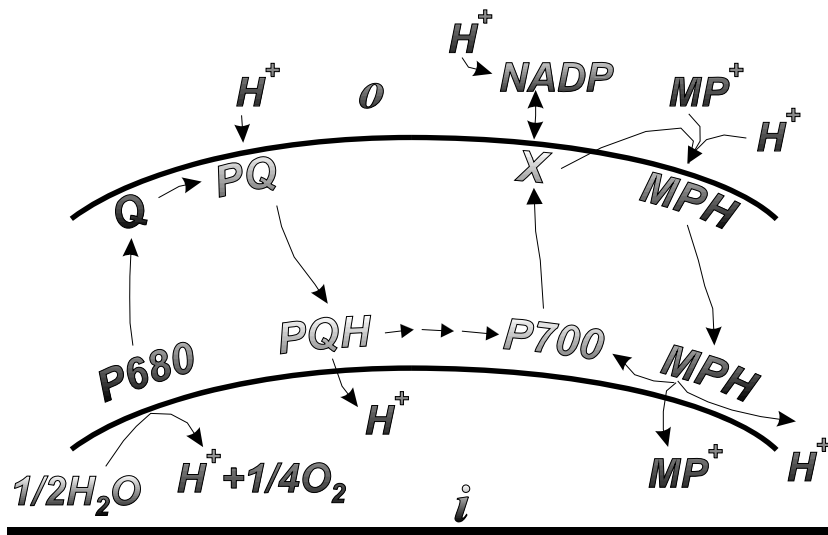


Рис. 1. Схема организации электронтранспортной цепи в тилакоидной мембране хлоропластов (MP<sup>+</sup> - катион феназинметосульфата)

Разность электрохимических потенциалов H<sup>+</sup> между внутренней средой тилакоида (фаза *i*) и наружной средой (фаза *o*) равна:

$$\Delta \bar{\mu}_{H^+} = RT \ln \frac{c_i}{c_o} + F(\varphi_i - \varphi_o)$$

$$\Delta \bar{\mu}_{H^+} = F\Delta\varphi - 2,3 \cdot RT\Delta pH$$

где  $\Delta pH$  и  $\Delta\varphi$  - трансмембранный градиент pH и разность электрических потенциалов на мембране. Уравнение показывает, что разность электрохимических потенциалов H<sup>+</sup> включает две компоненты - концентрационную (градиент pH) и электрическую ( $\Delta\varphi$ ). Величину  $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$  можно рассматривать как действующую на протоны силу, которая определяет пассивный поток H<sup>+</sup> из тилакоида во внешний раствор.

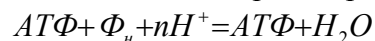
Поэтому  $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$  называют иногда протондвижущей силой ( $\Delta p$ ) и выражают в милливольтгах:

$$\Delta p = \frac{\Delta \bar{\mu}_{H^+}}{F} = \Delta\varphi - \frac{2,3 \cdot RT}{F} \Delta pH$$

множитель  $2,3 RT/F$  при температуре 20<sup>0</sup>C равен примерно 58 мВ.

Предполагают, что АТФ-синтетаза, локализованная в тилакоидной мембране, способна использовать энергию  $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$  для синтеза АТФ. В стационарном состоянии активный поток H<sup>+</sup> внутрь тилакоида уравнивается пассивным потоком H<sup>+</sup> наружу по градиенту концентрации и электрического потенциала. Стационарное состояние достигается обычно за 10 - 20 с. Амплитуда фотоиндуцированных изменений pH в незабуференной суспензии хлоропластов составляет обычно 0,01 - 0,02 единицы pH.

3. Изменения pH при фотофосфорилировании. Эти изменения pH обусловлены необратимым поглощением H<sup>+</sup> из среды при синтезе АТФ:

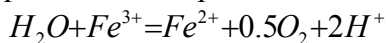


На изолированных хлоропластах эти изменения можно наблюдать в присутствии фосфат-акцепторной системы (неорганический фосфат и АДФ). Потребление H<sup>+</sup> при синтезе АТФ лежит в основе потенциометрического метода определения фосфорилирования. Метод состоит в том, что регистрируют изменения pH в суспензии хлоропластов при освещении, а затем

титрованием  $10^{-4}M$  раствором  $HCl$  определяют количество  $H^+$ , необратимо связавшихся на свету.

Пользуясь известным стехиометрическим коэффициентом  $n$ , величина которого несколько меньше единицы и зависит от  $pH$  среды, можно рассчитать количество синтезированного АТФ и скорость его образования.

4. Окислительно-восстановительные превращения редокс- медиаторов, сопровождаемые отщеплением или потреблением  $H^+$ . Например, фотовосстановление феррицианида в суспензии хлоропластов сопровождается подкислением среды:



По скорости подкисления среды можно рассчитывать скорость переноса электронов от воды на феррицианид.

Разбавители фотофосфорилирования (липофильные проводники протонов,  $NH_4Cl$ ) понижают градиент  $pH$  на тилакоидной мембране и вызывают ускорение фотопереноса электронов.

Типичные изменения  $pH$ , наблюдаемые при освещении водорослей или хлоропластов в различных условиях представлены на рис.2.

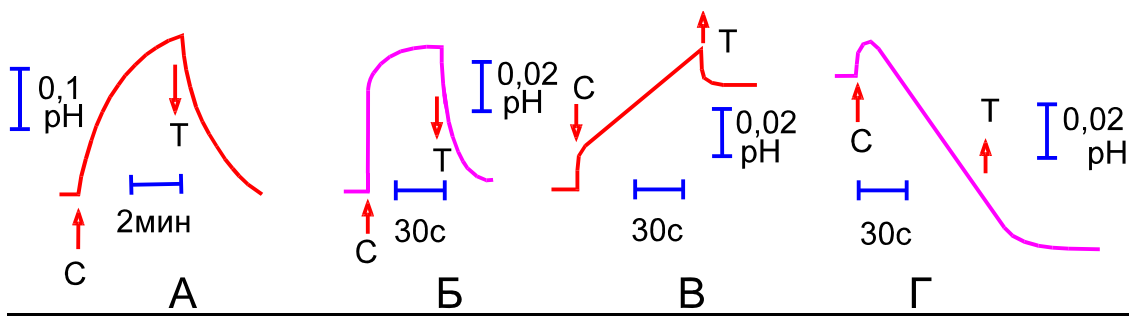
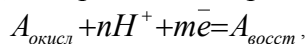


Рис.2. А - фотоиндуцированные изменения  $pH$  в суспензии водорослей, обусловленные фиксацией  $CO_2$ ; Б - фотоиндуцированное подщелачивание среды в суспензии изолированных хлоропластов; В - подщелачивание среды в суспензии хлоропластов при фотофосфорилировании; Г - необратимое подкисление среды в реакции Хилла с феррицианидом

Наряду с изменениями  $pH$ , информацию о протекающих окислительно-восстановительных процессах дают измерения редокс- потенциала среды. При таких измерениях важно знать, какая окислительно-восстановительная система определяет редокс-потенциал среды. Поэтому измерения удобно производить при добавках в суспензию водорастворимых медиаторов транспорта электронов. В качестве примера подобных медиаторов можно назвать феназинметосульфат (ФМС), используемый как кофактор циклического транспорта электронов в хлоропластах и хроматофорах бактерий, феррицианид - акцептор электронов, тетрафенил-пара-фенилендиамин (ТМФД) - переносчик электронов в цепи фотосинтеза на участке между двумя фотосистемами.

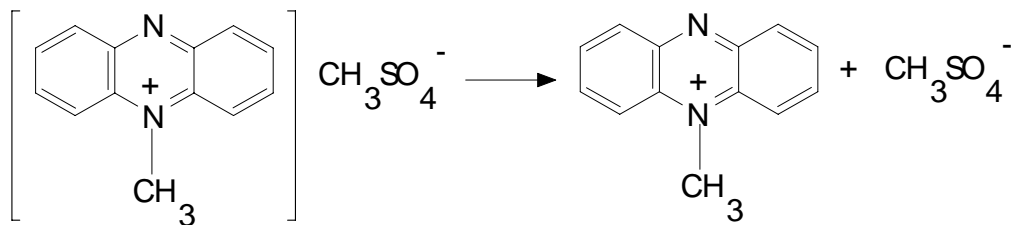
Для среды, в которой поддерживается окислительно- восстановительное равновесие:



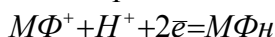
редокс-потенциал определяется соотношением:

$$\varphi = \varphi_0 + \frac{RT}{mF} \ln \frac{[A_{окисл}]}{[A_{восст}]} - \frac{n}{m} 58 pH$$

Рассмотрим в качестве примера окислительно-восстановительные свойства ФМС. В кристаллическом виде ФМС имеет следующее строение



В водных растворах ФМС диссоциирует и может находиться в двух формах (при  $pH > 3,5$ ), одна из которых окисленная ( $M\Phi^+$  - метилфеназоний), а вторая - восстановленная ( $M\Phi_H$  - 5-метил-гидрофеназин). В водном растворе существует равновесие между катионной формой  $M\Phi^+$  и незаряженной восстановленной формой  $M\Phi_H$



$$\varphi = \varphi_0 + 29 \lg \frac{[M\Phi^+]}{[M\Phi_H]} - 29 pH,$$

где  $\varphi_0$  - стандартный редокс-потенциал пары  $M\Phi^+ / M\Phi_H$ , равный +150 мВ при  $pH 7$ . В водных растворах равновесие сдвинуто влево, и концентрация  $M\Phi^+$  на несколько порядков превышает концентрацию восстановленной формы  $M\Phi_H$ . В связи с этим даже небольшие изменения в концентрации восстановленной формы приводят к значительным изменениям редокс-потенциала.

В цель данной работы входит измерение фотоиндуцированных изменений  $pH$ , связанных с переносом электронов в мембранах хлоропластов, а также изучение динамики редокс-потенциала в суспензиях хлоропластов, содержащих ФМС или феррицианид.

### **Описание установки**

Схема установки показана на рис.3. В кювету, перемешиваемую магнитной мешалкой, опущены три электрода: стеклянный  $pH$ -электрод, редоксметрический электрод и вспомогательный хлорсеребряный электрод.

На вход измерительного прибора ( $pH$ -метр ЛПУ-01) поступает разность электрических потенциалов между стеклянным и вспомогательным электродами (при измерении  $pH$ ) или же между редоксметрическим и вспомогательным электродами (при измерении редокс-потенциала). В отдельном блоке между электродами и  $pH$ -метром смонтированы переключатель каналов и устройство компенсации сигнала.

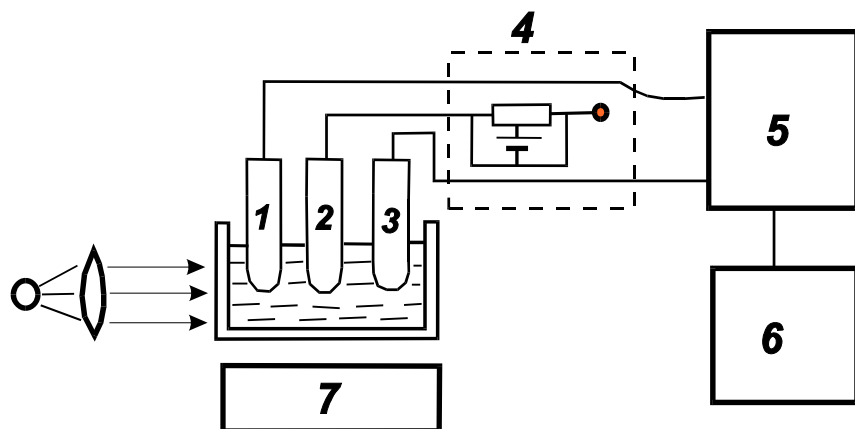


Рис.3. Схема установки: 1 - стеклянный рН-электрод, 2 - редоксметрический электрод, 3 - электрод сравнения, 4 - блок переключения каналов и компенсации, 5 - рН-метр, 6 - самопишущий потенциометр, 7 - магнитная мешалка

Суспензию фотосинтезирующих объектов освещают полным светом лампы накаливания через водный тепловой фильтр или же красным светом через дополнительный светофильтр КС-14. Следует учитывать, что шкала рН-метра в данной установке не градуирована. Градуировка нарушена в целях повышения чувствительности прибора по напряжению. Выбор чувствительности определяется тем, что изменения рН~0,02ед. соответствуют изменениям потенциала стеклянного электрода ~1 мВ. Это соотношение получено из формулы:

$$E = E_0 - RT \ln[H^+] / F$$

### **Порядок выполнения работы**

Работу начинают с калибровки измерительной системы. На вход рН-метра подают калиброванное напряжение (1-5 мВ), и записывают ступенчатые изменения потенциала на самописце.

Кювету и электроды промывают дистиллированной водой, а затем помещают электроды в буферный раствор рН 6,8. Проверяют стабильность потенциала рН-электрода в буферном растворе, а также отсутствие реакции электрода на освещение. Перед началом работы с биологическим объектом кювету и электроды следует вновь промыть дистиллированной водой.

#### **Упражнение 1.** Измерение фотоиндуцированных изменений рН в гомогенате листа.

Гомогенизируют 15-20 листьев гороха в 10 мл 0,1М раствора КСl. В измерительную кювету наливают 5 мл полученной суспензии и измеряют изменения рН среды при периодическом включении и выключении света с интервалами 1 - 2 мин.

Добавляют в суспензию феназинметосульфат до конечной концентрации  $10^{-5}$ М и повторяют измерения рН в режиме периодического освещения. Активация циклического ФМС-зависимого транспорта электронов должна приводить к увеличению амплитуды фотоиндуцированных изменений рН.

**Упражнение 2.** Измерение фотоиндуцированных изменений редокс-потенциала в гомогенате листа в присутствии ФМС.

Измерения проводят на том же препарате (гомогенат с добавлением ФМС) после переключения измерительной цепи в режим измерения редокс потенциала. При необходимости следует ослабить чувствительность рН-метра, поставив переключатель предела

измерений в положение - 2 - 14 единиц рН. Отметить направление измерений и их обратимость.

**Упражнение 3.** Измерение реакции Хилла в гомогенате листа.

В 5 мл гомогената добавляют раствор феррицианида калия до конечной концентрации  $10^{-3}$  М. Измеряют изменения рН среды при периодическом освещении.

Отметить необратимое подкисление среды, связанное с фоторазложением воды.

Переключают измерительную цепь в режим измерения редокс- потенциала и регистрируют изменения редокс-потенциала в тех же условиях.

### **Литература**

Р.Клейтон. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели.  
(Главы 9, 10). Москва, Мир, 1984.