

О.К. ЗОЛОТАРЬОВА

Інститут ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України
вул.Терещенківська, 2, Київ, 01601
membrana@ukr.net

ТЕРМОДИНАМІЧНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ФОТОСИНТЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ СОНЯЧНОЇ ЕНЕРГІЇ

К л ю ч о в і с л о в а: фотосинтез, нерівноважна термодинаміка, біоенергетика, сполучення, хлоропласт, перенесення, фотофосфорилування, трансмембранний градієнт протонів

O.K. ZOLOTAREVA

M.G.Kholodny Institute of Botany,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

THERMODYNAMIC ASSESSMENT OF EFFICIENCY OF PHOTOSYNTHETIC SUN ENERGY TRANSFORMATION

Conversion of solar energy by alive organisms till now has no adequate thermodynamic description because of an apparent lack of the microscopic reversibility of light absorption and emission. Recently two equivalent, but independent approaches were developed allowed to include the first step of photosynthesis in the canonical description of biochemical processes and apply for their analysis the tools nonequilibrium thermodynamics. The aim of the work was an estimation of thermodynamic coupling and efficiency of process of photosynthetic energy transformation in isolated pea chloroplasts depending on intensity of growing illumination. These parameters calculated on the basis of experimentally determined rates of photosynthetic electron transport (J_e), ATP synthesis (J_p), uncoupled transfer of electrons from water to exogenic acceptor (methylviologen) and transmembrane proton gradient value (ΔpH). It was shown that the value of a coefficient of thermodynamic coupling (q) in chloroplasts was between 0,91 and 0,95, increasing at decrease in the light from $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ to $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. In the same conditions optimum thermodynamic efficiency changed from 0,60 up to 0,64. Various uncouplers of electron transport (protonophore NH_4Cl , hydrophobic canalofomer gramicidine D or so-called ADPR-reagent FCCP) allowed to characterize three types of the mechanisms induced loss of efficiency of coupling between electron transport and ATP synthesis in chloroplasts: 1. A passive proton leak through a thylakoid membrane from a lumen in the direction of proton gradient was observed at the presence of increasing concentration NH_4Cl . In this case the inhibition of synthesis АТФ correlated with ΔpH drop. 2. At presence of nanomolar concentrations of gramicidine the ATP synthesis suppressed without decrease in ΔpH value. The analysis of kinetic curves was revealed in this case a slip at level of ATPsynthase. 3. FCCP agent, deactivating complexes of water oxidation in chloroplasts at high light intensity, suppressed photophosphorylation in parallel to inhibition of oxygen photoevolution. Such behaviour of system specified electric slip at the level of proton pumps of photosystem II.

Key words: photosynthesis, non-equilibrium thermodynamics, bioenergetics, coupling, chloroplast, electron transfer, photophosphorylation, transmembrane proton gradient

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ

Конверсия солнечной энергии живыми организмами до настоящего времени не имеет адекватного термодинамического описания в связи с тем, что процессы поглощения и эмиссии света не являются микроскопически обратимыми. Недавно предложен подход, который позволил включить первый этап фотосинтеза в каноническое описание биохимических процессов и применить для их анализа аппарат неравновесной термодинамики. Целью работы была оценка величины термодинамического сопряжения и эффективности процесса фотосинтетического преобразования энергии в изолированных хлоропластах гороха посевного в зависимости от интенсивности освещения растений при выращивании. Эти параметры рассчитывали, исходя из экспериментально определенных скоростей фотосинтетического электронного транспорта (J_e), скорости синтеза АТФ (J_p), скорости разобщенного переноса электронов от воды к конечному акцептору (метилвиологену) и величины трансмембранного протонного градиента (ΔpH).

Показано, что коэффициент термодинамического сопряжения (q) в хлоропластах составляет от 0,91 до 0,95, возрастая при снижении интенсивности актинического света от 2 000 до 300 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. В этих же условиях оптимальная термодинамическая эффективность изменялась от 0,60 до 0,64. Использование разобщителей электронного транспорта различной природы (протонофора NH₄Cl, гидрофобного каналоформера грамицидина D или т.н. ADRY-реагента FCCP) позволило охарактеризовать три типа механизмов, вызывающих потерю эффективности сопряжения электронного транспорта и синтеза АТФ в хлоропластах. 1. Пассивная протонная утечка через тилакоидную мембрану из люмена в направлении протонного градиента. Наблюдалась в присутствии возрастающих концентраций NH₄Cl. В этом случае ингибирование синтеза АТФ коррелировало с падением ΔpH . 2. В присутствии наномолярных концентраций грамицидина синтез АТФ подавлялся без снижения величины ΔpH . Анализ кинетических кривых указывает в этом случае на пробой («slip») на уровне АТФсинтазы. 3. Для FCCP, дезактивирующего при повышении интенсивности освещения хлоропластов систему фоторазложения воды, подавление фотофосфорилирования происходило параллельно с ингибированием фотовыделения кислорода. Такое поведение системы указывает на электрический пробой на уровне протонной помпы фотосистемы II.

К л ю ч е в ы е с л о в а: фотосинтез, неравновесная термодинамика, биоэнергетика, сопряжение, хлоропласт, перенос электронов, фотофосфорилирование, трансмембранный градиент протонов

Вступ

Ріст, розвиток і розмноження рослин залежать від їх здатності поглинати, трансформувати і використовувати енергію світла для забезпечення метаболічних процесів. Первинним актом перетворення енергії при фотосинтезі є поглинання квантів світла фотосинтетичними реакційними центрами, розділення зарядів в яких запускає процес перенесення електронів по ланцюгу електронних переносників у тилакоїдних мембранах, що пов'язане з синтезом АТФ ? універсальної форми запасання вільної енергії в живих організмах.

Термодинамічний підхід до кількісного аналізу ефективності процесу енерготрансформації на основі теорії лінійних необоротних процесів запропонували Кедем і Каплан [11], а потім розвинули для описання окиснювального фосфори-

лювання кілька інших дослідників [10, 19, 34, 38]. Розглядати енерготрансформацію при фотосинтезі, зокрема процес фотофосфорилування АДФ, з позицій нерівноважної термодинаміки до недавнього часу вважалося не цілком коректним через очевидну відсутність мікрооборотності процесів поглинання і випромінювання квантів світла. Проте кілька років тому Мезена і Вестерхоф [13, 14] запропонували два способи представлення процесу поглинання – емісії світла у формі оборотної хімічної реакції, що дозволяє застосувати положення феноменологічної теорії необоротних процесів до аналізу ефективності фотосинтетичного фосфорилування [36].

Об'єкти і методи досліджень

Об'єктом дослідження були рослини гороху посівного (*Pisum sativum* L.) сорту Дамір-2, отриманого з Інституту землеробства (Київ). Рослини вирощували на середовищі Прянішнікова протягом 14 діб за температури 22 °С та фотоперіоду 14 год.

Джерелом освітлення були люмінесцентні лампи ЛБ-40 (Полтава, Україна) з інтенсивністю світлового потоку в області ФАР 310 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Щільність потоку фотонів на рівні рослин визначали за допомогою сферичного мікроквантового сенсора US-SQS та вимірювального пристрою LI-COR (LI-250), США.

Хлоропласти класу «В» ізолювали з листя 15-добових проростків гороху на основі модифікованого нами методу Аврона [2]. Свіжозрізані листки гороху середнього ярусу загортали у вологий фільтрувальний папір та витримували у холодильнику за 4–6 °С протягом 2 год. Процедура виділення хлоропластів проводили за температури 0–4 °С. Охолоджені листки подрібнювали за допомогою блендера (BRAUN-250W, Німеччина) протягом 20 с у середовищі такого складу: 0,4 М сорбітол, 0,01 М NaCl, 0,01 М трис-НCl, (рН 7,8) і 0,005 М аскорбат натрію. Аскорбат натрію готували безпосередньо перед дослідом шляхом змішування еквімолярних розчинів аскорбінової кислоти та гідрокарбонату натрію. Гомогенат фільтрували через 2 шари капронової тканини, важки частки осаджували на центрифугі К-26D (80 г протягом 5 хв). Супернатант центрифугували за 0–4 °С і 3500 г протягом 10 хв для отримання фракції хлоропластів. Осад хлоропластів ресуспендували у середовищі зберігання (0,4 М сорбітол, 0,0025 М MgCl₂, 0,01 М NaCl, 0,01 М трис-НCl, рН 7,8) та в подальшому використовували для визначення швидкості роз'єданого електронного транспорту.

Величину світлоіндукованого вивільнення кисню або його поглинання в реакції Мелера досліджували амперометрично за допомогою закритого платиного електроду Кларка. Величину трансмембранного протонного градієнта оцінювали з використанням ліпофільної мітки 9-акридину, вимірюючи ΔрН-залежне гасіння її флуоресценції на ХЕРАМ флуорометрі (Walz, Німеччина) за кімнатної температури [28, 29]. Як роз'єднувач обрано 10 мМ NH₄Cl або 1 мМ граміцидин D. Псевдофосфорилування АДФ здійснювали, додаючи до хлоропластів 0,25 мМ АДФ і 3 мМ арсенату натрію. Концентрацію хлорофілу визначали за методикою Арнона [1].

Флуоресценцію хлорофілу *a* в листках гороху досліджували за допомогою ХЕРАМ флуорометра (Walz, Німеччина). Для збудження флуоресценції хлорофілу модульований світловий потік імпульсної ксенонової лампи пропускали крізь синьо-зелений фільтр BG-39 (5 мм, Schott). Інтенсивність збуджуючого світла регу-

лювали за допомогою діафрагм та нейтральних фільтрів. Реєстрували флуоресценцію за довжини хвилі 695 нм, використовуючи фільтри RG645/R65 (2 мм, 1 мм, Schott, Balzers) та RG9 (1 мм, Schott). Флуоресцентні дослідження проводили за кімнатної температури. Дані у форматі файлів Excel записували за допомогою мультимедіа UT-60E (Тайвань), з'єданого з комп'ютером.

Фотохімічне гасіння флуоресценції хлорофілу (qP), що відображає ступінь окиснення пула Q_A розраховували за методом Шрайбера [33]:

$$qP = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_0).$$

Коефіцієнт нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу (qN) та нефотохімічне гасіння за Штерном–Волмером (NPQ), що характеризує швидкість теплової дисипації в антені ФСII, визначали за Bilger [3]:

$$qN = 1 - (F'_m - F'_0) / (F_m - F_0);$$

$$NPQ = F_m / F'_m - 1.$$

Реальний квантовий вихід електронного транспорту (фPSII), що оцінює ефективний квантовий вихід фотохімічного перетворення енергії у ФСII, розраховували за Genty [6]:

$$\phi PSII = (F'_m - F_s) / F'_m.$$

Максимальний (F_v/F_m) та ефективний (F'_v/F'_m) квантові виходи знаходили за Butler [4] і Maxwell [12]:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m;$$

$$F'_v/F'_m = (F'_m - F'_0) / F'_m.$$

Результати досліджень обробляли за допомогою програм Microsoft Excel, Origin, UT60E Interface program V2.02, TotalLab V1.10. Досліди виконані у чотирьох п'ятикратній повторностях, за отриманими даними виводили середні арифметичні показники із стандартною похибкою.

Результати досліджень та їх обговорення

Термодинамічна ефективність процесу трансформації енергії, зокрема фотосинтезу, визначається як коефіцієнт вихідної потужності (швидкість синтезу продукту, помножена на вільну енергію, необхідну для синтезу його 1 моля) по вхідній потужності (швидкість використання субстрату, помножена на вільну енергію, що доставляється його окисненням). Максимальна ефективність такого процесу завжди менше 100%. Вважається, що, рушійні сили процесу, окрім тривісальних аспектів, відрізняються від них же у рівновазі, існують фізіологічні механізми, які відповідають за втрату ефективності [5, 17]. Для характеристики змін протонного сполучення на рівні мембранних процесів, які спричиняють зниження ефективності окисного фосфорилування, запропоновано терміни «витік» (leak) і «пробій» (slip) [5, 17]. Витік може бути визначений як пасивне протонне перенесення через тилакоїдну мембрану з люмена в напрямі протонного градієнта. Пробій мембрани визначають двома шляхами. Перший – це «дійсний» пробій, або редокс—пробій) — зменшення протонного накачування дихальних комплексів унаслідок роз'єднування електронного транспорту і фосфорилування. Другий шлях краще описувати як пов'язаний з білком протонний витік. За Гарлідом зі

співаєт. [5], шляхи витоку протонів найімовірніше розташовані поблизу інтегральних мембранних білків, оскільки поблизу білків енергія активації для перетину гідрофобної фази мембран понижена. Крім того, вони припустили, що за умов дихання необхідно брати до уваги новий клас протонних витоків. Його називають пробоем, бо, на відміну від витоку, він стається лише в разі дихання. На відміну від витоків, існування яких не викликає сумнівів, мембранні пробойні визначають не всі. Деякі науковці стверджують, що їх не існує. Інші висловлюються як на користь існування такого механізму регуляції мембранного транспорту, так і проти [15, 16]. На думку певних авторів, пробойні у ланцюзі електронного перенесення і/або на рівні АТФ-синтази є дієвими механізмами регуляції сполучення [18, 20, 21]. Редокс-пробойні також виявили [9, 22] у тилакоїдах та інтерпретували в термінах протонної провідності мембран, що змінюється.

Сполучені реакції

Якщо у системі протікають одночасно дві необоротні реакції, то умова

$$A_1v_1 + A_2v_2 > 0 \quad (1)$$

дотримується не лише при

$$A_1v_1 > 0 \text{ и } A_2v_2 > 0, \quad (2)$$

а й в разі

$$A_1v_1 < 0, \text{ а } A_2v_2 > 0, \quad (3)$$

де v – швидкість хімічної реакції; A – хімічна спорідненість, або рушійна сила хімічної реакції, що є різницею хімічних потенціалів початкових і кінцевих продуктів реакції з урахуванням їх стехіометричних коефіцієнтів:

$$A = -\sum \mu_k \nu_k, \quad (4)$$

де μ_k і ν_k – хімічний потенціал і стехіометричний коефіцієнт k -го реагенту.

$$\mu_k = \mu_k^\circ + RT \ln [C_k]. \quad (5)$$

У цьому випадку перша реакція називається сполученою, друга — такою, що сполучає, а сам феномен енергетичного забезпечення ендергонічної реакції за рахунок екзергонічних реакцій називається енергетичним сполученням [24].

Умови 2 і 3 дають верхню межу швидкості сполученої реакції:

$$v_1 \leq A_2v_2/A_1, \quad (6)$$

існування якої дозволяє поєднати чисто термодинамічну величину хімічної спорідненості з основоположною кінетичною характеристикою процесу – його швидкістю. Існування термодинамічного сполучення дав змогу оцінити енергетичну ефективність системи. Необоротні процеси, що призводять до розсіювання енергії, є причиною теплової деградації вільної енергії системи. Проте сполучення необоротних процесів, принаймні частково, запобігає цим втратам [39].

Співвідношення між величиною рушійних сил і швидкістю процесів

Сполучені процеси є основою біологічної трансформації енергії. Перетворення енергії при окисному фосфорилуванні і фотофосфорилуванні завершується роботою двох зв'язаних протонних помп. Експериментальні дослідження цих си-

стем часто включають стаціонарні (або псевдостационарні) виміри зі сполучення скалярних чи векторних потоків і відповідних термодинамічних сил. Розробка термодинамічного опису знаходиться на самому початковому етапі, оскільки конверсія сонячної енергії живими організмами розглядається на основі очевидної відсутності мікроскопічної оборотності процесів поглинання та емісії світла [7].

У термодинаміці через X виражають значення рушійних сил, а через J — значення потоку, або сумарної величині відповідного потоку.

Якщо система знаходиться біля рівня термодинамічної рівноваги, коли значення рушійних сил достатньо малі, а самі процеси — повільні, то J і X зв'язані таким співвідношенням:

$$J = LX, \quad (7)$$

де L — постійний, або лінійний коефіцієнт. Для хімічних реакцій біля рівня рівноваги, коли швидкість прямої і зворотної реакцій практично однакова, також є слушним співвідношення

$$v = LA, \quad (8)$$

де v — сумарна швидкість, яка дорівнює різниці прямої і зворотної реакцій.

Якщо в системі відбуваються два взаємодіючі процеси J_1, X_1 та J_2, X_2 і швидкість кожного з них залежатиме не лише від «своїх» рушійних, але й всіх інших сил. Згідно з хеміосмотичною теорією (рис. 1), електронний транспорт виступає як рушійна сила (X_e) утворення трансмембранної різниці електрохімічних потенціалів іонів водню ($\Delta\mu\text{H}^+$), що енергетично забезпечує формування АТФ. Рушійною силою синтезу АТФ є фосфатний (X_p) потенціал [23, 40]. Рушійні сили індукують відповідні потоки: J_e — фотосинтетичне перенесення електронів, J_p — потік енергозапасуючої реакції — синтезу АТФ. Кількісною мірою зв'язаності цих процесів є безрозмірний коефіцієнт сполучення q [11]:

$$q = L_{pe}/(L_p L_e)^{1/2}, \quad (9)$$

величина якого змінюється в межах $-1 \leq q \leq 1$ ($L_p > 0$, $L_e > 0$, $L_{pe}^2 \leq L_p \cdot L_e$). Значення $q = \pm 1$ досяжні тільки для цілком зв'язаних систем. При $q < 0$ збільшення рушійної сили одного процесу призводить до зменшення потоку зв'язаного з ним процесу.



Рис. 1. Схема енергоспряження у хлоропласті. Вхідна сила світлозалежного транспорту електронів (X_e) конвертується в силу вихідного залежного фосфатного потенціалу (X_p). Фосфатний потенціал є рушійною силою реакції споживання АТФ у клітині (потреба в АТФ). Вхідний потік (J_e) позначає швидкість перенесення електронів фотосинтетичним електронтранспортним ланцюгом, а вихідний (J_p) — швидкість утворення АТФ. Коефіцієнт сполучення (q) характеризує сполучення світлозалежного перенесення електронів з утворенням АТФ у ході фотофосфорилування

Енергія у хлоропластах трансформується при сполученні трьох головних процесів: електронного транспорту, зв'язаного зі світловою активацією, трансмемб-

ранного перенесення протонів і синтезу АТФ. Ключову роль відіграє трансмембранна циркуляція протонів, яка індукується перенесенням електронів і використовується для синтезу АТФ. Загальна система складається з трьох феноменологічних рівнянь, які називають співвідношеннями Онзагера:

$$J_p = L_p A_p + L_{pH} DmH^+ + L_p e A_e, \quad (10)$$

$$J_H = L_{pH} A_p + L_H DmH^+ + L_H e A_e, \quad (11)$$

$$J_e = L_{eP} A_p + L_{eH} DmH^+ + L_e A_e. \quad (12)$$

Очевидно, ці співвідношення для вивчення сполучення можна використовувати тільки в тих випадках, коли є можливість експериментально варіювати і змінювати величини спорідненості у широких межах, а також оцінювати величину електрохімічного градієнта за трансмембранною різницею рН і електричних потенціалів. Для цього зручно скористатися ситуацією, коли J_H або $\Delta\mu H^+$ дорівнюють нулю. Це досягається у стаціонарному стані J_H або при дії роз'єднувачів $\Delta\mu H^+ = 0$, коли можливо безпосередньо вивчати ступінь перетворення вільної енергії електронного транспорту $J_e A_e$ у вільну енергію фотофосфорилування $J_p A_p$.

У разі дотримання цих умов система із трьох рівнянь спрощується до системи двох рівнянь:

$$J_e = L_e X_e + L_{ep} X_p, \quad (13)$$

$$J_p = L_{pe} X_e + L_p X_p. \quad (14)$$

Таким чином, у системі фотосинтетичних мембран при освітленні рослин протікають два взаємодіючі процеси – електронний транспорт (J_e , X_e) та фотофосфорилування (J_p , X_p) і швидкість кожного з них залежить від рушійних сил обох процесів. Перший процес (сполучений) йде проти градієнта електрохімічного потенціалу, тобто проти градієнта рушійної сили X_p ($L_p X_p < 0$) за рахунок енергії другого (який сполучає) процесу ($L_e X_e > 0$).

Феноменологічні коефіцієнти L_{pe} і L_{ep} називають коефіцієнтами взаємності. Вони можуть мати будь-які знаки і зв'язані співвідношенням взаємності Онзагера:

$$L_{pe} = L_{ep}, \quad (15)$$

тобто якщо потік одного необоротного процесу залежить від рушійної сили X_e другого необоротного процесу, то і потік другого процесу також залежить від X_p першого процесу. Рівняння Онзагера відіграють важливу роль у термодинаміці необоротних процесів. Використовуючи ці співвідношення, можливо вираховувати значення коефіцієнтів L_{ij} і визначати кількісний зв'язок між енергообмінними процесами, що протікають у клітині.

Хоча, як вважає Штуки [35], співвідношення взаємності Онзагера справедливі тільки біля стану рівноваги, Роттенберг не знайшов відхилень від симетрії у випадку окисного фосфорилування [25].

Величину коефіцієнтів взаємності визначають із експериментальних залежностей змін швидкостей ΔJ_e і ΔJ_p від відповідних змін рушійних сил. Перехресні коефіцієнти рівнянь Онзагера відповідають: L_e — позитивному впливу світла на фотосинтетичний електронний транспорт; L_p — негативному впливу фосфатного потенціалу на синтез АТФ; L_{pe} — позитивному впливу інтенсивності світла на синтез АТФ, L_{ep} — фосфатному інгібуванню електронного транспорту.

Кількісної мірою сполученості цих процесів є безрозмірний коефіцієнт сполучення q [11]:

$$q = (L_{pe}L_{ep}/L_pLe)^{1/2}, \quad (16)$$

величина якого змінюється в межах

$$-1 \leq q \leq 1 \quad (L_p > 0, L_e > 0, L_{pe}^2 \leq L_p \cdot L_e). \quad (17)$$

При $q=0$, $L_{pe} = L_{ep} = 0$ ці два процеси абсолютно не залежать один від одного, а їх потоки пропорційні значенням «власних» сил:

$$J_p = L_p X_p \text{ и } J_e = L_e X_e. \quad (18)$$

При $q < 0$ зростання рушійної сили одного процесу спричинює зменшення потоку сполученого з ним процесу.

Ефективність сполучення залежить від співвідношення

$$\frac{|L_p X_p|}{|L_e X_e|} \quad (19)$$

і може досягати 80—90% (наприклад, для окисного фосфорилування).

В якості показника швидкості енергодонорної реакції електронного перенесення можна взяти швидкість фотосинтетичного виділення кисню. Тоді рушійна сила (X_e) або хімічна спорідненість A виражатимуться як від'ємна зміна повного термодинамічного потенціалу на моль утворюваного кисню.

Феноменологічні коефіцієнти, очевидно, можуть бути визначені із експериментальних залежностей змін швидкості процесів від змін відповідних рушійних сил.

Роттенберг і Гутман показали, що у випадку окисного фосфорилування $L_{pe} = L_{ep}$ [24, 26].

Таким чином,

$$q = L_{pe} \sqrt{L_p L_e}. \quad (20)$$

Якщо трансмембранний протонний градієнт у тилакоїдах порушуватиметься при додаванні роз'єднувача, наприклад, хлориду амонію, надходження енергії для синтезу АТФ за рахунок сполученого електронного перенесення припиниться ($L_{pe}=0$) і рівняння 1 спроститься до

$$(J_e)_{роз} = L_e X_e, \quad (21)$$

де $(J_e)_{роз}$ – роз'єднана швидкість електронного транспорту.

В умовах фотосинтетичного контролю (стан 4 за Чансом) [20, 21] всі сполучені коефіцієнти зберігають своє значення, однак швидкість синтезу АТФ (J_p) дорівнює нулю. Транспорт електронів у стані фотосинтетичного контролю $(J_e)_{фк}$ зберігається, оскільки існують неспецифічні протонні течії через тилакоїдну мембрану і, можливо, альтернативні (несполучені з синтезом АТФ) шляхи перенесення електронів. Таким чином, сила (X_p), що виходить, витрачається на компенсацію неспецифічних течій із системи.

Вводячи $J_p = 0$ до рівняння 2,

$$L_{pe} X_e + L_p X_p = 0, \quad (22)$$

отримуємо:

$$X_p = - (L_{pe}/L_p) X_e = - (q^2 L_e/L_{pe}) X_e. \quad (23)$$

Підставляючи рівняння 7 у рівняння 1, отримуємо:

$$(Je)\phi_k = LeXe - LepX(q^2Le/Lpe)Xe = LeXe - q^2 LeXe, \quad (24)$$

$$(Je)\phi_k = LeXe(1 - q^2). \quad (25)$$

Використовуючи вираз 5, маємо:

$$(Je)\phi_k = (Je) \text{роз} (1 - q^2). \quad (26)$$

Оскільки $(Je)\phi_k$ (стан 4 за Чансом) і $(Je)\text{роз}$ можна легко визначити в експерименті, рівняння 10 дозволяє вивести вираз для прямого визначення значення q – ступеня термодинамічного сполучення:

$$q = [1 - (Je)\phi_k / (Je) \text{роз}]^{1/2}. \quad (27)$$

Ефективність енергоперетворення Кедем і Каплан [11] визначають як відношення вихідної до вхідної сил:

$$\eta = - JpXp / JeXe. \quad (27)$$

Для цієї двофазної функції оптимальне значення термодинамічної ефективності може бути визначено для кожного значення коефіцієнта q [35]:

$$\eta_{opt} = \frac{q^2}{(1 + \sqrt{1 + q^2})^2}. \quad (28)$$

Вплив умов вирощування на термодинамічну ефективність процесів перетворення енергії в тилакоїдних мембранах хлоропластів гороху

Для оцінки впливу інтенсивності світла на ефективність перетворення енергії хлоропластами рослини гороху вирощували за різної інтенсивності світла. Фотосинтетичну ефективність у листках оцінювали за кривими модульованої флуоресценції хлорофілу a (табл. 1).

Оцінюючи ефективність функціонування фотосинтетичного апарату, необхідно знати, яка частка енергії збудження молекул хлорофілу використовується у процесі електронного транспорту. Щоб визначити цю частку енергії, слід врахувати величину квантового виходу фотохімічних реакцій ФСII в адаптованому до світла стані ($F'v/F'm$), а також частку відкритих РЦ ФСII (qP). Параметр ϕPSII дозволяє оцінити квантовий вихід електронного транспорту.

За даними табл. 1, квантовий вихід електронного транспорту ϕPSII є вищим у рослин при сильному освітленні. Величина цього параметра також залежала від інтенсивності актинічного світла: вищі значення ϕPSII реєструвалися при діючому світлі низької інтенсивності. Це узгоджується з літературними даними, згідно з якими максимальна ефективність фотосинтезу спостерігається в умовах низької освітленості.

При підвищенні інтенсивності збуджуючого світла до $1500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ емпіричним критерієм фотоінгибування є зменшення величини qP нижче 0,6 [8], з одного боку, зниження квантового виходу фотохімічних реакцій ФСII в адаптованому до світла стані ($F'v/F'm$) і реального квантового виходу електронного транспорту ϕPSII , з іншого. Порівняння флуоресцентних параметрів показує, що у рослин, які виростили при низькій

Таблиця 1. Параметри індукції флуоресценції листків гороху, вирощеного на світлі зміненого спектрального складу високої інтенсивності

Світлові умови вирощування рослин гороху, середня щільність потоку фотонів	AL* мкмоль м ⁻² с ⁻¹	F _v /F _m	qP	NPQ	qN	fФCII	F' _v /F' _m
1200 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	1500	0,7785±0,001	0,601±0,051	1,7435±0,108	0,791±0,021	0,268±0,02	0,438±0,018
	500	0,7965±0,001	0,7975±0,008	0,5950±0,51	0,4645±0,04	0,538±0,05	0,6745±0,028
120 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	1500	0,744±0,001	0,412±0,041	1,66±0,107	0,832±0,022	0,143±0,03	0,331±0,031
	500	0,749±0,001	0,859±0,008	1,08±0,113	0,679±0,03	0,404±0,019	0,489±0,018

* AL – щільність потоку актинічного світла при збудженні флуоресценції хлорофілу

інтенсивності світла, *qP* нижче 0,6, а параметри *F'_v/F'_m* і *fФCII* значно знижуються при інтенсивному освітленні зі щільністю потоку квантів 1500 мкмоль· м⁻²·с⁻¹, тобто в цих умовах рослини мають всі ознаки фотоінгибування.

Щоб оцінити, як це впливає на термодинамічні параметри сполучення у хлоропластах, визначено швидкість електронного транспорту у хлоропластах, ізольованих зі «світлових» і «тіньових» рослин, у стані 4 за Чансом і в роз'єднуючих умовах. Повне роз'єднування досяглося за рахунок введення в реакційне середовище 10 мМ NH₄Cl.

Значення коефіцієнта сполучення *q* розраховували за формулою (27), виходячи з експериментально визначених величин швидкості перенесення електронів по повному фотосинтетичному електронтранспортному ланцюгу від води до метілвіологену в хлоропластах у стані 4 і швидкості роз'єданого електронного транспорту. Швидкість транспорту у стані фотосинтетичного контролю вимірювали в реакційному середовищі, яке не містило АДФ, у присутності 3 мм фосфату і 50 мкм АТФ.

Оптимальну термодинамічну ефективність системи розраховували для кожного значення коефіцієнта сполучення. З даних табл. 2 видно, що термодинамічні характеристики процесів енергетичного сполучення залежать як від світлових умов вирощування рослин гороху, так і від інтенсивності світла в ході експериментів з визначення швидкостей реакції Хіла. Найвищого значення коефіцієнт сполучення набував при насичуючому освітленні (500 мкмоль·м⁻²·с⁻¹) препаратів, ізольованих з листя гороху, вирощеного при високій інтенсивності світла. Для цих же зразків характерна і найвища швидкість фотофосфорилування (*J_p*). Внаслідок підвищення інтенсивності актинічного світла до надоптимальних значень величини коефіцієнта сполучення знижується швидкість фотофосфорилування. Можна припустити, що це спричинюється деструкцією фотосинтетичного апарату, яка починається в результаті фотоінгибування. Величина коефіцієнта сполучення хлоропластів гороху, отриманих з листя, вирощеного при низькій освітленості, трохи відрізнялася від величини *q* «світлових» хлоропластів при щільності актинічного потоку квантів 500 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ і різко знижувалася, якщо інтенсивність актинічного світла підвищували утричі. Розрахунки оптимальної термодинамічної ефективності показали, що перетворення світлової енергії в хлоропластах, виділених зі «світлових» рослин, відбувається ефективніше в широкому діапазоні інтенсивності збуд-

жуючого світла порівняно з «тіньовими» зразками. Причиною втрати ефективності фотосинтетичного апарату, сформованого за умов низької освітленості, очевидно, є фотоінгибування, яке розвивається при інтенсивності світла, що перевищує оптимальну.

Таблиця 2. Термодинамічна ефективність енерготрансформації в ізольованих хлоропластах гороху, вирощеного за різної інтенсивності світла

Щільність потоку фотонів, мкмоль м ⁻² с ⁻¹		$-J_{роз}$	$J_{фк}$	J_p	q	η_{max}
при вирощуванні	під час вимірювання в експерименті	мкмоль/мг хл на год.				
1200	500	550 ± 25	70 ± 4	230 ± 10	0,934199	0,474108
	1500	620 ± 30	80 ± 5	120 ± 9	0,933257	0,471442
120	500	550 ± 20	75 ± 5	150 ± 9	0,933108	0,471024
	1500	350 ± 15	80 ± 4	0	0,87831	0,353096

Вплив роз'єднувачів на ефективність енерготрансформації в ізольованих хлоропластах

Роз'єднування – фундаментальне поняття в теорії енерготрансформації. На початку 1950-х рр., коли мірою енерготрансформації вважали тільки швидкість синтезу АТФ, величина роз'єднування була єдиним параметром, котрий характеризував ступінь сполучення процесів електронного транспорту і фотофосфорильовання. Роз'єднувачі спочатку визначали за їх здатністю пригнічувати синтез АТФ і одночасно прискорювати електронний транспорт [31]. У рамках хеміосмотичної гіпотези $\Delta\mu^{H^+}$ розглядається як сполучна ланка між електронним транспортом і синтезом АТФ, а роз'єднувачі – як агенти, що прискорюють дисипацію ΔpH або $\Delta\psi$ шляхом прискорення нефосфорилуючих іонних потоків через мембрану тилакоїдів. Сучасне використання терміна «роз'єднування» знов втратило певний сенс і виявляє тенденцію до включення всіх процесів, які спричинюють посилену дисипацію ΔpH або $\Delta\psi$ [30].

За механізмом дії потенційно роз'єднуючі реагенти або обробки можна розділити на декілька класів:

1. Обробки, які збільшують загальну проникність тилакоїдів до іонів, включаючи протони (тобто детергенти, пошкодження мембран і так далі).

2. Реагенти, які специфічно збільшують мембранну провідність до H^+ іонів, або шляхом формування каналів (наприклад, граміцидін), або внаслідок того, що протонувана чи депротонувана форми реагенту здатні проникати через тилакоїдну мембрану (наприклад, FCCP).

Обидва ці типи викликають збільшений вихід протонів, що не компенсується виходом інших іонів через мембрану, і, отже, призводять до дисипації як ΔpH , так і $\Delta\psi$ [37].

3. Слабкі луги вільно проникають через мембрану в непротонуваному стані, проте накопичуються усередині тилакоїда в зарядженій формі після протонування

(наприклад, аміни). Цей механізм є електронейтральним і ефективно обмінює через тилакоїд один протон на один іон амонію.

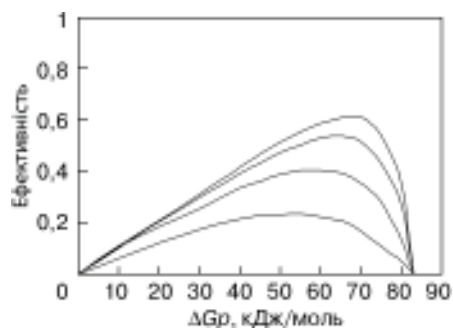
Окрім розглянутих механізмів роз'єднування, термодинамічна ефективність трансформації енергії може втрачатися в результаті процесів, що в англійській літературі отримали назву «slip» — пробій, перебіг, прослизання, помилка – на відміну від «leak» — виток — терміна, яким позначають посилення пасивного протонного перенесення через сполучну мембрану у напрямі протонного градієнта. «Slip» визначають двома шляхами [32]: 1) «справжній» пробій, або редокс–сліп (чи реакційний сліп) — зменшення протонного перенесення через протонні помпи ЕТЛ унаслідок внутрішньомолекулярного роз'єднування (BMP) електронного транспорту і фосфорилування [21].

Аналіз термодинамічних закономірностей дозволяє класифікувати дію різних агентів на процеси енергосполучення у фотосинтезуючих мембранах [26, 27]. На рисунках 2—4 наведені залежності ступеня ефективності енерготрансформації у хлоропластах від величини фосфатного потенціалу, отримані за умов додавання екзогенного ефектора до суспензії. Ці параметри були визначені для хлоропластів за кривими залежності швидкостей електронного транспорту, фотофосфорилування за різних значень фосфатного потенціалу та інтенсивності діючого світла. У даній роботі ми вивчили вплив протонофору NH_4Cl , гідрофобного каналоформеру граміцидину D і т.з. ADPR-реагенту FCCP на світлозалежні реакції хлоропластів. У табл. 3 наведені якісні ефекти деяких ефекторів на феноменологічні коефіцієнти і фосфатний потенціал у стані фотосинтетичного контролю $(\Delta G_p)_{\text{фк}}$, які можливо інтерпретувати як прояви редокс-сліпу, пробією в АТФсинтазі і протонного витоку.

Таблиця 3. Якісні ефекти редокс-сліпу, протонної течії і пробією в АТФсинтазі на феноменологічні коефіцієнти і величину фосфатного потенціалу $(\Delta G_p)_{\text{фк}}$

Процес роз'єднання	Вплив на				
	L_{ee}	L_{ep}	L_{pp}	Z	$(\Delta G_p)_{\text{фк}}$
Редокс-сліп	+	=	=	-	=
Пробій в АТФсинтазі	=	=	+	+	-
Протонна течія	=	=	+	+	-

Рис. 2. Вплив внутрішньомолекулярного роз'єднання редокс-компонентів ЕТЛ у присутності зростаючих концентрацій FCCP на ефективність сполучення за різних значень фосфатного потенціалу. Наведено криві для таких значень q : 0,972 (контроль), 0,953, 0,910, 0,780. Величину q змінювали, додаючи 10, 20 і 50 нМ FCCP, відповідно



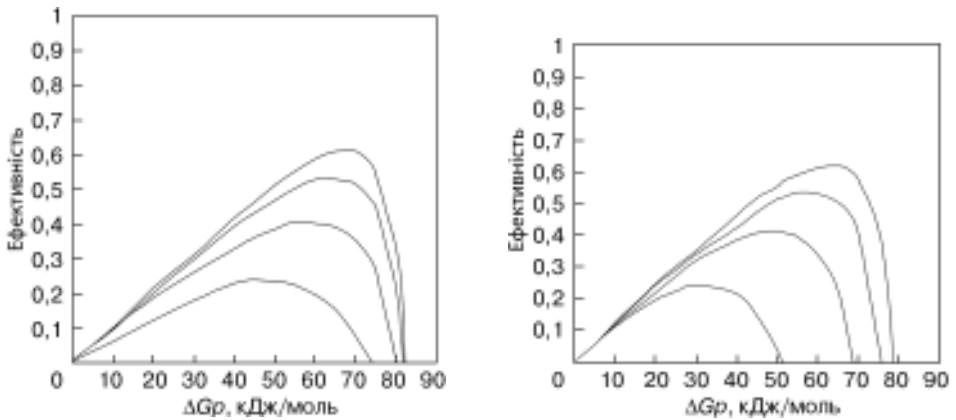


Рис. 3. Вплив зростаючої течії через тилакоїдну мембрану в присутності зростаючих концентрацій NH_4Cl на ефективність сполучення хлоропластів за різних значень фосфатного потенціалу. Наведено криві для таких значень q : 0,972 (контроль), 0,953, 0,910, 0,786. Значення q варіювали, додаючи 1, 2 і 10 мМ NH_4Cl , відповідно

Рис. 4. Вплив внутрішньомолекулярного роз'єднання АТФсинтази при додаванні граміцидину на ефективність сполучення хлоропластів за різних значень фосфатного потенціалу. Наведено криві для таких значень q : 0,951, 0,912, 0,780. Значення q варіювали, додаючи 1, 5 і 10 нМ граміцидину, відповідно

Дані рисунків 2–4 і табл. 3 дозволяють охарактеризувати три типи механізмів, що призводять до втрати ефективності сполучення електронного транспорту і синтезу АТФ у хлоропластах. 1. Пасивна протонна течія через тилакоїдну мембрану з люмену в напрямку протонного градієнта спостерігалася у присутності зростаючих концентрацій NH_4Cl . У цьому разі інгибування синтезу АТФ корелювало з падінням ΔpH . 2. У присутності наномолярних концентрацій граміцидину синтез АТФ пригнічувався без зниження величини ΔpH . Аналіз кінетичних кривих у даному випадку вказує на пробій («slip») на рівні АТФсинтази. 3. Для FCCP, що дезактивує систему фоторозкладання води при підвищенні інтенсивності освітлення хлоропластів, пригнічення фотофосфорилування відбувалося паралельно з інгибуванням фотовиділення кисню. Така поведінка системи вказує на електричний пробій («redox slip») на рівні протонної помпи фотосистеми II.

Висновки

У даній статті представлено результати досліджень процесів ефективності трансформації енергії у тилакоїдних мембранах хлоропластів і охарактеризовано процеси, що призводять до її зниження. Показано, що ефективність енерготрансформації хлоропластами залежить від світлових умов вирощування рослин і пов'язана з процесами, які призводять до інгибування фотосинтезу при високих інтенсивностях світла. Проведено порівняльне вивчення впливу синтетичних ефекторів різної природи на термодинамічну ефективність трансформації світлової енергії хлоропластами, визначено критерії, які дозволяють охарактеризувати стан спряженості енергодонорних та енергоакцепторних реакцій у тилакоїдах.

1. *Arnon D.I.* Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolase in *Beta vulgaris* // *Plant Physiol.* – 1949. – **24**, № 1. – P. 1–154.
2. *Avron D.W.* Photophosphorylation by swiss-chard chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – **40**. – P. 257–272.
3. *Bilger W., Björkman O.* Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis* // *Photosynth. Res.* – 1990. – **25**. – P. 173–185,
4. *Butler W.L.* Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis // *Ann. Rev. Plant Physiol.* – 1978. – **29**. – P. 345–378.
5. *Garlid K.D., Beavis A.D., Ratkje S.K.* On the nature of ion leaks in energy-transducing membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – **976**. – P. 109–120.
6. *Genty B., Harbinson J.* Regulation of light utilization for photosynthetic electron transport // *Photosynthesis and the Environment* / N. R. Baker (ed). – Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 1996. – P. 67–99.
7. *Hill T.L.* Free energy transduction in biology: the steady-state kinetic and thermodynamic formalism. – New York: Academ. Press, 1974.
8. *Horton P., Ruban A.V., Walters R.G.* Regulation of light harvesting in green plants // *An. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1996. – **47**. – P. 655–684.
9. *Jahns P., Junge W.* The protonic short-circuit by DCCD in photosystem II // *FEBS Lett.* - 1989. – **253**. – N 1, 2. - P. 33–37.
10. *Jahns P., Junge W.* Dicycloheximide carbodiimide-binding proteins related to the short-circuit of the proton pumping activity of photosystem II // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – **193**. – P. 728–736.
11. *Kedem O., Caplan S.R.* Degree of coupling and its relation to efficiency of energy transduction // *Trans. Faraday Soc.* – 1965. – P. 1897–1911.
12. *Maxwell K., Johnson G.N.* Chlorophyll fluorescence – a practical guide // *J. of Exp. Bot.* – 2000. – **51**. – P. 659–668.
13. *Meszana G., Westerhoff H.V., Somsen O.J.G.* Reply to Comment on: «Non-equilibrium thermodynamics of light absorption» // *J. Phys. A: Math. Gen.* – 2000. – **33**. - P. 1301–1303.
14. *Meszana G. and Westerhoff H.V.* Non-equilibrium thermodynamics of light absorption // *J. Phys. A: Math. Gen.* – 1999. – **32**. – P. 301–311.
15. *Murphy M.P., Brand M.D.* Variable stoichiometry of proton pumping by the mitochondrial respiratory chain // *Nature.* – 1987. – **329**. – P. 170–172.
16. *Murphy M.P., Brand M.D.* The stoichiometry of charge translocation by cytochrom oxidase and the cytochrome bc₁ complex of mitochondria at high membrane potential // *Eur. J. Biochem.* – 1988. – **173**. – P. 645–651.
17. *Murphy M.P.* Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – **977**. – P. 123–141.
18. *Pietrobon D., Azzone G.F., Walz D.* Effect of funiculosin and antimycin A on the redox-driven H⁺-pumps in mitochondria: on the nature of «leaks» // *Eur. J. Biochem.* – 1981. – **117**. – P. 389–394.
19. *Pietrobon D., Caplan S.R.* Flow-force relationships for a six-state proton pump model: intrinsic uncoupling, kinetics equivalence of input and output forces, and domain of approximately linearity // *Biochemistry.* – 1985. – **24**. – P. 5764–5776.
20. *Pietrobon D., Zoratti M., Azzone G.F. et al.* Non-equilibrium thermodynamic assesment of redox-driven H⁺-pump in mitochondria // *Eur. J. Biochem.* – 1982. – **127**. – P. 483–494.
21. *Pietrobon D., Zoratti M., Azzone G.F.* Molecular slippage in redox and ATPase H⁺-pumps // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – **723**. – P. 317–321.
22. *Quigg A., Kevekordes K., Raven J.A., Beardall J.* Limitations on microalgal growth at very low photon fluence rates: the role of energy slippage // *Photosynth Res.* – 2006. – **88**. – P. 299–310.
23. *Rosing J., Slater E.C.* The value of ΔG^0 for the hydrolysis of ATP // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1972. – **267**. – P. 275–290.
24. *Ross J., Vlad M.O.* Nonlinear kinetics and new approaches to complex reaction mechanisms // *Ann. Rev. Phys. Chem.* – 1999. – **50**. – P. 51–78.
25. *Rottenberg H.* The thermodynamic description of enzyme-catalyzed reactions. The linear relation between the reaction rate and the affinity // *Biophys. J.* – 1973. – **13**. – P. 503–511.
26. *Rottenberg H., Gutman M.* Control of the rate of reverse electron transport in submitochondrial particles by the free energy // *Biochemistry.* – 1977. – **16**. – P. 3220–3227

27. *Rottenberg H.* Non-equilibrium thermodynamics of energy conversion in bioenergetics // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – **549**. – P.225–253.
28. *Rottenberg H., Gruenwald T., Avron M.* Direct determination of pH in chloroplasts and its relation to the mechanism of photoinduced reactions // *FEBS Lett.* – 1971. – **13**. – N 1. – P. 32–44.
29. *Rottenberg H., Gruenwald T., Avron M.* Determination of pH in chloroplasts. 1. Distribution of ¹⁴C methylamine // *Eur. J. Biochem.* – 1972. – **25**. – N 1. – P. 54–63.
30. *Rottenberg H., Steiner-Mordoch S.* Free fatty acids decouple oxidative photophosphorylation by dissipating intramembranal protons without inhibiting ATP synthesis driven by proton electrochemical gradient // *FEBS Lett.* – 1986. – **202**. – N 2. – P. 314–318.
31. *Rottenberg H.* Decoupling of oxidative phosphorylation and photophosphorylation // *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* – 1990. – **1018**. – N 1. – P. 1–17.
32. *Soboll S., Stucki J.W.* Regulation of the degree of coupling of oxidative phosphorylation in intact rat liver // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – **807**. – P. 245–254.
33. *Schreiber U, Schliwa U, Bilger W.* Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer // *Photosynth. Res.* – 1986. – **10**. – P. 51–62.
34. *Stucki J.W.* The thermodynamic buffer enzymes // *Eur. J. Biochem.* – 1980. – **109**. – P. 257–268.
35. *Stucki J.W.* The optimal efficiency and the economic degree of coupling «of oxidative phosphorylation» // *Eur. J. Biochem.* – 1980. – **109**. – P. 269–283.
36. *Van Dam K., Westerhoff H.V., Krab K. et al.* Relationship between chemiosmotic flows and thermodynamic forces in oxidative phosphorylation // *Biochim Biophys Acta.* – 1980. – **591**. – P. 240–250.
37. *Wanders R.J.A., Van den Berg G.B. Tager J.M.* A re-evaluation of conditions required for an accurate estimation of the extramitochondrial ATP/ADP ratio in isolated rat-liver mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1984. – **767**. – P. 113–119.
38. *Westerhoff H.V., Van Dam K.* Thermodynamics and control of biological free-energy transduction. – Amsterdam: Elsevier, 1987.
39. *Westerhoff H.V., Hellingwerf K.J., Arents J.C. et al.* Mosaic nonequilibrium thermodynamics describes biological energy transduction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1981. – **78**. – P. 3554–3568.
40. *Woelders H., Van der Zande W.J., Colen A.M.A.F. et al.* The phosphate potential maintained by mitochondria in State 4 is proportional to the protonmotive force // *FEBS Lett.* – 1985. – **179**. – P. 278–282.