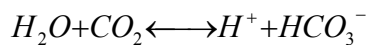


ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ pH И РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА В СУСПЕНЗИИ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОБЪЕКТОВ

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 μ_0 - стандартный химический потенциал, зависящий от природы растворителя, c - концентрация, ϕ - 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.

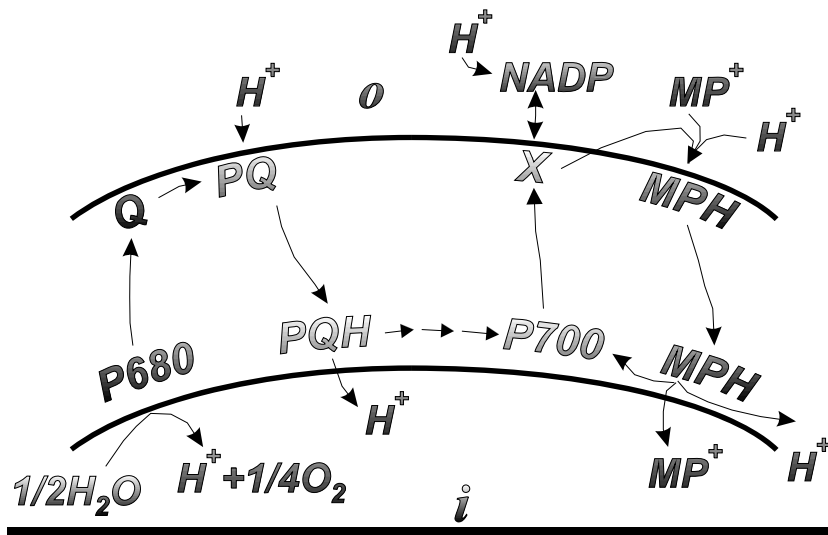


Рис. 1. Схема организации электронтранспортной цепи в тилакоидной мембране хлоропластов (MP^+ - катион феназинметосульфата)

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

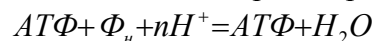
Поэтому $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$ называют иногда протондвижущей силой (Δp) и выражают в милливольтгах:

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

множитель $2,3 RT/F$ при температуре $20^\circ C$ 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^+ внутрь тилакоида уравнивается пассивным потоком H^+ наружу по градиенту концентрации и электрического потенциала. Стационарное состояние достигается обычно за 10 - 20 с. Амплитуда фотоиндуцированных изменений рН в незабуференной суспензии хлоропластов составляет обычно 0,01 - 0,02 единицы рН.

3. Изменения рН при фотофосфорилировании. Эти изменения рН обусловлены необратимым поглощением H^+ из среды при синтезе АТФ:

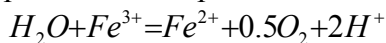


На изолированных хлоропластах эти изменения можно наблюдать в присутствии фосфат-акцепторной системы (неорганический фосфат и АДФ). Потребление H^+ при синтезе АТФ лежит в основе потенциометрического метода определения фосфорилирования. Метод состоит в том, что регистрируют изменения рН в суспензии хлоропластов 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.

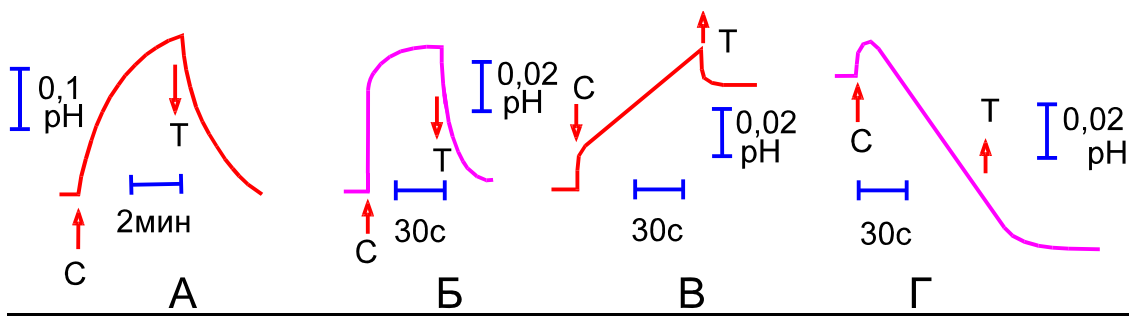
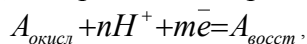


Рис.2. А - фотоиндуцированные изменения pH в суспензии водорослей, обусловленные фиксацией CO_2 ; Б - фотоиндуцированное подщелачивание среды в суспензии изолированных хлоропластов; В - подщелачивание среды в суспензии хлоропластов при фотофосфорилировании; Г - необратимое подкисление среды в реакции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

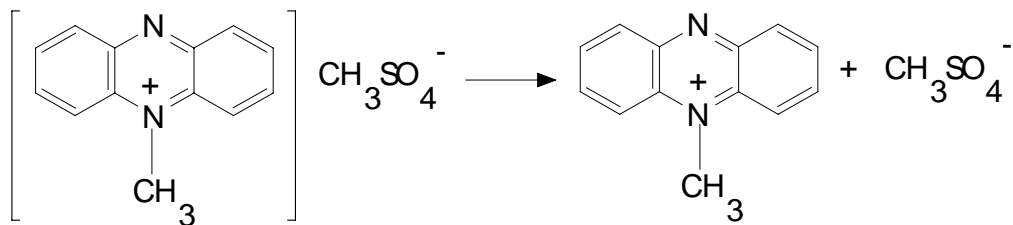
Для среды, в которой поддерживается окислительно- восстановительное равновесие:



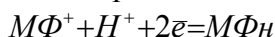
редокс-потенциал определяется соотношением:

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

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 $\text{pH} > 3,5$), одна из которых окисленная ($\text{M}\Phi^+$ - метилфеназоний), а вторая - восстановленная ($\text{M}\Phi\text{H}$ - 5-метил-гидрофеназин). В водном растворе существует равновесие между катионной формой $\text{M}\Phi^+$ и незаряженной восстановленной формой $\text{M}\Phi\text{H}$



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

где φ_0 - стандартный редокс-потенциал пары $\text{M}\Phi^+ / \text{M}\Phi\text{H}$, равный +150 мВ при $\text{pH} 7$. В водных растворах равновесие сдвинуто влево, и концентрация $\text{M}\Phi^+$ на несколько порядков превышает концентрацию восстановленной формы $\text{M}\Phi\text{H}$. 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.

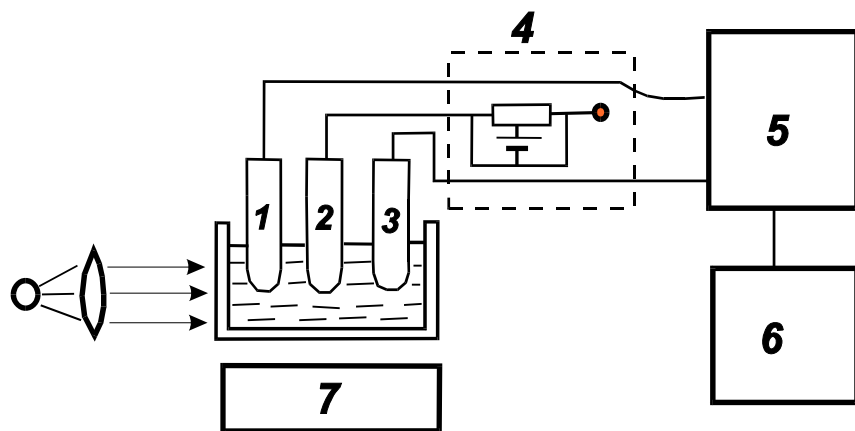


Рис.3. Схема установки: 1 - стеклянный рН-электрод, 2 - редоксметрический электрод, 3 - электрод сравнения, 4 - блок переключения каналов и компенсации, 5 - рН-метр, 6 - самопишущий потенциометр, 7 - магнитная мешалка

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:

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

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.