

Член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН, С. Д. ВАРФОЛОМЕЕВ,
С. В. ЗАЙЦЕВ, М. Д. ИЛЬИНА

КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ «СТАРЕНИЯ» ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ИЗОЛИРОВАННЫХ ХЛОРОПЛАСТОВ

В настоящее время весьма актуальны проблемы широкого освоения новых источников энергии. Необходимость разработки основ новой энергетики, использующей возобновляемые источники энергии, определяется существующим и непрерывно прогрессирующим дефицитом ископаемых топлив, запасы которых ограничены (¹). Одним из возможных путей выхода из будущего «энергетического кризиса» является широкое использование солнечной энергии. Системы, ассимилирующие и преобразующие солнечную энергию, могут быть созданы на основе фотосинтетического аппарата растений, водорослей и фототрофных бактерий. Достижимой и в биохимическом плане весьма попятной является возможность получения из воды энергоемкого топлива в виде молекулярного водорода с помощью фотосинтетического аппарата растений (²). Биохимический процесс фотосинтетического получения водорода в сочетании с интенсивно развиваемыми в настоящее время принципами иммобилизации и стабилизации ферментов и биологических структур можно рассматривать как один из возможных путей эффективного преобразования солнечной энергии в энергию транспортабельного, экологически безвредного топлива (³).

Одним из центральных вопросов разработки искусственных систем, ассимилирующих солнечную энергию с помощью механизма природного фотосинтеза, является проблема стабильности и продолжительности работы используемых фотосинтезирующих структур. Задачу стабилизации работы фотосинтетического аппарата могут облегчить исследования, направленные на изучение кинетики и механизма инактивации фотосинтеза, поскольку без достаточно ясного понимания механизма «старения» фотосинтетического аппарата трудно рассчитывать на возможность существенной стабилизации фотосинтетической функции *in vitro* в системах, ассимилирующих солнечную энергию. Настоящее исследование посвящено изучению кинетики инактивации изолированных хлоропластов гороха.

Хлоропласты выделяли из листьев гороха в соответствии с методикой (⁴). В качестве экспериментально удобной характеристики фотосинтетической активности хлоропластов использовали реакцию фотоокисления воды феррицианид-ионом (реакцию Хилла). Определение скорости реакции Хилла проводили: а) потенциметрически по скорости изменения редокс-потенциала раствора, б) спектрофотометрически по скорости изменения в растворе концентрации феррицианид-иона. Оба экспериментальных метода приводят к одинаковым результатам.

Кинетические закономерности потери активности суспензией изолированных хлоропластов имеют сложный характер. На рис. 1 приведены типичные кривые изменения активности суспензии хлоропластов в процессе инкубации в темноте. При инкубации хлоропластов в условиях $pH > 7$ на кинетической кривой наблюдается хорошо выраженный максимум (кривая 1). Анализ показывает, что кинетическая кривая описывается, по крайней мере, суммой двух экспоненциальных членов. Формально-кинетические закономерности такого рода сложных многостадийных реакций

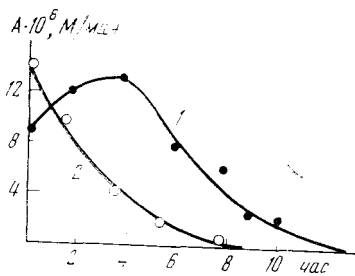


Рис. 1

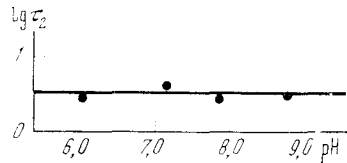


Рис. 2

Рис. 1. Кинетические кривые инактивации хлоропластов. 1 — pH 7,9; 2 — pH 6,0 (20 мМ) трис-НСl, 40 мМ фосфат, 10 мМ NaCl, 0,4 М сахарозы, 30° С). Фотосинтетическая активность охарактеризована скоростью фотовосстановления феррицианид-иона (мол/л·мин) в стандартных условиях освещения суспензии хлоропластов (5 мг/л хлорофилла), содержащей 0,4 мМ $K_3Fe(CN)_6$, 15 мМ KCl, 20 мМ трис-НСl буфер

Рис. 2. Зависимость от pH кинетики необратимой инактивации хлоропластов (0,4 М сахароза, 10 мМ NaCl, 5 мМ трис-НСl, 1 мМ ацетат патрия, 30° С)

рассмотрены в работе (5). Простейший кинетический механизм, который согласуется с наблюдаемыми экспериментальными результатами инактивации хлоропластов, включает две фотосинтетически активные формы хлоропластов, различающиеся по активности и стабильности



Неактивные хлоропласты

где k_1 — эффективная константа скорости превращения формы хлоропластов x_1 в форму x_2 , k_1^d , k_2^d — константы скорости инактивации, x_1 и x_2 , α_1 , α_2 — парциальные фотосинтетические активности каждой из форм. При условии, что в начальный момент времени все хлоропласты находятся в форме x_1 (т. е. при $t=0$ $[x_1]=[x]_0$, $[x_2]=0$) кинетическое описание схемы (1) приводит к уравнению, описывающему изменение во времени активности суспензии хлоропластов:

$$A = \left\{ \alpha_1 [x]_0 - \frac{\alpha_2 k_1 [x]_0}{k_1 + k_1^d - k_2^d} \right\} e^{-t/\tau_1} + \frac{\alpha_2 k_1 [x]_0}{k_1 + k_1^d - k_2^d} e^{-t/\tau_2};$$

$$\tau_1^{-1} = k_1 + k_1^d; \quad \tau_2^{-1} = k_2^d. \quad (2)$$

Найденные в соответствии с этим уравнением параметры $k_1 + k_1^d$ и k_2^d (pH 7,9; 30°) равны 0,7 и 0,3 час⁻¹ ($\tau_1=1,45$ час, $\tau_2=3,45$ час).

Кинетика «старения» хлоропластов зависит от pH среды. При переходе к нейтральным и слабощелочным pH существенно изменяется характер кинетической кривой инактивации (рис. 1, 2). В этих условиях кинетика инактивации представляет собой обычную экспоненциальную зависимость, при этом начальная активность хлоропластов заметно возрастает. Наблюдаемые различия в кинетике «старения» хлоропластов при разных значениях pH связаны с зависимостью от pH только кинетического процесса, характеризующегося величиной τ_1 . Из приведенной на рис. 2 зависимости величины τ_2 от pH видно, что константа скорости необратимой инактивации хлоропластов $k_2^d = \tau_2^{-1}$ в исследуемом диапазоне pH практически постоянна. Кинетический процесс, приводящий к увеличению активности хлоропластов τ_1 , в кислых значениях pH протекает быстрее, и к моменту измерения активности уже заканчивается (рис. 1, 2).

Наиболее важным результатом данного исследования является регистрация двух кинетических процессов, протекающих при старении хлоропластов. Как в большинстве кинетических исследований остается открытым

вопрос о физической природе «элементарных» стадий. Однако некоторые гипотезы о природе этих процессов могут быть высказаны. Проведенный анализ показывает, что активность формы x_2 в реакции Хилла выше, чем формы x_1 ($\alpha_2 > \alpha_1$). Можно предположить, по крайней мере, два механизма увеличения активности хлоропластов в процессе старения: а) увеличение доступности феррицианид-иону фотохимических реакционных центров в процессе деструкции фотосинтетической мембраны; б) разобщения электронного транспорта и фотофосфорилирования (или инактивация фотофосфорилирования). В последнем случае форма хлоропластов x_2 должна отличаться отсутствием активно работающей системы фотофосфорилирования.

Наибольший интерес с точки зрения возможности стабилизации работы хлоропластов *in vitro* и создания на их основе систем ассимиляции солнечной энергии представляет процесс необратимой инактивации, характеризующийся константой скорости k_2^d . Можно думать, что по своему физическому смыслу он представляет собой один из следующих процессов: а) тепловую денатурацию какого-либо из ключевых белков в механизме переноса электрона; б) тепловую денатурацию фотосинтетической мембраны; в) тепловую структурную дезорганизацию фотосинтетического аппарата, вызванную переходом ключевых, наиболее гидрофильных белков в водную фазу. Дальнейшие исследования по стабилизации работы изолированных хлоропластов должны быть направлены прежде всего на выяснение природы этой стадии механизма старения фотосинтетического аппарата.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
30 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. Люстиг, Курьер ЮНЕСКО, № 1, 4 (1974). ² J. R. Veneman, J. A. Berenson *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 2317 (1973). ³ С. Д. Варфоломеев, М. В. Гусев и др., Получение и применение иммобилизованных ферментов, тез. докл. I Всесоюз. симпозиума, Таллин, 1974, стр. 32. ⁴ M. Avron, Biochim. et biophys. acta, v. 40, 257 (1960). ⁵ П. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, Усп. хим., т. 43, 835 (1974).