

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 8-NR 3

1981 (139-226)

**Postępy
Biologii
Komórki**

PWN – WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik

Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Współredaktorem tego zeszytu jest Zbigniew KANIUGA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Jerzy KAWIAK,
Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,
ul. Marymoncka 99, 01 - 813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 592 + 108 egz. Ark. wyd. 6,75. Ark. druk. 5,25 + 0,25 wkł. Papier druk. sat. III kl., 80 g,
70 × 100 cm. Oddano do składania w kwietniu 1981 r. Podpisano do druku w sierpniu 1981 r.
Druk ukończono w sierpniu 1981 r. Zam. 152/81 — Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

OD REDAKCJI

Niniejszy zeszyt Postępów Biologii Komórki zawiera referaty wygłoszone na zaproszenie organizatorów podczas Sympozjum „Biochemiczne podstawy wykorzystania energii słonecznej” w ramach XVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie (11-13 września 1980 r.). Organizatorem Sympozjum był prof. dr hab. Zbigniew Kaniuga, który przygotował materiały do druku pod względem merytorycznym.

PHOTOPRODUCTION OF H₂ BY PHOTOSYNTHETIC BACTERIA.
HYDROGENASE-NITROGENASE INTERRELATIONSHIP *

WYTWARZANIE H₂ PRZEZ BAKTERIE FOTOSYNTETYZUJĄCE.
WSPÓLZALEŻNOŚĆ HYDROGENAZY I NITROGENAZY

Paulette M. VIGNAIS, Jacques MEYER and Patrick C. HALLENBECK

Biochimie, Département de Recherche Fondamentale Grenoble, France
(INSERM U. 191 et E. R. CNRS n° 235) C.E.N-G 85 X

Summary. Photosynthetic bacteria are capable of capturing solar energy to meet the energy demands of two important biological processes, photosynthesis and nitrogen fixation.

This review briefly summarizes the properties of two key enzymes: nitrogenase and hydrogenase involved in the H₂ metabolism of photosynthetic bacteria.

The methods advocated to increase H₂ photoproduction capability in living cells in view of a possible use of photosynthetic bacteria for industrial H₂ production include: 1 — selection of naturally adept strains, 2 — protection from inhibitors (O₂ and NH₄⁺), 3 — stabilization of cells and enzymes and 4 — genetic engineering.

Streszczenie. Bakterie fotosyntetyzujące wykorzystują energię słoneczną do dwóch procesów biologicznych: fotosyntezy i włączania azotu.

W artykule krótko przedstawiono właściwości dwóch kluczowych enzymów biorących udział w metabolizmie wodoru u bakterii fotosyntetyzujących, tj. nitrogenazy i hydrogenazy.

Ze względu na możliwość zastosowania bakterii fotosyntetyzujących w przemysłowym wytwarzaniu wodoru, opracowywane są następujące techniki umożliwiające wzmożenie tego procesu: 1 — selekcja odpowiednich szczepów, 2 — ochrona przed hamującym działaniem O₂ i NH₄⁺, 3 — stabilizacja komórek i enzymów, 4 — inżynieria genetyczna.

There is much recent research in alternative energy sources and some of this attention has been focused on biological systems as solar energy converters.

* Delivered at a Symposium on: "Biochemical basis of solar energy utilisation", XVII Meeting of Polish Biochemical Society, September 11-13, 1980.

TABLE 1

Bacteria and algae having the capacity to produce H_2

| | |
|--------------------|--|
| 1) via Hydrogenase | <p>Anaerobic bacteria</p> <p><i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Desulfovibrio vulgaris</i> <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> <i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Escherichia coli</i></p> <p>Eucaryotic algae</p> <p><i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella fusca</i> <i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Ulva fasciata</i> <i>Porphyridium cruentum</i> <i>Ascophyllum nodosum</i> <i>Euglena gracilis</i></p> |
| 2) via Nitrogenase | <p>Non photosynthetic bacteria</p> <p><i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i></p> <p>Photosynthetic bacteria</p> <p><i>Rhodospseudomonas capsulata</i> <i>Rhodospseudomonas palustris</i> <i>Rhodospseudomonas acidophila</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Chromatium vinosum</i></p> <p>Cyanobacteria (blue-green algae)</p> <p><i>Anabaena cylindrica</i> <i>Nostoc muscorum</i> <i>Gloeocapsa (Gloeotheca)</i> <i>Plectonema boryanum</i></p> |

Many photosynthetic organisms either eukaryotic or prokaryotic (Table 1) have the capacity to produce hydrogen gas (cf. [32, 44]; [4] for review).

The photosynthetic bacteria are of interest since they are capable of capturing solar energy to meet the energy demands of two important biological processes, photosynthesis and nitrogen fixation. They exhibit a diversified metabolism, and are able to sustain growth with the intensive energy demands of nitrogen fixation under at least five different growth conditions : photoheterotrophic, photoautotrophic, microaerobic organotrophic, microaerobic chemoheterotrophic and "fermentative" (with an added organic oxidant). The mechanism of generation of reducing power is presently mostly unknown for any of the possible growth modes.

Photosynthetic bacteria have been shown to produce large quantities

of hydrogen (without contaminating oxygen) or ammonia, with light and simple organic or inorganic substrates. The photoproduction of H₂ by photosynthetic bacteria was first observed by Gest and Kamen in 1949 [11, 12]. H₂ photoproduction by intact cells has been since studied by several laboratories and is beginning to be elucidated.

PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSPORT

The process involves the functioning of the photosynthetic apparatus (Fig. 1). The source of electrons is a reduced carbon compound (in Fig. 1, succinate or NADH) which donates its electrons to the electron transport chain. The action of light raises the energy of the donated electrons enabling them to reduce a low potential reductant such as ferredoxin. This may be either directly through light induced electron transport, or, more likely, through reverse electron flow induced by an energized membrane. Thus, the electrons for the H₂ production step follow essentially the same pathways as those leading to carbon fixation. The actual

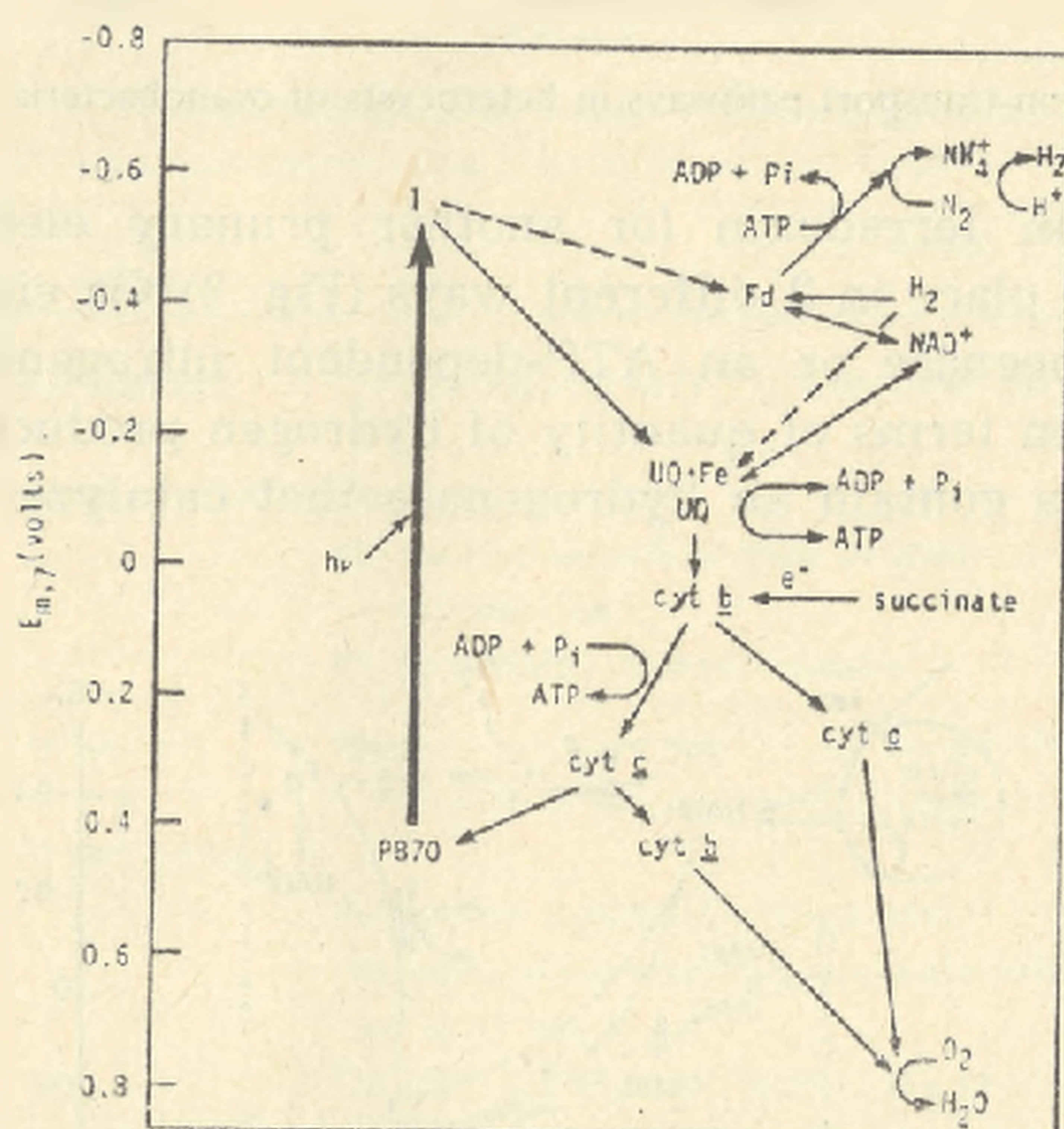


Fig. 1. Electron transport in photosynthetic bacteria and its relationship to N₂ fixation and H₂ metabolism

Light excites an electron in P870, the reaction center bacteriochlorophyll, to a level where it can reduce the acceptor I (Bacteriopheophytin). Subsequently the electron is transferred sequentially through an iron-quinone moiety (UQ·Fe), a pool of ubiquinone (UQ), cytochrome carriers, and back to oxidized P870. In the process ATP is generated. Noncyclic electron transport to ferredoxin (Fd) is represented by a broken line indicating an uncertain reaction. The scheme presented includes aerobic respiratory pathways which reflect data of Marrs and Gest [28] and La Monica and Marrs [24] (from [44])

shunting of electrons for H_2 production is not exactly known yet. It could occur directly after ferredoxin (or another primary electron acceptors) (Fig. 1).

Cyanobacteria (blue-green algae) have also been shown capable of producing hydrogen in specialized cells called heterocysts. The transfer

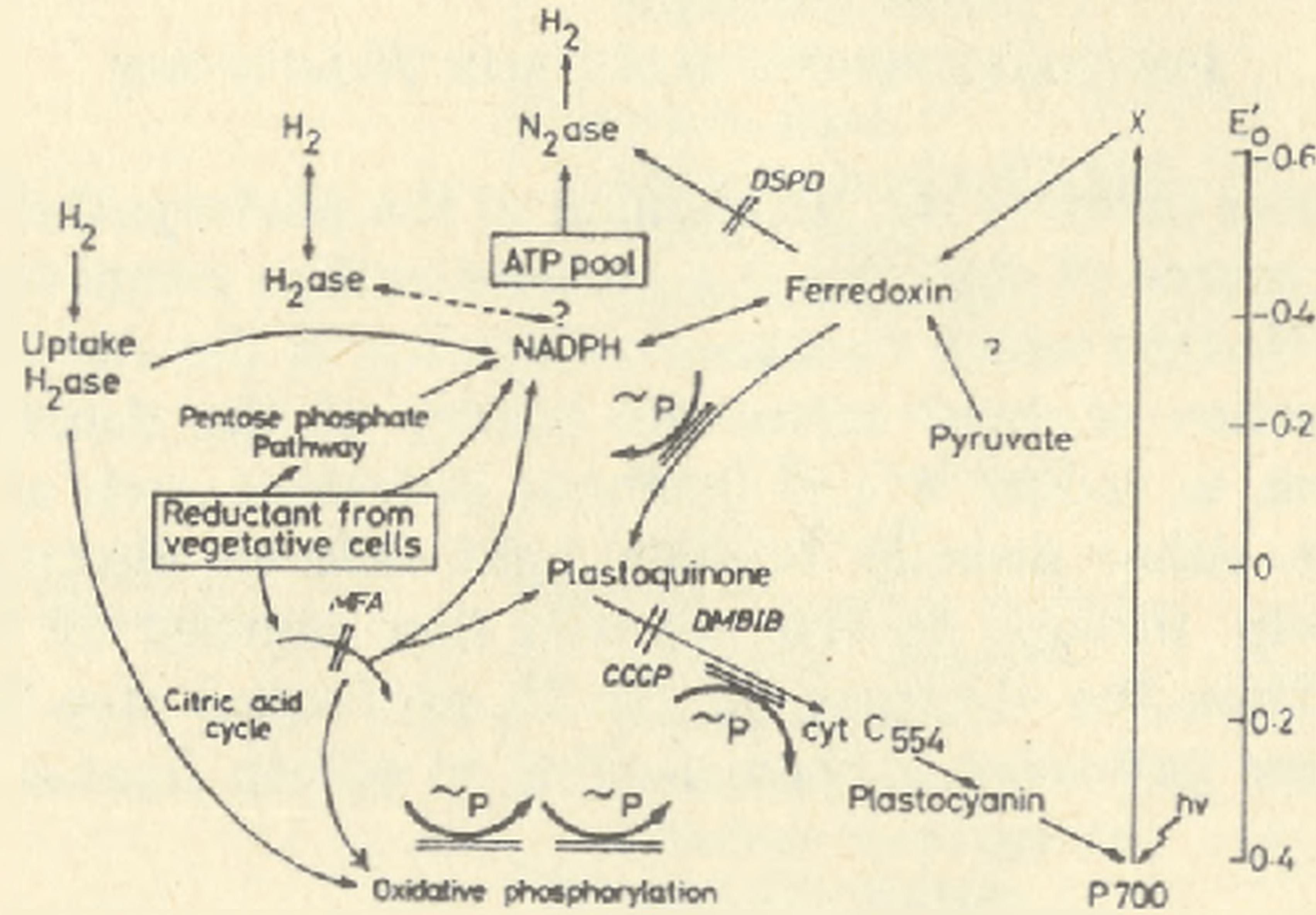


Fig. 2. Electron transport pathways in heterocysts of cyanobacteria. (from [15])

of electrons from ferredoxin (or another primary electron donor) to protons can take place in 2 different ways (Fig. 2) via either an ATP-independent hydrogenase or an ATP-dependent nitrogenase system (the most important in terms of quantity of hydrogen produced). In addition, the cyanobacteria contain an hydrogenase that catalyzes hydrogen con-

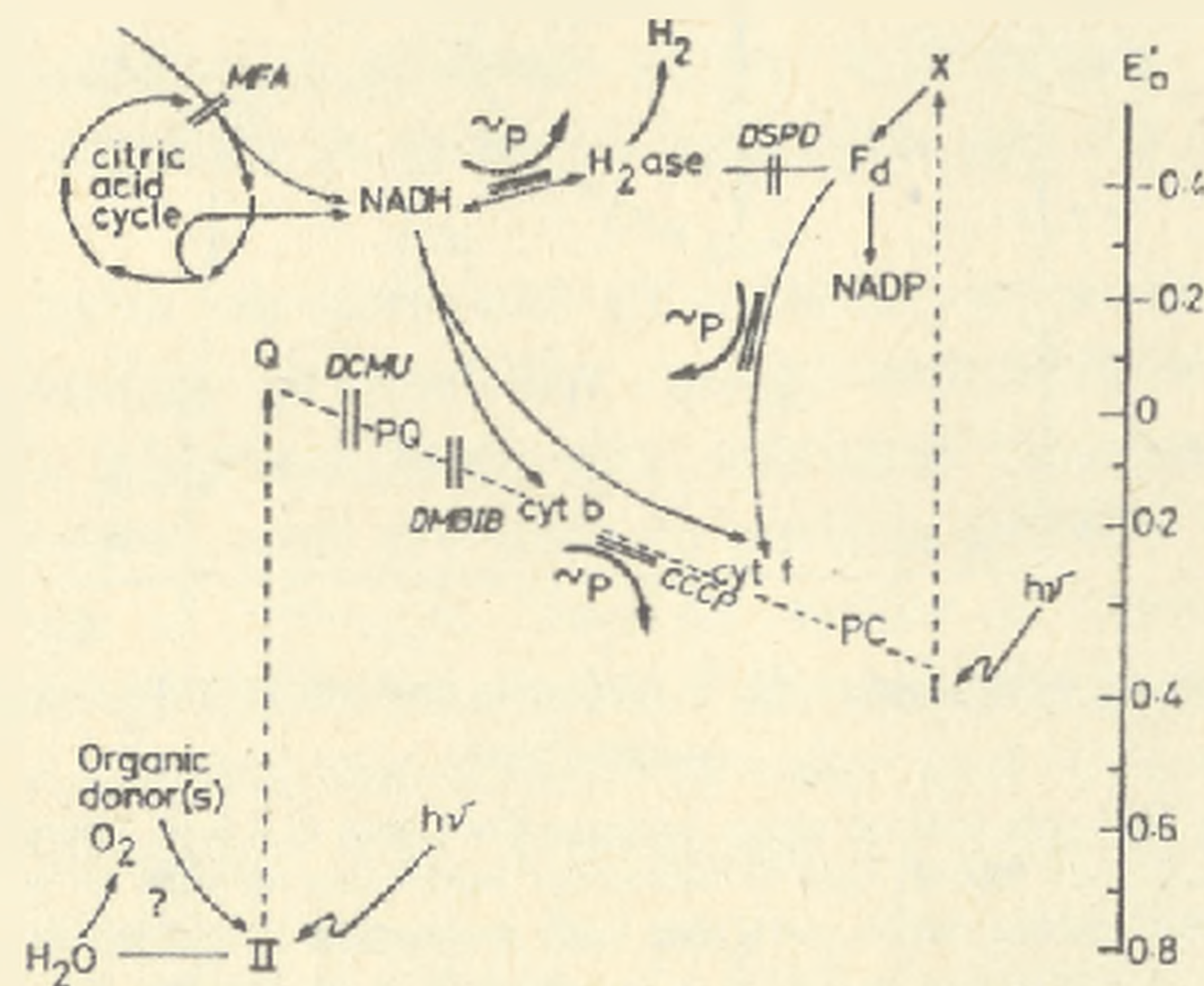


Fig. 3. Hydrogen metabolism of green algae (from [15])

sumption. Not all species of green algae, cyanobacteria or photosynthetic bacteria contain all three H₂ metabolising systems. (Energetically very little is known about the relative efficiency of each system). In the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*, studied in our laboratory, the presence of a soluble hydrogenase could not be detected. This photosynthetic bacterium seems to contain only a membrane-bound hydrogenase functioning as a H₂-uptake hydrogenase.

Hydrogen production in heterocysts of cyanobacteria shows many interesting similarities to that of the photosynthetic bacteria: 1) the ATP required for nitrogenase activity (hydrogen production) is generated through cyclic photophosphorylation, 2) the electrons for the reduction of protons come from an organic carbon compound (in the case of heterocysts this organic carbon compound is generated by the photoreduction of CO₂ in adjacent vegetative cells).

Hydrogen is also produced by green algae, which can utilize water as the electron donor for photosynthesis, as illustrated by Fig. 3. Green algae possess two photosystems, as do plant chloroplasts, and it is now generally accepted that, in these organisms, water may serve as the

TABLE 2
H₂ Production by photosynthetic organisms

| Organisms | Enzyme systems | Features |
|-------------------------------------|------------------------------------|--|
| Green algae | Hydrogenase + 2 Photosystems | H ₂ production only by anaerobically adapted cells Can split water H ₂ photoproduction may or may not be linked to O ₂ photoproduction O ₂ sensitivity of hydrogenase |
| Blue-green algae (cyanobacteria) | Nitrogenase + 2 Photosystems | H ₂ production capacity in unicellular or filamentous, heterocystous and non-heterocystous organisms Protection against O ₂ inactivation in heterocysts No adaptation required, light-stimulated H ₂ production Can split water Uptake hydrogenase lowers H ₂ production |
| Photosynthetic bacteria | Nitrogenase + 1 Photosystem | Use simple organic and inorganic substrates as electron donors Do not split water Grown easily, versatile metabolism Utilize both visible and near infrared light in photosynthesis Uptake hydrogenase and respiration can protect nitrogenase against O ₂ inactivation Genetic techniques are already applied |

primary substrate for hydrogen (and oxygen) production ([3, 15] for review).

In conclusion, for H₂ photoproduction, solar energy drives the photosynthetic system by supplying the energy for the transfer of electrons from the donor compound to a suitable low potential reductant such as ferredoxin. This donor compound varies from organism to organism. Cyanobacteria and green algae can carry out water photolysis, photosynthetic bacteria cannot; they need organic (or sulfur) compounds as electron donors. (Cheap suitable substrates are available in agricultural and industrial wastes). The main features characterizing H₂ production by photosynthetic organisms are summarized in Table 2.

TWO KEY ENZYMES, NITROGENASE AND HYDROGENASE

Two enzymes are directly involved in the metabolism of H₂, namely hydrogenase and nitrogenase.

Hydrogenase catalyzes the so-called "activation" of hydrogen according to reaction (1):



In vitro the hydrogenase reaction is reversible and, depending upon the imposed conditions under which the enzyme functions, hydro-

TABLE 3

General properties of enzymes involved in H₂ metabolism

| Type | M.W. (approx.) | Active site | Properties | Inhibitors | Function |
|----------------------------------|--|-----------------|---|---------------------------------|--|
| "Classical" hydrogenase | 60 000 | Fe S | Soluble Reversible ATP-independent Fd-dependent | CO, O ₂ | Disposal of excess electrons from fermentation |
| "Uptake" hydrogenase | 60 000 | Fe S | Membrane-bound H ₂ uptake ATP-independent Electron acceptor unknown | CO | H ₂ recycling |
| nitrogenase = 2 Components | Component I: 220 000 Component II: 60 000 | Mo Fe S Fe S | Soluble Irreversible H ₂ production ATP-dependent Fd-dependent | O ₂ , N ₂ | N ₂ fixation |

Adapted from [2].

genase can catalyze either the production of H₂ (when the electron donor has a redox potential low enough, i.e. around the redox potential of the H₂ electrode) or the uptake of H₂ (in the presence of an electron acceptor of redox potential higher than that of the H₂ electrode). In vivo the hydrogenase of fermentative bacteria produces H₂ while the hydrogenase found in N₂ fixers functions as an uptake hydrogenase (Table 3).

Nitrogenase catalyzes the reduction of N₂ to NH₃ by an ATP-dependent reaction as indicated by reaction (2) :



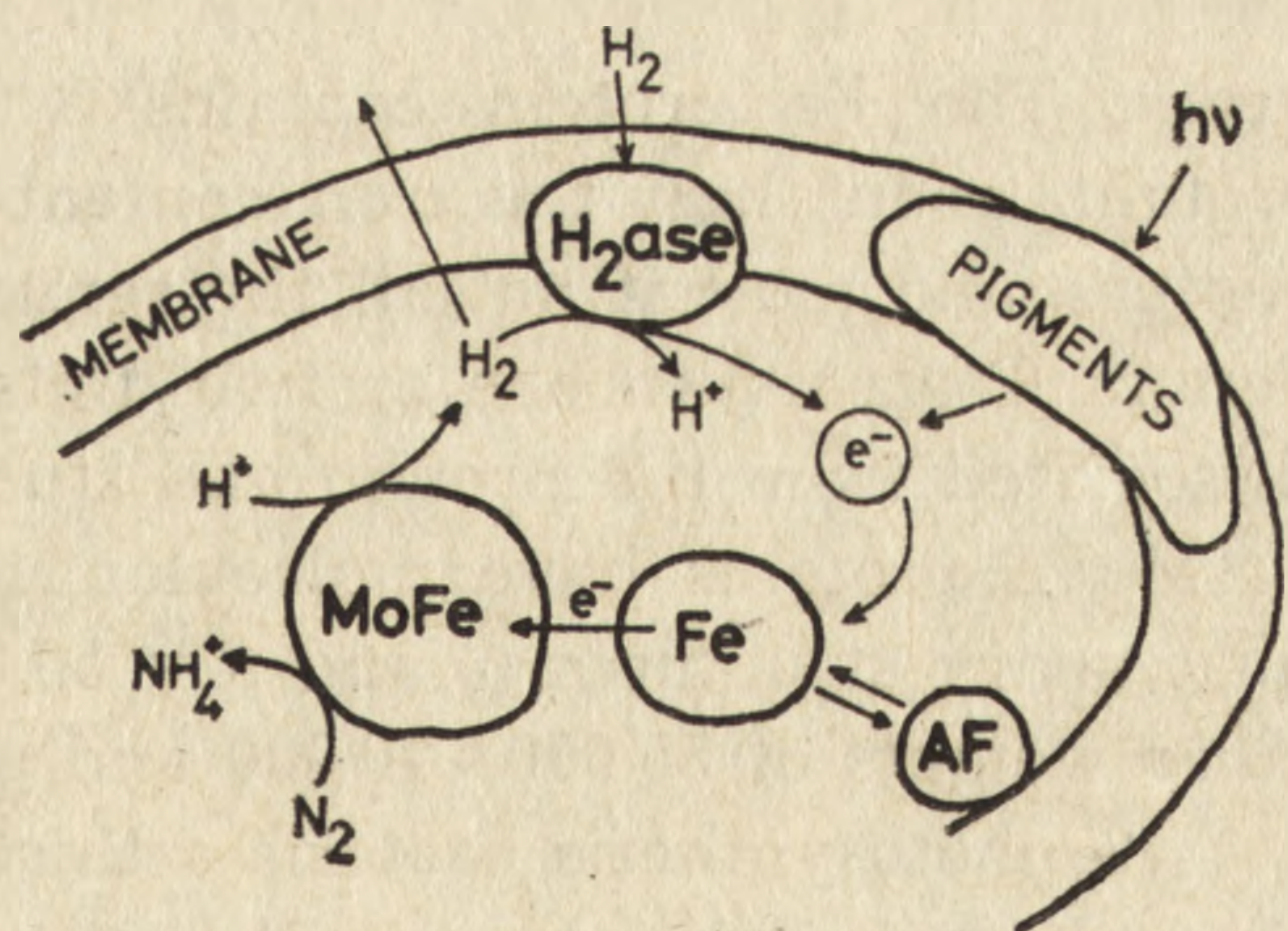
The electron donor is a compound of low redox potential (probably a ferredoxin). The reaction is energy-consuming; it consumes at least 2 mol of ATP per electron transferred so that a minimum of 12 ATP are consumed per mol of dinitrogen. Furthermore together with N₂, the nitrogenase complex has the property of reducing protons so that 1.5 mol of H₂ are produced per mol of dinitrogen reduced.

This H₂ production, mediated by nitrogenase, consumes ATP and low potential electrons and thus represents a loss of energy for the cell. One role of hydrogenase when functioning as an uptake-hydrogenase is precisely to recover some of the energy which would be lost in the form of H₂ (Fig. 4).

The interrelationships between hydrogenase and nitrogenase have been detailed in a special issue of *Biochimie* (Vol. 60, n°3, 1978).

Fig. 4. Simplified scheme of the hydrogen cycle in photosynthetic bacteria

The membrane bound hydrogenase (H₂ ase), the two soluble protein components of nitrogenase (Fe and MoFe), and the activating factor (AF) of the Fe protein are shown here. The membrane bound structure labelled "pigments" is in fact a complicated and highly ordered set of proteins containing chlorophylls and other pigments. e⁻ designates several proteins the function of which is to transfer electrons from or to other proteins. They may accept electrons from the photosynthetic apparatus (or from hydrogenase), and yield electrons to the Fe component of nitrogenase.



THE NITROGENASE SYSTEM

STRUCTURE OF THE ENZYMES

Nitrogenases extracted and purified from a number of bacteria display remarkably similar structural and functional properties (Table 3). They consist of two proteins, the larger of which (called MoFe protein

or component I or nitrogenase) contains molybdenum, non heme iron, sulfide and carries the substrate reducing site. The smaller protein (Fe protein or component II or nitrogenase reductase) contains non heme iron, sulfide and serves as a specific reductant for the MoFe protein. The molybdenum, iron, and inorganic sulfur atoms of nitrogenase are assembled in structures that have been partially resolved in recent

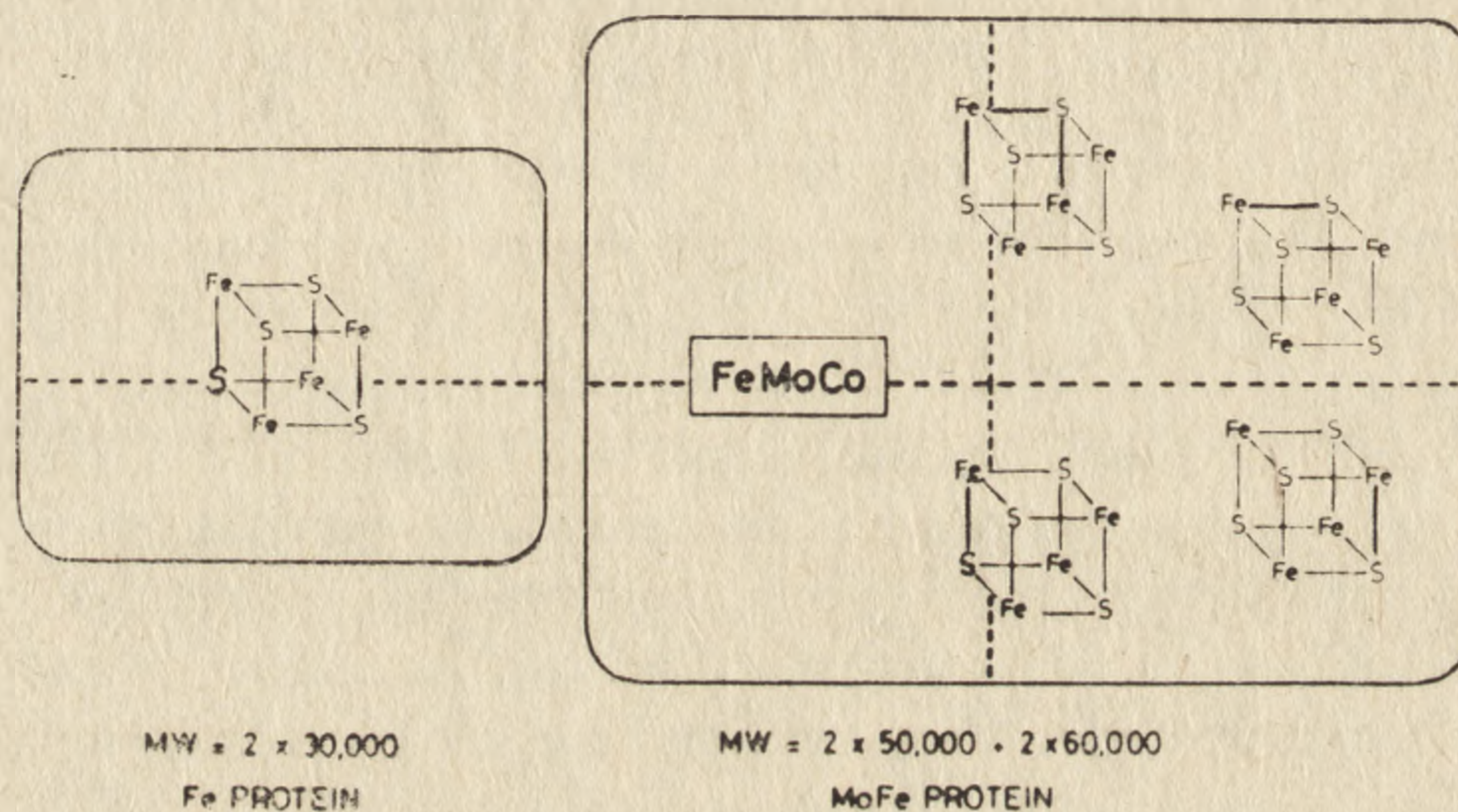


Fig. 5. The two protein components of nitrogenase. The Fe protein contains a 4Fe-4S cube. The MoFe protein presumably contains four 4Fe-4S cubes and one or two units (FeMoCo) containing a total of 2 Mo, about 16 Fe and 16 S atoms. The structure of FeMoCo is presently unknown

years. The Fe protein contains a cubic Fe_4S_4 cluster. In the MoFe protein, about half the iron content (16 atoms) is organized into Fe_4S_4 centers, and most if not all the remaining iron is associated with molybdenum (2 atoms) in one or two units, the Fe-Mo cofactor, which can be dissociated from the protein and studied separately (Fig. 5) [5].

MoFe proteins have molecular weights of 200 000 - 240 000 and $\alpha_2\beta_2$ quaternary structures (α and $\beta = 50\ 000 - 60\ 000$). Fe proteins have molecular weights of 55 000 - 70 000 and γ_2 quaternary structures.

In photosynthetic bacteria a third protein component, which is membrane bound, is involved in the functioning of nitrogenase. It is released from chromatophores in the presence of 0.5 M NaCl. It specifically activates the Fe protein in a process that requires ATP and Mn^{2+} [25, 35]. In vivo, the activation — deactivation of the Fe protein seems to be related to the nitrogen nutrition of the cells [26, 46].

The turnover number of nitrogenase (50 mol/min per mol of Mo in the nitrogenase) [7] is quite low. To compensate, N_2 fixers synthesize numerous copies of the enzyme. In *R. capsulata*, nitrogenase may represent

up to 20% of the soluble cell protein (depending upon growth conditions) (unpubl. results). Much recent progress in the genetics of the regulation and expression of the *nif* gene has been made (reviewed by Brill [5]).

SUBSTRATES REDUCIBLE BY NITROGENASE

N₂ binds to the molybdenum of the MoFe protein. It is probably reduced while bound to Mo by a mechanism which is not yet known. The numerous iron atoms contained in the protein are used for stocking and transferring to Mo the six electrons necessary for the reduction of N₂ to NH₃.

In the absence of N₂, but when ATP and low potential electrons are available, nitrogenase mediates the reduction of protons. ATP is hydrolyzed and reducing power dissipated during H₂ evolution [33]. Unlike hydrogenase-mediated H₂ evolution, the nitrogenase-mediated H₂ evolution is essentially irreversible. In the absence of N₂ all the electrons are used to reduce protons and H₂ evolution is maximal.

In the presence of increasing amounts of N₂ in the gas phase, H₂ evolution is progressively inhibited but never totally. Even under very

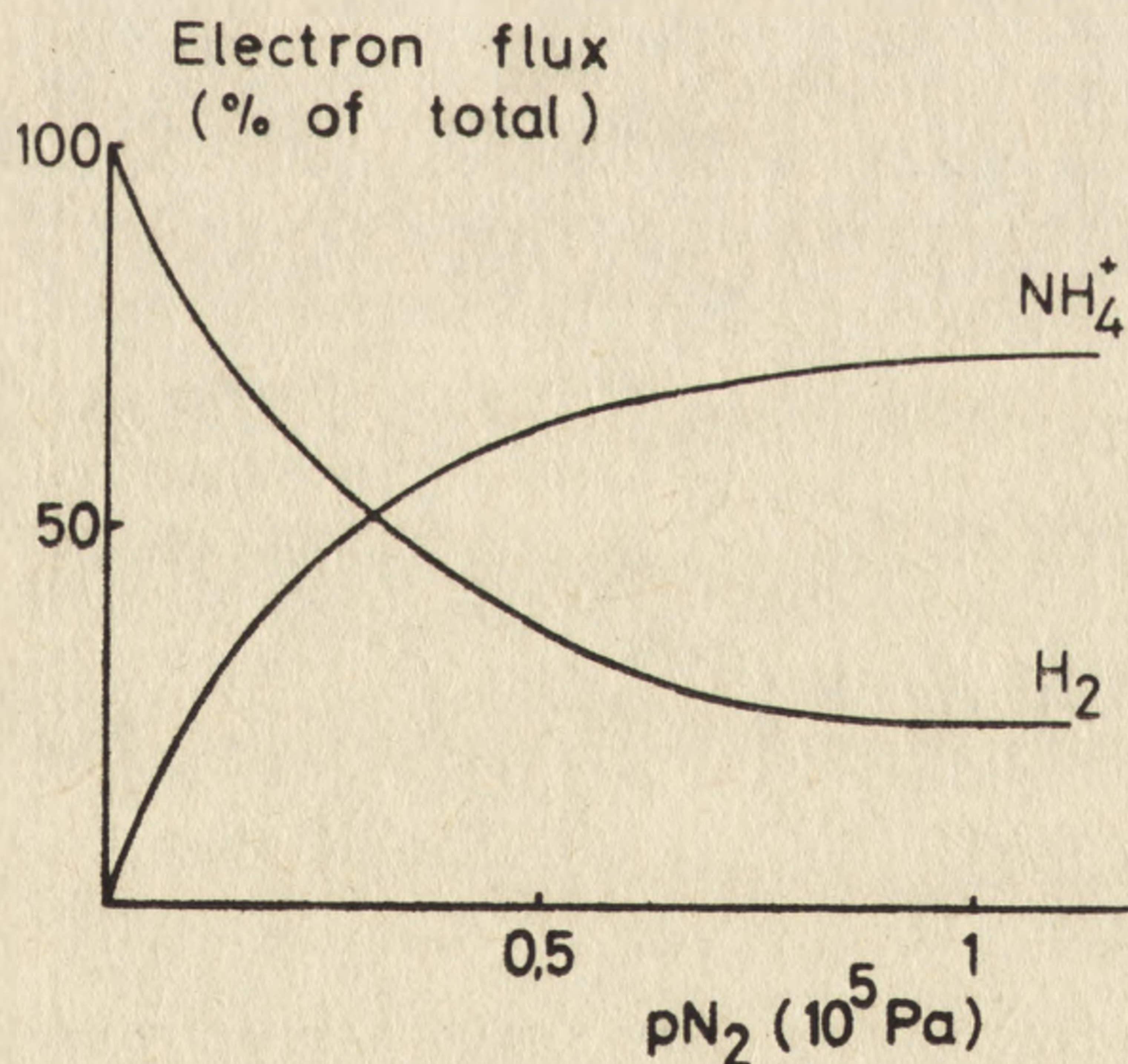


Fig. 6. The electron flux through nitrogenase as a function of the partial pressure of nitrogen. In the absence of nitrogen, nitrogenase reduces only protons (H₂ production is maximal). As the pressure of nitrogen is increased, NH₄⁺ production increases, but no more than 70 to 80% of the total electron flow are used for N₂ reduction

high N_2 pressures (up to $200 \cdot 10^5$ Pa) 25 to 30% of the electrons are evolved as H_2 , the remaining electrons are used to reduce N_2 to NH_4 [6]. The total flux of electrons through nitrogenase remains constant (Fig. 6).

In addition to nitrogen and protons nitrogenase can catalyse the reduction of a variety of other substrates, cleaving $N \equiv N$, $N = N$, $N = O$, $C \equiv N$ and $C \equiv C$ bonds [16]. The reduction of acetylene to ethylene [10] has led to a simple and quick assay for nitrogenase activity.

The ability of nitrogenase to reduce acetylene, cyanide or nitriles which were probably present in the primitive atmosphere (together with ammonia which represses nitrogenase synthesis) suggests that nitrogenase might not have evolved initially to reduce dinitrogen but rather to reduce these alternative substrates. Reduction of cyanide, for example, could have been a necessary detoxification mechanism [40].

Not all substrates are bound to nitrogenase at the same site; for example nitrogen and acetylene may occupy different sites. (This topic has been recently discussed extensively at a Conference on Molybdenum Chemistry held in Japan in 1979, see [34]). H_2 production by nitrogenase is inhibited by acetylene but not by carbon monoxide (Fig. 7) which inhibits all other nitrogenase reductions [40].

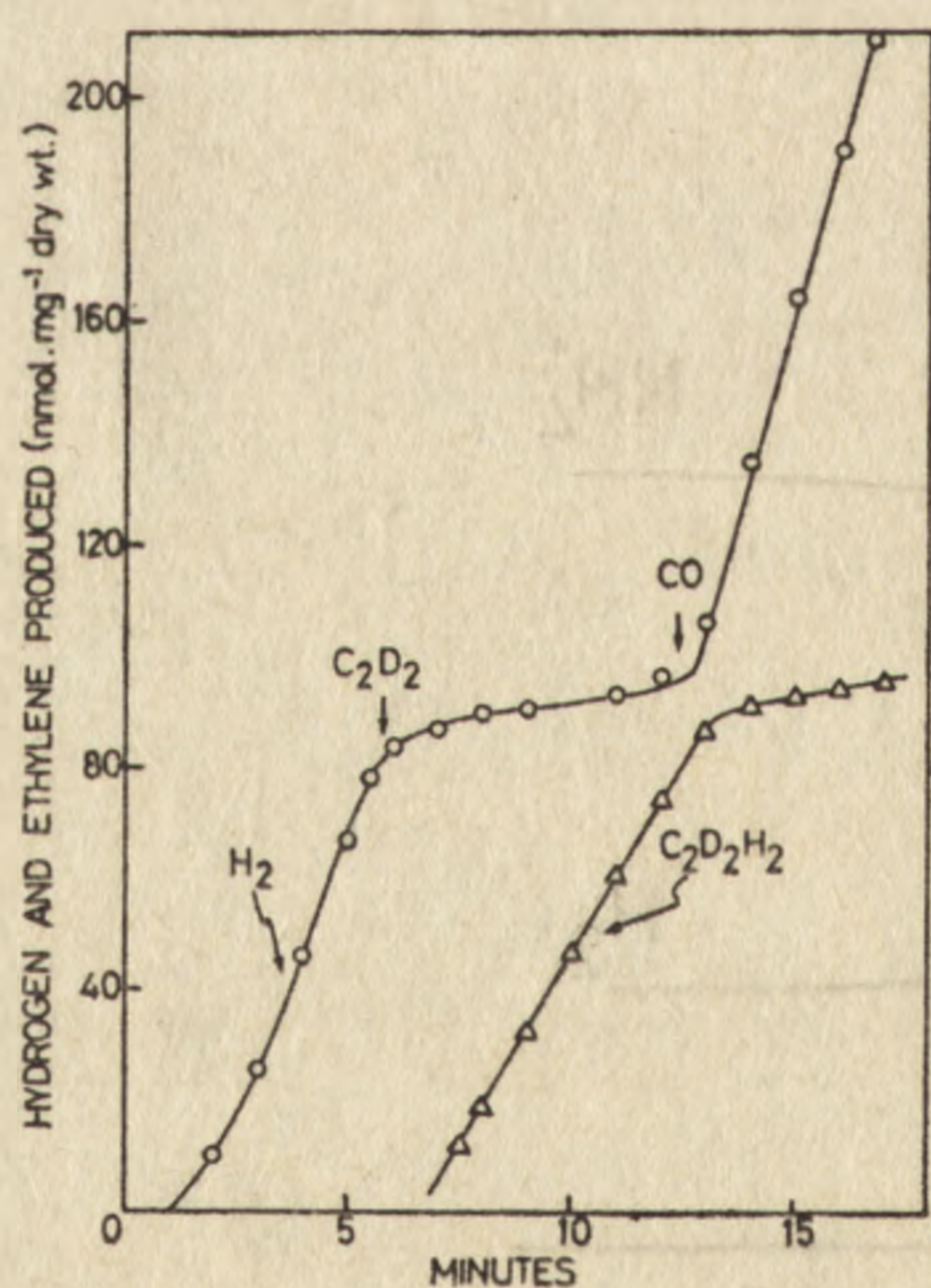


Fig. 7. Inhibition of nitrogenase-mediated H_2 production by acetylene in resting cells of *P. capsulata*

Restoration of H_2 photoproduction by carbon monoxide. Resting cells (12mg of bacterial dry weight in 12 ml), from a phototrophic culture of *R. capsulata* grown on lactate and glutamate, were incubated in the reaction vessel described in Jouanneau et al. [19]. Dissolved gases produced in the incubation medium diffused through a Teflon membrane attached at the bottom end of the vessel to a vacuum line. They were directed to a cold trap and then admitted into the ion source of a mass spectrometer where they were ionized and analyzed. Chloramphenicol (240 μ g) and 120 μ mol of lactate were added to the reaction medium. The suspension was sparged with argon in the dark. At time zero, the vessel was closed, the light was turned on, and H_2 formation was recorded (mass 2). At 5.75 min, 1 ml of C_2D_2 gas was introduced and left in contact with the suspension for 1 min. After 1 min, the partial pressure of dissolved acetylene reached 7300 Pa, and then bubble was removed and the $C_2D_2H_2$ formed (mass 30) was recorded. At 12.5 min, 0.5 ml of buffer saturated with carbon monoxide was injected (final partial pressure, 4200 Pa) (from [19])

FACTORS AFFECTING NITROGENASE ACTIVITY

The nitrogenase-mediated H_2 production is characterized by a) ATP-dependency; b) light dependency; c) oxygen sensitivity; d) inhibition by ammonia; e) insensitivity to CO. Some experiments illustrating these features are described hereafter.

Effect of O_2 . Purified nitrogenases are irreversibly inactivated by O_2 , the Fe proteins being the more sensitive to oxidative damage.

Oxygen exerts its deleterious effect by destroying, the Mo-Fe-S or Fe-S prosthetic groups of the enzyme; indeed, chemically synthesized analogues of these active sites are known to be irreversibly damaged by oxygen, with formation of iron sulfides or oxides [18]. In vivo, nitrogenases are protected from oxidative damage by several mechanisms [29]. One of these is respiration, which contributes to the decrease of intracellular oxygen concentration. Another protective mechanism is cellular compartmentation, nitrogenase being accommodated in cells or cell compartments that are not accessible to oxygen (e.g. heterocysts of some cyanobacteria). It has also been suggested that nitrogenase may be protected by conformational changes. In relation with the latter hypothesis, it should be noted that the cell-free nitrogenase complex from *Azobacter vinelandii* is inhibited reversibly by low oxygen levels, but not irreversibly inactivated [45].

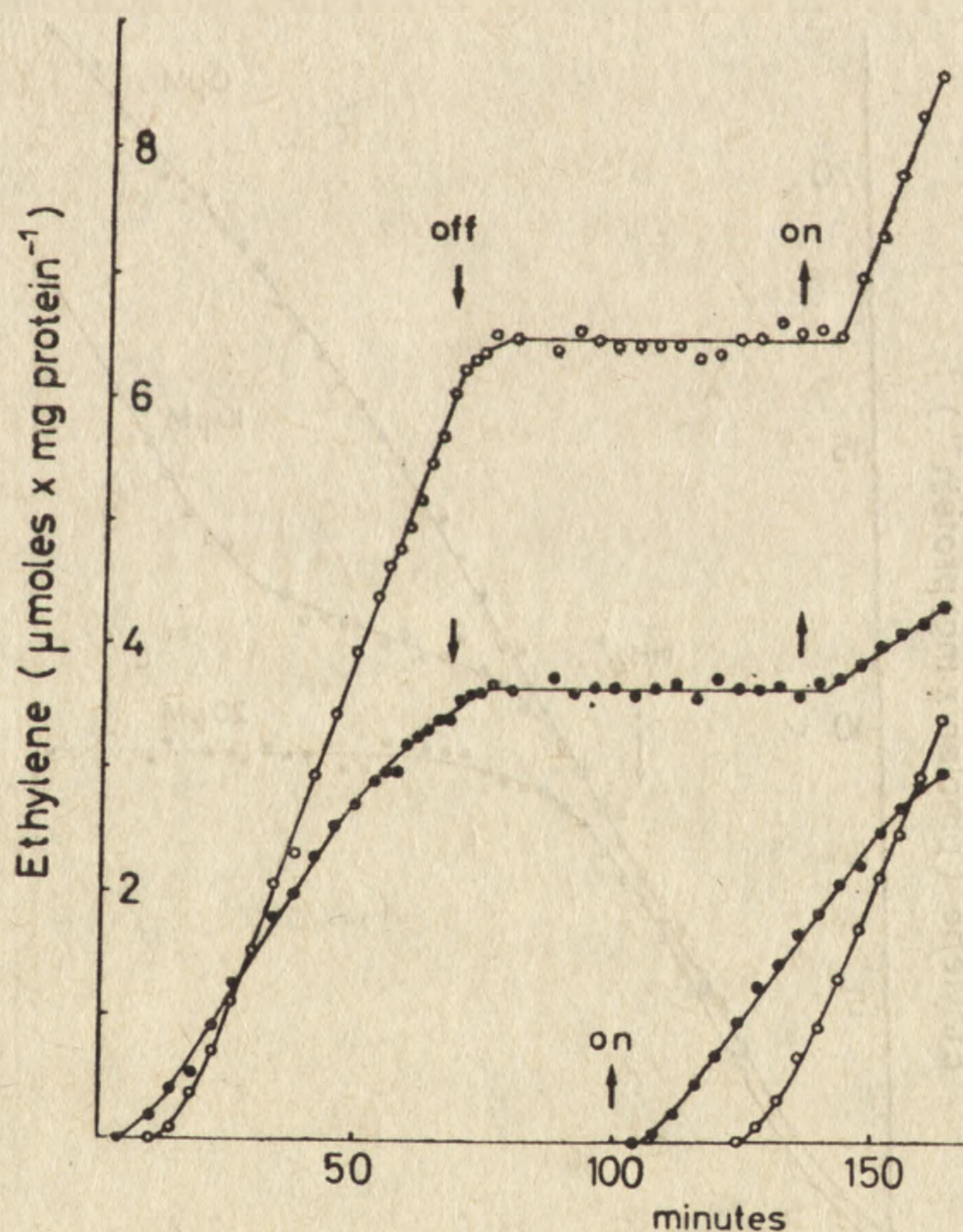


Fig. 8. Effect of light and darkness on acetylene reduction by whole cells of *R. capsulata* (strain B10)

Resting cells from a culture grown anaerobically in the light were incubated in stoppered 12 ml flasks gassed with argon and shaken in a photosynthetic Warburg bath (c.a 5,000 lux, 30°C). Reaction mixtures (2ml) consisted of 0.84 mg of bacterial protein suspended in mineral salt medium [44] 40μg chloramphenicol and 20μmol lactate. The reaction was started by injecting 1 ml of acetylene. Two flasks were illuminated at time zero; two others were maintained in the dark and illuminated after 100 minutes. Gas phase: (○) Argon (●) Argon + 10% O₂, ↑ light on ↓ light off (from [29])

Effect of light. Although nitrogen fixation is not strictly light dependent in purple nonsulfur bacteria, the activity of nitrogenase is hardly detectable in the dark. Appropriate concentrations of O_2 have to be used in the dark so that enough ATP is synthesized by oxidative phosphorylation without inactivation of nitrogenase by oxygen [20, 27, 41]. Fig. 8 shows clearly that the reduction of acetylene to ethylene, catalyzed by nitrogenase was very active when resting cells of *R. capsulata* were illuminated but stopped immediately when the lights were extinguished [30].

Effect of ammonia. Ammonia has been reported to inhibit nitrogenase activity in photosynthetic bacteria (cf. [29] for review). The inhibition is apparently released when all the added ammonia has been assimilated. Hillmer and Gest [17] have shown that 0.1 - 0.5 mM NH_4^+ inhibits photoproduction of hydrogen in whole cells of *R. capsulata*. By

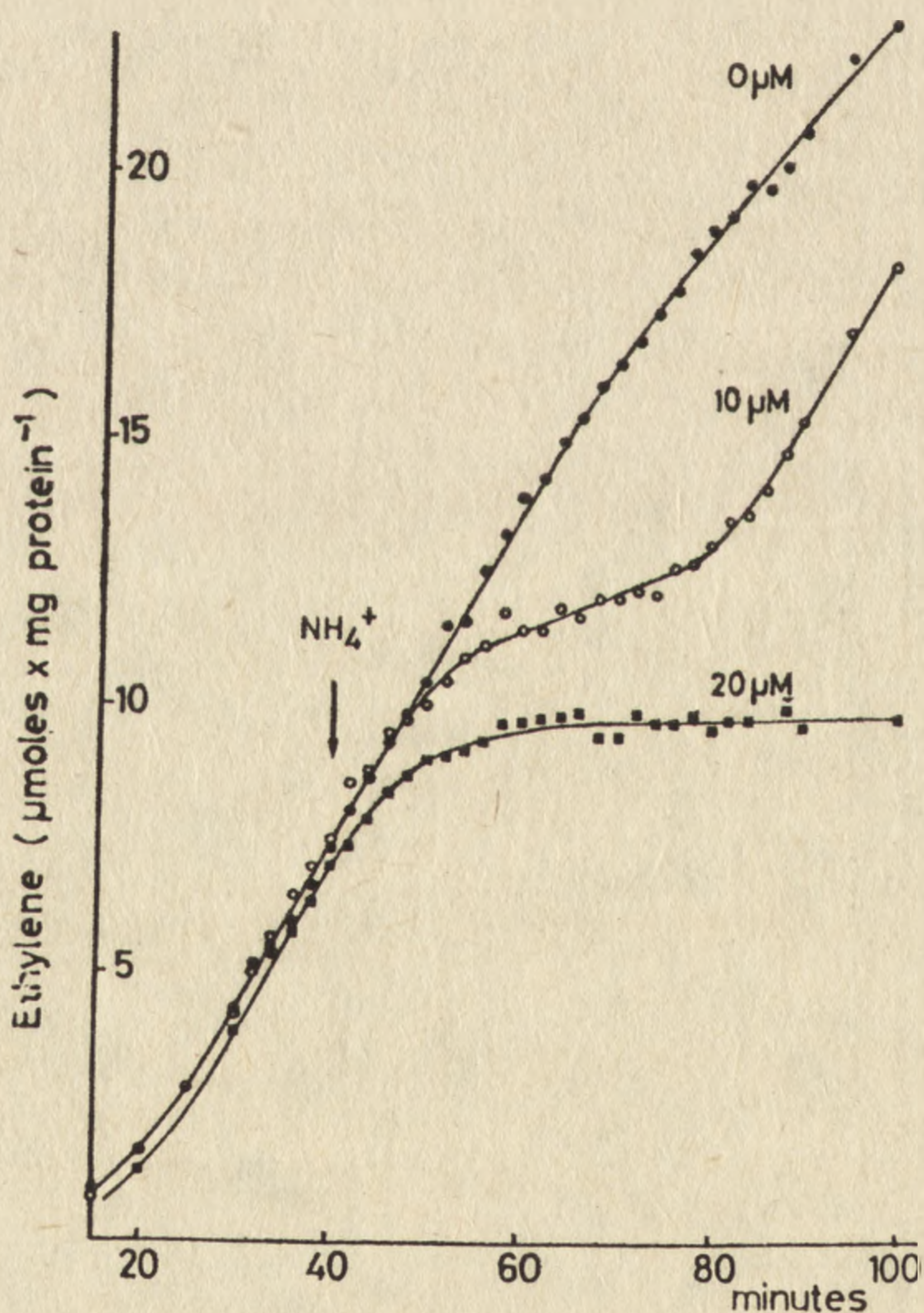


Fig. 9. Inhibition of acetylene reduction by ammonia in whole cells of *R. capsulata* (strain B10) Resting cells from a culture grown anaerobically in the light were incubated as described in Fig. 8. The cell concentration was 0.33 mg protein/ml. The reaction was started by injecting 0.8 ml of acetylene. Ammonia (as $(NH_4)_2SO_4$) was added as indicated by the arrow at the following final concentrations: \circ = control, \bullet = 10 μM , \blacksquare = 20 μM (from [29])

using dilute suspensions of this bacterium, thus increasing the time necessary for exhaustion of NH₄⁺ from the medium, Meyer et al. [29] have found that ammonia concentrations as low as 10 μM are sufficient to inhibit nitrogenase activity (acetylene reduction *in vivo* (Fig.9); the rate of acetylene reduction is 60% inhibited by 10 μM ammonia and totally inhibited by 20 μM ammonia. Zumft and Castillo [47] have also reported a similar short term regulation of nitrogenase activity in *Rhodospseudomonas palustris*. This rapid "switch on" — "switch off" effect of ammonia on nitrogenase activity reveals the occurrence of fine control mechanisms allowing the regulation of this energy-consuming reaction. Such control mechanisms may eventually have to be by-passed if the nitrogenase complex is to be used for continuous production of H₂ in a bioreactor.

THE H₂-UPTAKE HYDROGENASE

Photosynthetic bacteria are known to consume hydrogen and use it as sole electron donor during photoautotrophic growth [39]; among purple nonsulfur bacteria, the *R. capsulata* strains were found to be the fastest growing under these conditions [22].

In photosynthetic bacteria the hydrogenases, catalysing hydrogen uptake, are membrane-bound. They have been isolated from *Chromatium* [13, 21] *Rhodospirillum rubrum* [1] *Thiocapsa roseopersicina* [14] and *R. capsulata* [8]. As isolated the hydrogenase from *R. capsulata* is cold labile and unstable; it is stabilized by the presence of H₂ [8].

The biosynthesis of hydrogenase is not strictly coupled to the biosynthesis of nitrogenase since the former is present in cells that do not contain the latter (e.g. dark grown cells or cells grown in the presence of NH₄⁺). The highest hydrogenase activities are found in cells grown in the presence of H₂, either supplied exogenously or evolved *in situ* by nitrogenase. However, it is not yet established whether H₂ produced by nitrogenase induces hydrogenase synthesis or whether it reactivates a partially inactive constitutive enzyme [9].

The functioning of hydrogenase as an uptake hydrogenase enables the cell to use H₂ as electron donor and to recycle H₂ evolved by nitrogenase. The final physiological electron acceptors can be dinitrogen (through nitrogenase), CO₂ or O₂.

STIMULATION OF NITROGENASE ACTIVITY BY H₂

The experiment depicted in Fig. 10 demonstrates that the nitrogenase reaction, measured by the reduction of acetylene can be markedly stimulated (more than two-fold) by addition of hydrogen. Relatively low

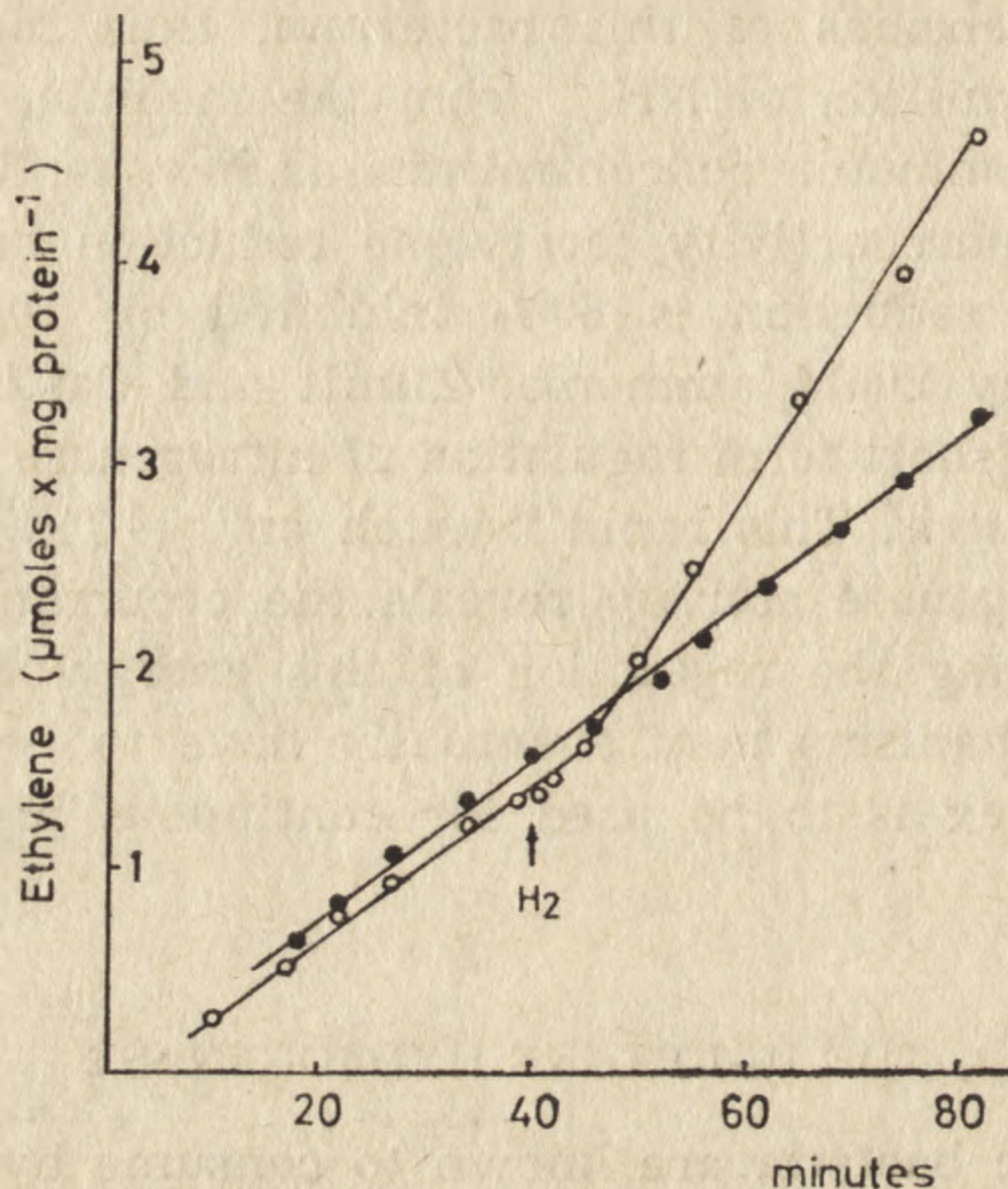


Fig. 10. Stimulation of acetylene reduction by hydrogen in resting cells of *R. capsulata* (strain B10) Resting cells from a culture grown anaerobically in the light were incubated as described in Fig. 8. The cell concentration was 0.8 mg protein/ml. The cells were depleted of endogenous substrates by preincubation in the light (4 hours); the flasks were then gassed with argon and the reaction was started by injecting 1 ml of acetylene. (●) control, (○) 1 ml hydrogen was injected after 40 min (from [29])

levels of hydrogen are effective; the K_M of this reaction for hydrogen is about 1,400 Pa (11 μ M) (unpublished results).

H₂ OXIDATION: O₂ SCAVENGING AND COUPLED PHOSPHORYLATION

In the presence of oxygen, H₂ is very rapidly oxidized. Meyer et al. [29] have observed an increased hydrogen consumption by resting cells of *R. capsulata* in the presence of oxygen (in the dark or in the light); the K_M of this reaction was approximately 15 μ M O₂. This oxy-hydrogen reaction is probably used by the cell to maintain an anaerobic micro-environment for nitrogenase. Due to the presence of a very active respiration, *R. capsulata* can carry out nitrogen fixation even under an atmosphere containing up to 30% oxygen [29, 31] although, once isolated, the nitrogenase complex is inactivated by trace amounts of air.

Oxidation of H₂ does not result from direct interaction between hydrogenase and oxygen; instead hydrogenase transfers electrons from H₂ to the electron transport chain which, as shown on Fig. 1, can function as respiratory chain in the presence of oxygen. In this way energy can be recovered in the form of ATP since oxidation of H₂ is coupled to phosphorylation [23, 36].

Table 4 shows that the P/O ratio obtained with H₂ is in the same

TABLE 4

| Substrate (x) | Oxidation rate (O) μatom O ₂ · h ⁻¹ · mg protein ⁻¹ | Phosphorylation rate (P) μmol ATP · h ⁻¹ · mg protein ⁻¹ P/O |
|------------------------|--|---|
| Aerobiosis in the dark | | |
| H ₂ | 2.5 | 1.02 |
| NADH | 4.3 | 2.25 |
| Succinate | 2.1 | 0.41 |
| Anaerobiosis | | |
| Light | — | 11.4 |
| (~ 5000 lux) | — | 1.1 |

O₂ consumption was measured amperometrically at 25°C in the dark with a Clark-type oxygen electrode polarised at - 0.8 V. The chamber was filled with 1.6 ml 2.7 mM MgCl₂, 33 mM Tricine-NaOH buffer (pH 7.5). For NADH or succinate oxidase assays chromatophores (1-1.5 mg protein corresponding to 50-57 μg bacteriochlorophyll) were introduced through the rubber stopper closing the chamber and the reaction was started by injection of the substrate. For hydrogen oxidase assays, the chamber was filled with a mixture of air-saturated and H₂-saturated buffer (0.4 ml and 1.2 ml resp.) and the reaction initiated by chromatophores.

To measure the phosphorylation coupled to respiration the medium used in oxygraphic experiments was supplemented with 30 mM glucose and 1.6 units hexokinase/ml. Incubation was carried out in the oxygraphic chamber. Chromatophores and substrates were added first as described for O₂ consumption followed by 30 μl of a mixture of 0.2 M ADP/0.4 M P_i/³²P_i (1:1:1 by vol). All measurements were made for periods of time during which both the O₂ uptake and APT synthesis were linear. The incubation was ended by adding 0.1 ml 2.5 N perchloric acid. After centrifugation unreacted ³²P_i was extracted as phosphomolybdate complex by isobutanol benzene and glucose-6-(³²P) phosphate remaining in the aqueous phase was counted in a scintillation counter.

(x) : 0,5 mM H₂, 1.4 mM NADH and 14 mM succinate were used.

(from [37]).

range as with NADH. The ratios are low because of the presence of two terminal oxidases, one of which diverts electrons through a non phosphorylating pathway (cf. Fig. 1). However, the rate of photophosphorylation (Table 4) and therefore, in the presence of light, respiration plays probably only a limited role, if at all, in energy supply. The very rapid ATP synthesis by photophosphorylation may explain the apparent light-dependency of the nitrogenase reaction shown in Fig. 8.

LIGHT-DEPENDENT HYDROGEN UPTAKE FOR CO₂ PHOTOREDUCTION

The function of hydrogenase in hydrogen consumption was clearly demonstrated in cells of *R. capsulata* lacking nitrogenase [19]. Cells had been grown photoautotrophically on H₂ as electron donor to maximize hydrogenase activity [8] and in the presence of NH₄⁺ to repress the synthesis and activity of nitrogenase [17, 29]. The resting cell suspension was placed in a reaction vessel directly connected to a mass spectrometer. The cell suspension was sparged in the dark with argon to eliminate O₂ and H₂-saturated buffer was added 1 min before time zero. The changes in the concentration of CO₂ (mass 44) and H₂ (mass 2) were monitored continuously. It could be directly demonstrated that in the light there was a rapid and complete hydrogen uptake concomitant with CO₂ consumption [19].

COMMENTS ON THE POSSIBLE USE OF PHOTOSYNTHETIC
BACTERIA FOR INDUSTRIAL H₂ PRODUCTION

The main features of H₂ production by photosynthetic bacteria are summarized in Table 5. To increase H₂ production by bacterial cells it is necessary to identify where the limiting steps are. The limiting factors may be extrinsic (e.g. light intensity, electron donors) or intrinsic (e.g. competitive metabolic pathways, rate limiting steps). The intrinsic limiting factors are more difficult to deal with. It is necessary to clearly identify them and to know at what level and how the regulatory controls are exerted.

The methods used for increasing the hydrogen photoproduction capability in living cell systems include.

TABLE 5

Features of H₂ production by photosynthetic bacteria

- 1 — H₂ is produced by nitrogenase
The nitrogenase-mediated H₂ evolution is:
 - ATP-dependent (photophosphorylation)
 - Inhibited by O₂
 - Inhibited by NH₃, N₂
 - Insensitive to CO
 - Can occur under an atmosphere of 100% H₂
- 2 — Photosynthetic bacteria are unable to split water but can use simple organic or inorganic substrates to produce H₂ (no oxygen is evolved)
- 3 — Through the uptake hydrogenase H₂ can be an electron donor for
 - N₂ reduction
 - O₂ reduction (respiration)
 - CO₂ photoreduction
 The functioning of an uptake hydrogenase may, in some conditions, increase H₂ production instead of lowering it. (protection of nitrogenase activity).
- 4 — Genetic studies of N₂ fixation in *Rhodospseudomonas capsulata* and biochemical characterization of *nif* mutants are in progress.

THE SELECTION OF NATURALLY ADEPT STRAINS

Increases in hydrogen production may be obtained by strain selection. Desired characteristics might be: an increased content of nitrogenase, decreased uptake hydrogenase activity, and increased activity of accessory reactions; increased rates of photophosphorylation on a per chlorophyll basis (a decreased content of accessory pigments) and increased rates of ferredoxin reduction. In addition, it would be desirable to select for strains able to grow on specific substrates, available as either industrial or agricultural waste products. This would have the additional advantage of lessening the possibility of contamination by other species brought in with the substrate.

THE PROTECTION FROM INHIBITORS (O₂ AND NH₄⁺)

The necessity to use closed systems for the purpose of collecting H₂ evolved by the cells has the advantage of protecting the cultures from air. Consequently, no oxygen is present to inactivate nitrogenase. The uptake hydrogenase can rapidly transfer electrons from H₂ to the respiratory chain and then to O₂, thus scavenging remaining traces of O₂ and maintaining a strict anaerobic environment for the nitrogenase. The exclusion of air from the cultures presents the additional advantage of allowing the nitrogenase to work in the absence of dinitrogen. Thus, H₂ evolution would be optimal (H⁺ is the only substrate present), and no NH₄⁺, which is an inhibitor of nitrogenase, would accumulate.

THE STABILIZATION OF CELLS AND ENZYMES

Enzymes, such as hydrogenase or nitrogenase, either free or in living cells, are efficient catalysts, catalyzing specific reactions under mild conditions, in neutral aqueous solutions, at room temperature. However the instability of biological systems has impeded their industrial application.

The development of immobilization techniques applicable to living cells and enzymes has opened up new possibilities for the use of biological systems in chemical reactors (bioreactors). Cells and chromatophores of *R. capsulata* have been immobilized by entrapment in alginate gels [37, 38] in view of their use in fluidized bed bioreactors. After entrapment in alginate beads, cells of *R. capsulata* had 80% of the H₂ production capacity of that of free bacteria. However in these preliminary experiments, the stability of nitrogenase inside the entrapped cells was not greater than that in the free living bacteria.

GENETIC CONSIDERATIONS

Genetic analyses of the genes involved in N₂ fixation (*nif* genes) is a very active field of research (cf. [5]). Seventeen *nif* genes have been identified near the *his* operon on the chromosome of *Klebsiella pneumoniae*. They are organized into seven distinct operons transcribed in the same direction (toward the *his* genes). The regulation of *nif* expression is complex and not fully elucidated. The *nif* RLA operon is the regulatory operon; once that operon is expressed the other *nif* operons are turned on. Furthermore *nif* L codes for a protein that plays a role in O₂ regulation of nitrogenase synthesis. According to Brill [5] some strains that lack the *nif* L protein but contain the *nif* A protein are insensitive to repression by O₂ but are still sensitive to repression by ammonia. On the other hand the wild type, in the presence of NH₄⁺, does not syn-

thesize either regulatory protein. The locus between *nif* L and the promoter for the *nif* RLA operon at which NH_4^+ regulation occurs has been defined as *nif* R; it is not yet known if *nif* R codes for a protein [5].

Further genetic studies of these regulatory and other *nif* genes could lead to the making of new strains with derepressed nitrogenase, having much higher H_2 evolving capacities.

BIOENGINEERING ASPECTS

The studies concerning the photoproduction of H_2 by photosynthetic bacteria are mostly at the stage of basic research. The bioengineering aspects as studied by Benemann et al., [2] have not yet received much consideration. As pointed out by these latter authors and by the SERI scientists [44] some specific near-term options are available (e.g. use of photosynthetic bacteria to produce hydrogen while degrading low-nitrogen wastes). It would be advisable to undertake now R and D studies to evaluate the economics and the feasibility of such systems using solar energy for the production of hydrogen.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (PIRDES) and the E.E.C. Solar Energy Research and Development Program (grant ESF 538 - 78).

REFERENCES

- [1] ADAMS M. W. W., HALL, D. O., Properties of the solubilized membrane-bound hydrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, Arch. Biochem. Biophys., 195: 288 - 299, 1979.
- [2] BENEMANN J. R., MIYAMOTO K., HALLENBECK P. C., Bioengineering aspects of biophotolysis, Enzyme Microb. Technol., 2: 103 - 111, 1980.
- [3] BISHOP N. I., FRICK M., JONES L. W., Photohydrogen production in green algae: water serves as the primary substrate for hydrogen and oxygen production, [In] Biological Solar Energy Conversion (A. Mitsui, S. Miyachi, San Pietro and S. Tamura eds) pp. 3 - 22 Academic Press New York, San Francisco, London 1977.
- [4] BOTHE H., Hydrogen production by algae and bacteria, Experientia (in press), 1981.
- [5] BRILL W. J., Biochemical genetics of nitrogen fixation, Microbiological Reviews, 44: 449 - 467, 1980.
- [6] BULEN W. A., BURNS R. C., LECOMTE J. R., Nitrogen fixation: hydrosulfite as electron donor with cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 56: 979 - 986, 1965.

- [7] BURNS R. C., HARDY R. W. F., Nitrogen fixation in bacteria and higher plants, Springer Verlag, New York 1975.
- [8] COLBEAU A., CHABERT J., VIGNAIS P. M., Hydrogenase activity in *Rhodopseudomonas capsulata*. Atability and stabilization of the solubilized enzyme, [In] Hydrogenases: Their catalytic activity, structure and function, H. G. Schlegel and K. Schneider (eds) Goltze Verlag, Göttingen pp. 183 - 197, 1978.
- [9] COLBEAU A., KELLEY B. C., VIGNAIS P. M., Hydrogenase activity in *Rhodopseudomonas capsulata*. Relationship with nitrogenase activity, J. Bacteriol., **144**: 141 - 148, 1980.
- [10] DILWORTH M. J., Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*, Biochim. Biophys. Acta., **127**: 285 - 294, 1966.
- [11] GEST H., KAMEN M. D., Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*, Science, **109**: 558 - 559, 1949a.
- [12] Studies on the metabolisms of photosynthetic bacteria. IV. Photochemical production of molecular hydrogen by growing cultures of photosynthetic bacteria, J. Bacteriol., **58**: 239 - 245, 1949b.
- [13] GITLITZ P. H., KRASNA A. I., Structural and catalytic properties of hydrogenase from *Chromatium*, Biochemistry, **14**: 2561 - 2567, 1975.
- [14] GOGOTOV I. N., ZORIN N. A., SEREBRIAKOVA L. T., KONDRATIEVA E. N., The properties of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*, Biochim. Biophys. Acta., **523**: 335 - 343, 1978.
- [15] HALLENBECK P. C., BENEMANN J. R., Hydrogen from algae, [In] Photosynthesis in relation to model systems (J. Barber ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979.
- [16] HARDY R. W. F., BURNS R. C., PARSHALL G. W., The biochemistry of nitrogen fixation, Adv. Chem. Ser., **100**: 219 - 247, 1971.
- [17] HILLMER P., GEST H., H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: production and utilization of H₂ by resting cells, J. Bacteriol., **129**: 732 - 739, 1977.
- [18] HOLM R. H., Synthetic approaches to the active sites of iron-sulfur proteins, Acc. Chem. Res., **10**: 427 - 434, 1977.
- [19] JOUANNEAU Y., KELLEY B. C., BERLIER Y., LESPINAT P. A., VIGNAIS P. M., Continuous monitoring by mass spectrometry, of H₂ production and recycling in *Rhodopseudomonas capsulata*, J. Bacteriol., **143**: 628 - 636, 1980a.
- [20] JOUANNEAU Y., SIEFERT E., PFENNIG N., Microaerobic nitrogenase activity in *Thiocapsa* SP strain 5811, FEMS Microbiology Letters, **9**: 89 - 93, 1980b.
- [21] KAKUNO T., HIURA H., YAMASHITA Y., BARTSCH R. G., HORIO T., Complete stabilization of water-soluble hydrogenase from *R. rubrum* under air atmosphere with a high concentration of chloride ions, J. Biochem. (Tokyo), **84**: 1649 - 1652, 1978.
- [22] KLEMME J. H., Untersuchungen zur Photoautotrophie mit molekularem Wasserstoff bei neuisolierten achweelfreien Purpurbakterien, Arch. Mikrobiol., **64**: 29 - 42, 1968.
- [23] — Studies on the mechanism of NAD-photoreduction by chromatophores of the facultative phototroph *Rhodopseudomonas capsulata*, Z. Naturforschg., **24b**: 67 - 76, 1969.
- [24] La MONICA R. F., MARRS B. L., The branched respiratory system of photosynthetically grown *Rhodopseudomonas capsulata*, Biochim. Biophys. Acta., **423**: 431 - 439, 1976.

- [25] LUDDEN P. W., BURRIS R. H., Activating factor for the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*, *Science*, **194**: 424 - 426, 1976.
- [26] — Removal of an adenine-like molecule during activation of dinitrogenase reductase from *Rhodospirillum rubrum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 6201 - 6205, 1979.
- [27] MADIGAN M. T., WALL J. D., GEST H., Dark anaerobic dinitrogen fixation by a photosynthetic microorganism, *Science*, **204**: 1429 - 1430, 1979.
- [28] MARRS B., GEST H., Genetic mutations affecting the respiratory electron-transport system of the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*, *J. Bacteriol.*, **144**: 1045 - 1051, 1973.
- [29] MEYER J., KELLEY B. C., VIGNAIS P. M., Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in photosynthetic bacteria, *Biochimie*, **60**: 245 - 260, 1978a.
- [30] — Effect of light on nitrogenase function and synthesis in *Rhodopseudomonas capsulata*, *J. Bacteriol.*, **136**: 201 - 208, 1978b.
- [31] — Aerobic nitrogen fixation by *Rhodopseudomonas capsulata*, *FEBS-Lett.*, **85**: 224 - 228, 1978c.
- [32] MITSUI A., KUMAZAWA S., Hydrogen production by marine photosynthetic organisms as a potential energy resource, [In] *Biological Solar Energy Conversion*, A. Mitsui, S. Miyachi, A. San Pietro and S. Tamura eds, pp. 23 - 51 Academic Press, New York, San Francisco, London 1977.
- [33] MORTENSON L. E., Components of cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum* required for ATP-dependent H₂ evolution from dithionite and for N₂ fixation, *Biochim. Biophys. Acta*, **127**: 18 - 25, 1966.
- [34] NEWTON W. E., OTSUKA S., (eds) *Molybdenum Chemistry of Biological Significance*, Plenum Press, New York and London 1980.
- [35] NORDLUND S., ERIKSSON U., Nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. Relation between "switch-off" effect and the membrane component. Hydrogen production and acetylene reduction with different nitrogenase component ratios, *Biochim. Biophys. Acta*, **547**: 429 - 437, 1979.
- [36] PAUL F., COLBEAU A., VIGNAIS P. M., Phosphorylation coupled to H₂ oxidation by chromatophores from *Rhodopseudomonas capsulata*, *FEBS-Lett.*, **106**: 29 - 33, 1979.
- [37] PAUL F., VIGNAIS P. M., Photophosphorylation in bacterial chromatophores entrapped in alginate gel: improvement of the physical and biochemical properties of gel beads with barium as gel-inducing agent, *Enzyme Microb. Technol.*, **2**: 281 - 287, 1980.
- [38] — H₂ production by the photosynthetic bacteria, *Rhodopseudomonas capsulata* entrapped in alginate gels, [In] *Energy from Biomass*, ed. D. Nicolay, sous presse.
- [39] PFENNIG N., Photosynthetic bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, **21**: 285 - 324, 1967.
- [40] RIVERA-ORTIZ J. M., BURRIS R. H., Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase, *J. Bacteriol.*, **123**: 537 - 545, 1975.
- [41] SIEFERT E., PFENNIG N., Diazotrophic growth of *Rhodopseudomonas acidophila* and *Rhodopseudomonas capsulata* under microaerobic conditions in the dark, *Arch. Microb.*, **125**: 73 - 77, 1980.
- [42] SILVER W. S., POSTGATE J. R., Evolution of asymbiotic nitrogen fixation, *J. Theor. Biol.*, **40**: 1 - 10, 1973.
- [43] WEAVER P. F., WALL J. D., GEST H., Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*, *Arch. Microbiol.*, **117**: 53 - 60, 1975.

- [44] WEAVER P. F., LIEN S., SEIBERT M., Photobiological production of hydrogen, *Solar Energy*, **24**: 3 - 45, 1980.
- [45] WONG P. P., BURRIS R. H., Nature of oxygen inhibition of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **69**: 672 - 675, 1972.
- [46] YOCH D. C., CANTU M., Changes in the regulatory form of *Rhodospirillum rubrum* nitrogenase as influenced by nutritional and environmental factors, *J. Bacteriol.*, **142**: 899 - 907, 1980.
- [47] ZUMFT W. G., CASTILLO F., Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodopseudomonas palustris*, *Arch. Microbiol.*, **117**: 53 - 60, 1978.

Otrzymano: 26 stycznia 1981.

Przyjęto: 2 marca 1981.

Adres autorów: 38041 Grenoble Cédex, France.

FOTOBIOLOGICZNE WYTWARZANIE WODORU *

PHOTOBIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION

Wacław HENDRICH

Instytut Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego

Streszczenie. Fotobiologiczne wytwarzanie wodoru jest procesem, przebiegającym z udziałem aparatu fotosyntetycznego oraz enzymu, hydrogenazy. Omówiono właściwości hydrogenaz i nitrogenazy oraz donora elektronów dla tych enzymów, ferredoksyny. Przedstawiono proces wytwarzania wodoru przez układ chloroplasty roślin wyższych — hydrogenaza, jego mechanizm oraz wpływ różnych czynników na wydajność tego procesu. Przedyskutowano istotne różnice mechanizmu wytwarzania wodoru przez naświetlone glony, zielenice i sinice. W tych ostatnich proces jest katalizowany głównie przez nitrogenazę, zlokalizowaną w heterocystach.

Summary. In photobiological hydrogen production are engaged photosynthetic apparatus and enzyme, hydrogenase. The properties of hydrogenases and nitrogenase as well as of donor to these enzymes, ferredoxin are described. Photobiological hydrogen production by the system higher plant chloroplasts — hydrogenase is presented, including the mechanism of this process and influence of some factors on the yield of hydrogen production. The differences in hydrogen production by green and blue-green algae are considered. In blue-green algae hydrogen production is catalysed mainly by nitrogenase, localized in heterocysts.

Wykaz stosowanych skrótów

ATP — adenozynotrójfosforan

BSA — albumina surowicy wołu

CCCP — m-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu

DBMIB — 2,5-dwubromo-3-metylo-6-izopropilo-p-benzochinon

* Referat wygłoszony na Sympozjum „Biochemiczne podstawy wykorzystania energii słonecznej”, XVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Warszawa, 11 - 13 września 1980 r.

Praca niniejsza została wykonana w ramach realizacji Problemu Resortowego R 1.9.01.03.

- DCMU — 3(3,4-dwuchlorofenylo)-1,1-dwumetylomocznik
DCPIP — 2,6-dwuchlorofenoloindofenol
DSPD — dwusalicydenopropanodwuamina
FCCP — p-trójfluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu
Fd — ferredoksyna
HOQNO — N-tlenek 2n-heptylo-4-hydroksychinoliny
MV — metylo-wiologen
NAD⁺, NADH (NADP⁺, NADPH) — utleniona i zredukowana forma (fosforanu) dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego
PMS — metylosiarczan N-metylofenazoniowy
PS1 (2) — fotosyntetyczny zespół barwnikowy 1 (2)
TMPD — N-czterometylo-p-fenylene-dwuamina

WSTĘP

Badania nad fotobiologicznym wytwarzaniem wodoru mają dwa ważne aspekty: a) poznawczy, którego celem jest zbadanie procesów biochemicznych prowadzących do wydzielania wodoru, powiązań fotosyntezy i innych procesów metabolicznych uczestniczących w wydzielaniu wodoru, a także jego ewentualnej roli fizjologicznej; b) praktyczny, gdyż badania stabilności składników uczestniczących w wytwarzaniu wodoru i warunków maksymalnej wydajności tego procesu zmierzają do opracowania układów na skalę techniczną, które kosztem promieniowania słonecznego produkowałyby źródło energii — wodór.

O wadze praktycznego aspektu badań, wykraczającego poza zakres niniejszego opracowania, może świadczyć parę następujących danych: obecnie około 95% energii zużywanej przez ludzkość pochodzi ze spalania zgromadzonych w ziemi produktów fotosyntezy: węgla, ropy naftowej i gazu ziemnego; tylko pozostałe 5% energii dostarczają inne źródła (energia jądrowa, hydroelektryczna). Przy dużym i ciągle wzrastającym zapotrzebowaniu na energię grozi to szybkim wyczerpaniem zasobów naturalnych. W tej sytuacji ważnym problemem staje się poszukiwanie innych dróg wytwarzania źródeł energii. Jedną z rozpatrywanych alternatyw jest wykorzystanie aparatu fotosyntetycznego lub zbudowanego na jego wzór sztucznego układu produkującego wodór kosztem energii słonecznej. Dużymi zaletami takiego rozwiązania są: a) wykorzystanie nieograniczonego zapasu substratu — wody, b) wykorzystanie nieograniczonego źródła energii — promieniowania słonecznego, c) akumulacja energii w postaci gazowego wodoru, którego dalsze wykorzystanie może przebiegać z dużą wydajnością (łączenie z tlenem w ogniach paliwowych może dostarczać energię elektryczną z wydajnością do 80% bez obawy o skażenie środowiska.

Podobne zalety ma inny proponowany sposób przetwarzania energii słonecznej, za pomocą fotoogniw półprzewodnikowych [36].

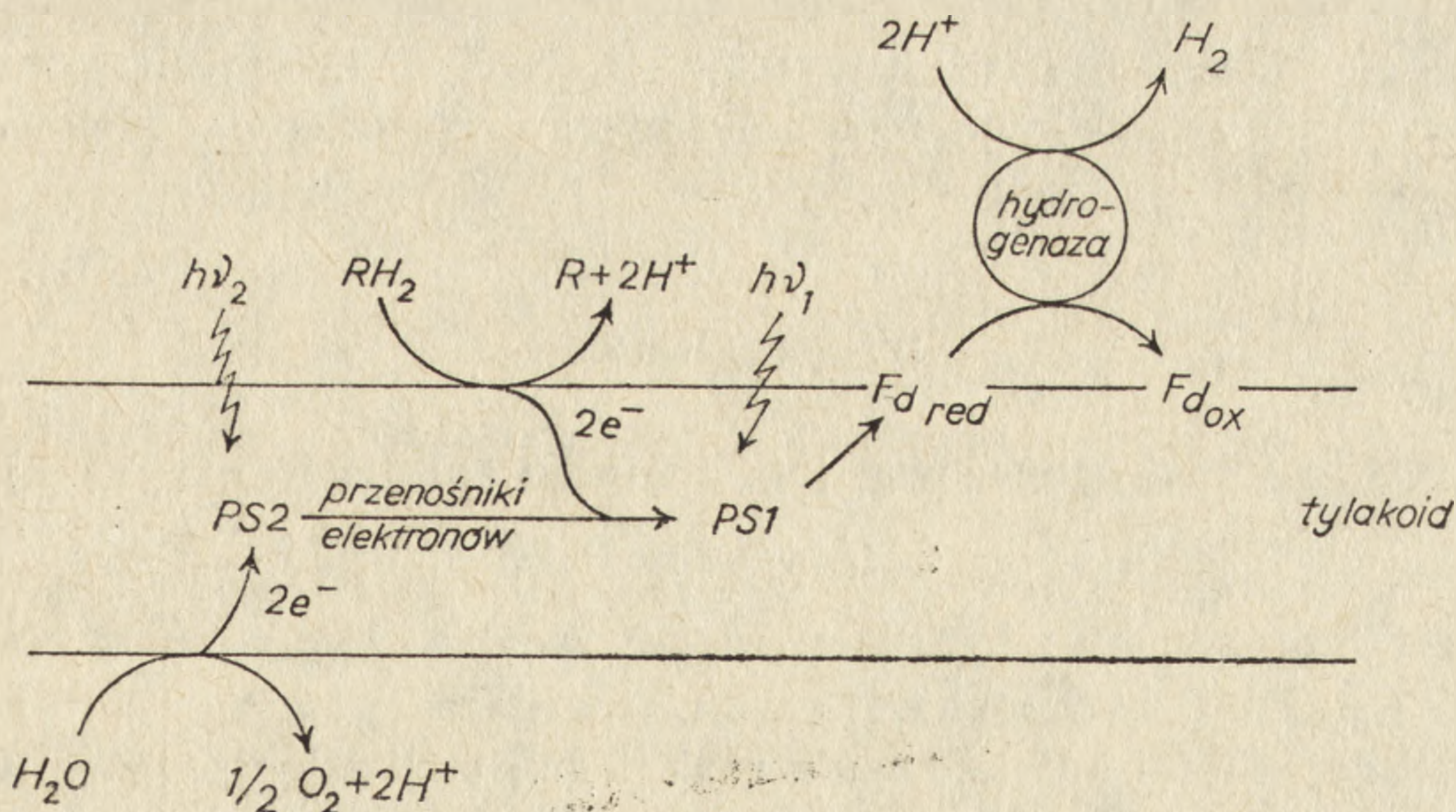
Fotobiologiczne wytwarzanie wodoru można porównać z procesem fotosyntezy. Bezpośrednie produkty fotosyntezy, węglowodany, tworzą się według sumarycznej reakcji:



Jeden einstein czerwonego promieniowania odpowiada energii około 40 kcal, w reakcji (1) magazynuje się więc energia 3 einsteinów. Ponieważ jednak w normalnych warunkach reakcja ta przebiega w aparacie fotosyntetycznym kosztem 8 - 12 einsteinów, wydajność procesu fotosyntezy wynosi około 25 - 40%.

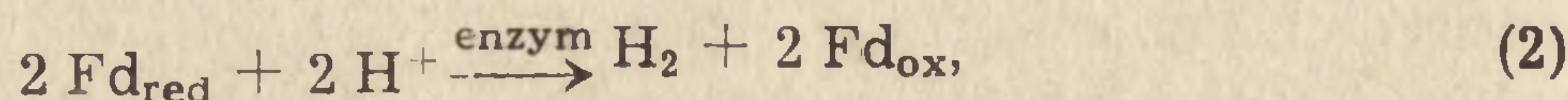
Proces fotosyntezy przebiega w dwóch etapach: w pierwszym, fotochemicznym, zlokalizowanym w błonach wewnętrzchloroplastowych, tylakoidach, uczestniczą dwa zespoły barwnikowe PS1 i PS2 oraz szereg przenośników elektronów. W etapie tym energia zaabsorbowanego promieniowania jest wykorzystana do fotolizy wody z wydzieleniem tlenu i zmagazynowana w formie ATP i czynnika redukującego, NADPH. Drugi, ciemny etap fotosyntezy przebiega w stromie i prowadzi do wiązania CO_2 z utworzeniem węglowodanów kosztem energii ATP i donora wodoru — NADPH.

Jedną z dróg biologicznego wytwarzania wodoru można rozpatrywać jako zagadnienie zatrzymania procesu fotosyntezy na etapie fotolizy wody (ryc. 1). Elektrony, oderwane od wody dzięki działaniu zespołu PS2 i enzymów rozkładających wodę, są przenoszone na kolejne składniki

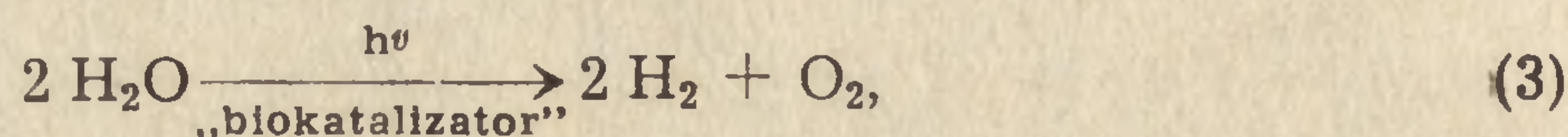


Ryc. 1. Schemat fotobiologicznego wytwarzania wodoru przez naświetlany układ chloroplasty—Fd—hydrogenaza. Rolę donora elektronów może pełnić woda lub egzo(endo)genny donor RH_2 (opracowane na podstawie [47])

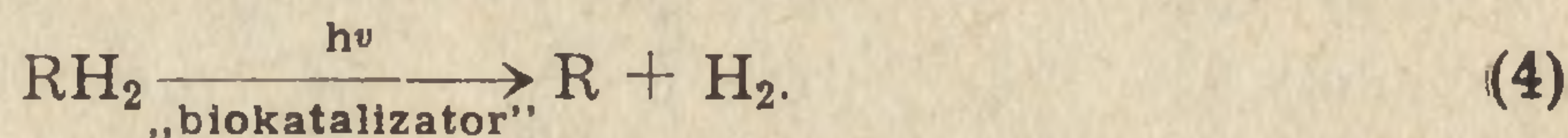
łańcucha transportu elektronowego, a następnie, dzięki działaniu zespołu PS1, na silny reduktor, ferredoksynę. Potencjał redoks Fd jest niższy od potencjału elektrody wodorowej; w obecności odpowiedniego enzymu jest więc możliwa reakcja



a cały proces można zapisać sumaryczną reakcją:



Z tego wynika, że rola zespołu barwnikowego PS2 w tym procesie polega na dostarczeniu energii potrzebnej do fotolizy wody i przeniesieniu elektronów od wody do przenośników, czynnych między zespołami PS2 i PS1. Jeśli do układu zostaną wprowadzone egzogenne donory elektronów lub dzięki innym procesom metabolicznym powstaną endogenne donory elektronów RH_2 , zdolne do redukcji tych przenośników, wtedy funkcję PS2 i fotolizę wody zastąpią te donory i reakcja wydzielania wodoru będzie przebiegała według sumarycznego równania

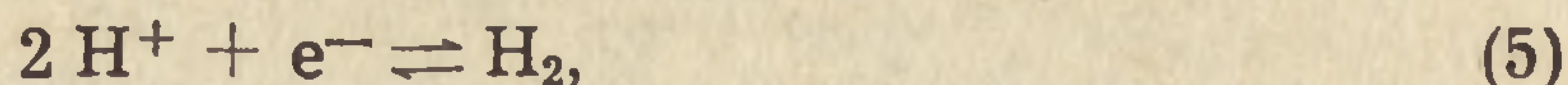


Przebieg reakcji (3) wymaga udziału składników aparatu fotosyntezy glonów lub roślin wyższych, a reakcji (4) — również innych składników, uczestniczących w metabolizmie komórkowym.

Według schematu (ryc. 1) w procesie fotobiologicznego wytwarzania wodoru kluczową rolę odgrywa enzym — hydrogenaza i przenośnik elektronów — ferredoksyna. W następnych częściach tego artykułu będą omówione właściwości tych białek, proces wytwarzania wodoru przez naświetlone chloroplasty roślin wyższych i glonów, jego mechanizm i powiązania z innymi szlakami metabolicznymi oraz układy modelowe wytwarzające wodór.

HYDROGENAZY

Aktywność hydrogenazową, tzn. zdolność katalizowania reakcji

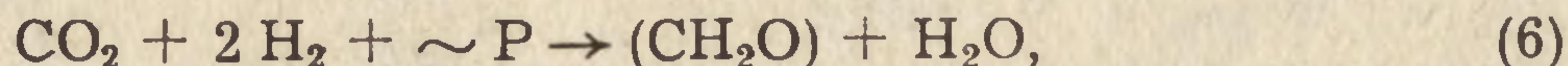


wykazują trzy enzymy: hydrogenaza odwracalna, hydrogenaza „pochłaniająca” („uptake” hydrogenase) oraz nitrogenaza.

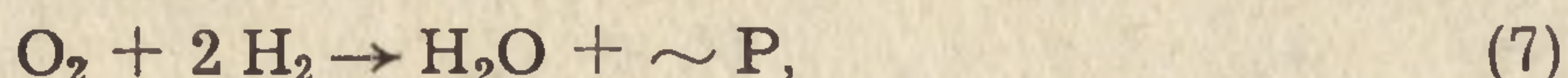
Dzięki zdolności katalizowania reakcji (5), udział hydrogenaz warunkuje przebieg reakcji (2), (3) i (4). Prócz tego hydrogenazy uczestniczą w następujących reakcjach metabolicznych, przebiegających w anaerobowo adaptowanych zielenicach [54]:

a) reakcja fotoredukcji CO_2 , wymagająca udziału ATP (dostarczanego

przez cykliczną fotofosforylację, a więc z udziałem zespołu PS1) i reduktora (Fd_{red} lub NADPH)

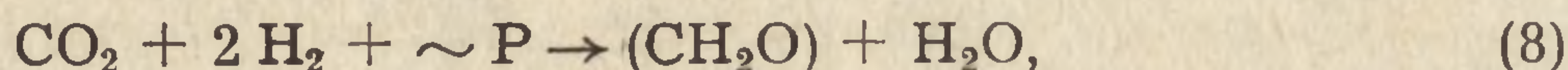


b) reakcja tleno-wodorowa, przebiegająca bez udziału światła

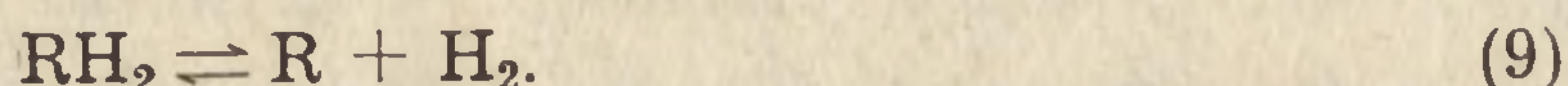


energia uwalniana w tej reakcji magazynuje się w formie wysokoenergetycznego wiązania fosforanowego,

c) ciemna reakcja wiązania węgla



d) ciemna reakcja wydzielania (lub pochłaniania) wodoru



Hydrogenazy występują w wielu bakteriach fermentacyjnych i fotosyntetyzujących, w niektórych bakteriach aerobowych oraz wielu sienicach. Można je też indukować w anaerobowo adaptowanych zielenicach. Proces ten wymaga prawdopodobnie energii: pełna aktywność enzymu pojawia się po 24 godz. anaerobiozy [62], ale dodatek węglowodanów skraca okres adaptacji [51].

Hydrogenazy bakteryjne są lepiej poznane od glonowych. Właściwości różnych hydrogenaz bakteryjnych podali w swej pracy Rao i Hall [47]. Masa cząsteczkowa enzymów mieści się w granicach od 50 kdal (dla hydrogenazy z *Desulphovibrio vulgaris*) do 205 kdal (dla hydrogenazy z *Alcaligenes eutrophus*). Enzymy te, podobnie do ferredoksyn, zawierają w centrum aktywnym niehemowe żelazo i labilną siarkę.

W komórkach bakteryjnych hydrogenazy występują zarówno w formie słabo związanej ze strukturami wewnątrzkomórkowymi, łatwo rozpuszczalnej (np. hydrogenaza z *Clostridium pasteurianum* [14] i z *Thiocapsa roseopersicina* [25]), jak i w formie silnie związanej z błonami wewnątrzkomórkowymi (np. hydrogenaza z *Desulphovibrio vulgaris* [66], *Chromatium* [24] i *Rhodospirillum rubrum* [1]). Enzymy związane z błoną należą do hydrogenaz „pochłaniających”, katalizujących reakcję (5) tylko w stronę lewą; nie są one zdolne do redukcji akceptorów elektronów o niskich potencjałach redoks. Stwierdzono jednak [1, 24], że po uwolnieniu z błony hydrogenazy „pochłaniające” przechodzą w enzymy o aktywności hydrogenaz odwracalnych, zdolnych również do katalizowania reakcji wydzielania wodoru.

Większość hydrogenaz cechuje duża wrażliwość na tlen. Do enzymów bardzo wrażliwych na działanie tlenu należy hydrogenaza z *Clostridium pasteurianum* [14]. Z tego względu wszystkie badania nad wydzielaniem wodoru przez naświetlony układ chloroplasty—hydrogenaza z *Clostridium* (lub inna, równie wrażliwa na tlen hydrogenaza) były prowadzone

w obecności glukozy i oksydazy glukozowej oraz etanolu i katalazy, celem wiązania tlenu wydzielanego przez zespół barwnikowy PS2 oraz nadtlenu wodoru. Mniejszą wrażliwość na tlen wykazują hydrogenazy z bakterii nefotosyntezujących *Desulphovibrio vulgaris* (z przestrzeni periplazmatycznej) oraz fotosyntezujących *Chromatium* [24], *Rhodospirillum rubrum* [1] oraz *Thiocapsa roseopersicina* [25]. Ostatnio scharakteryzowano hydrogenazy mało lub zupełnie niewrażliwe na działanie tlenu. Całkowitą odporność na tlen wykazuje hydrogenaza z bakterii nefotosyntezujących *Alcaligenes eutrophus* [49]. Rao i Hall [47] stwierdzili, że hydrogenaza ta dodana do chloroplastów i NADH lub zredukowanego MV jako donora elektronów daje układ zdolny do fotobiologicznego wytwarzania wodoru, mimo braku czynnika wiążącego tlen. Odporne na działanie tlenu hydrogenazy reagują jednak bardzo wolno z ferredoksyną. Większą szybkość wydzielania wodoru obserwuje się po wprowadzeniu sztucznego donora elektronów (np. MV + hydrosiarczyn) lub odpowiedniego przenośnika elektronów (np. cytochromu c_3) w przypadku hydrogenazy z *Desulphovibrio* [47].

Jak już wspomniano wcześniej, hydrogenazy występują również w glonach. W zielenicach występuje głównie hydrogenaza odwracalna. Jest to enzym konstytucyjny, aktywowany w czasie ciemnej anaerobiozy. O dużej wrażliwości na tlen świadczy to, że już przy stężeniu $0,8 \mu\text{l O}_2/\text{ml}$ następuje częściowa, a przy stężeniu $2,6 \mu\text{l O}_2/\text{ml}$ — całkowita inaktywacja enzymu [54]. Proces adaptacji może być hamowany dodatkiem hydrosiarczynu, siarczków, czynników chelatujących żelazo lub inhibitorów fosforylacji [28, 29, 45].

Pewne wyniki doświadczeń świadczą o tym, że prócz hydrogenazy odwracalnej zielenice zawierają również hydrogenazę „pochłaniającą”. Pod bardzo niskimi ciśnieniami wodoru ($\leq 0,01 \text{ atm}$) zaobserwowano pochłanianie wodoru, stwierdzono również różne czasy adaptacji dla aktywności w procesach wydzielania i pochłaniania wodoru związanych z reakcjami fotoredukcji (6) i tleno-wodorową (7). Obecność dwóch hydrogenaz wyjaśnia również wyniki doświadczeń Stuarta i Gaffrona [54], w których wydzielanie wodoru wydaje się równoważne jednoczesnym jego pochłanianiem.

Obydwa enzymy, hydrogenaza odwracalna i pochłaniająca, występują także w wielu sinicach. Odwracalna hydrogenaza jest enzymem łatwo rozpuszczalnym, obecnym w obydwóch typach komórek sinic, wegetatywnych i heterocystach [22, 59]. Sprzężenie tego enzymu z Fd jest mało wydajne. Enzym katalizuje redukcję PMS, błękitu metylenowego i DCPIP, ale nie przenosi wodoru na akceptory o niskich potencjałach redoks, NAD i NADP. Katalizuje wydzielanie wodoru ze zredukowanego MV [22].

Aktywność hydrogenazy pochłaniającej, występującej głównie w heterocystach, jest silnie związana z błoną; enzym wykazuje duże powinowactwo do wodoru [60]. Egzogenne akceptory elektronów o $E'_0 > 0$ V (np. błękit metylenowy, DCPIP, $K_3Fe(CN)_6$) stymulują pochłanianie wodoru przez preparaty komórek heterocystowych w ciemności [46]. Światło powoduje wzrost szybkości pochłaniania wodoru, co dowodzi udziału endogennych akceptorów. Metabolizm tych endogennych akceptorów nie jest znany; stwierdzono jedynie, że pochłanianie wodoru nie jest hamowane przez antagonistę Fd, DSPD [60], ale jest hamowane przez DBMIB i HOQNO.

NITROGENAZA

Nitrogenaza jest enzymem występującym we wszystkich organizmach zdolnych do wiązania azotu, a więc w niektórych bakteriach fotosyntezujących (z rodzajów *Chromatium*, *Rhodospirillum*, *Rhodomicrobium* i *Chlorobium*), niefotosyntezujących beztlenowcach (np. *Clostridium pasteurianum*, *Desulphovibrio desulphuricans*, *Methanobacterium*, *Achromobacter*), tlenowcach (np. z rodzajów *Azotobacter*, *Pseudomonas* i *Nocardia*), bakteriach żyjących w symbiozie z roślinami wyższymi (głównie z rodzaju *Rhizobium*) oraz w sinicach [15, 19, 31].

Nitrogenaza jest zbudowana z dwóch części, składnika I i II. Składnik I, o masie cząsteczkowej 220 kDa, zawiera 4 podjednostki — pojedyncze łańcuchy polipeptydowe oraz 24 atomy Fe i 2 atomy Mo. Składnik II ma masę cząsteczkową 55 kDa, 2 podjednostki polipeptydowe i 4 atomy Fe [12]. Atomy Mo, które są częścią składową centrum aktywnego enzymu wraz z kilkoma atomami Fe wiążą się nie bezpośrednio ze składnikiem I, lecz z małą cząsteczką kofaktora zasocjowanego z tym składnikiem. Dokładna struktura przestrzenna enzymu nie jest znana.

Nitrogenaza katalizuje redukcję H^+ , N_2 , C_2H_2 i innych substratów z potrójnym wiązaniem. Reakcja ta przebiega z udziałem reduktora i źródła energii, ATP. Stosunek ATP do przeniesionych elektronów, $ATP/2e^-$ zależy od pH, temperatury i stężeń substratów; w optymalnych warunkach zbliża się do 4, więc redukcja cząsteczki N_2 do dwóch cząsteczek NH_3 wymaga 12 - 24 cząsteczek ATP. Aktywnym reduktorem dla rozpuszczalnej nitrogenazy z *Anabaena cylindrica* jest zredukowana forma Fd [9, 30].

Podobnie, jak omówione poprzednio hydrogenazy, nitrogenaza jest inaktywowana działaniem tlenu [31]. Zachowanie jej aktywności w sinicach należy przypisać lokalizacji w heterocystach, powstających w szczególnym procesie różnicowania prokariotów. Za lokalizacją nitrogenazy

w heterocystach przemawia korelacja częstotliwości występowania tych komórek w różnych warunkach rozwoju z aktywnością nitrogenazy.

W porównaniu z normalnymi komórkami, heterocysty wykazują następujące szczególne cechy:

a) mają znacznie grubszą ścianę komórkową, utrudniającą dostęp tlenu do wnętrza komórki,

b) nie zawierają zespołu barwnikowego PS2 [65] lub zawierają ten zespół w formie mało aktywnej, jak sugerują Isaakidou i Papageorgiou [35] na podstawie występowania w heterocystach z *Nostoc muscorum* wysokopotencjałowej formy cytochromu b 560,

c) nie zawierają fikobilin [17, 50] i Mn [58] oraz nie wydzielają tlenu [11],

d) nie mają zdolności wiązania CO₂, [64],

e) mają czynny zespół PS1, zdolny do katalizowania cyklicznej fosforylacji,

f) wykazują wysoki poziom nitrogenazy.

FERREDOKSYNY

Ferredoksyny należą do dużej grupy białek, zwanych białkami Fe-S i występujących we wszystkich komórkach bakteryjnych i roślinnych [47]. Białka te charakteryzują się centrum aktywnym, w którym występuje niehemowe żelazo związane ze siarką cysteiny i siarką labilną. Ze względu na budowę centrum aktywnego, ferredoksyny uczestniczące w fotosyntezie można podzielić na:

a) 2(Fe-S) białka, zawierające w centrum aktywnym 2 atomy żelaza i dwa atomy siarki. Do tej grupy należą Fd chloroplastów roślin wyższych i glonów. Masy cząsteczkowe tych białek są równe 10 - 13 kDa. 2(Fe-S) białka uczestniczą w przemianach jednoelektronowych (np. reakcja 2) mają silnie ujemne formalne potencjały redoks w granicach od -425 do -350 mV [13].

b) 4(Fe-S) białka. Są to tzw. ferredoksyny bakteryjne; ich centrum aktywne jest zbudowane z 4 lub 8 atomów żelaza i siarki labilnej. Masa cząsteczkowa Fd bakteryjnych jest zawarta w granicach 6 - 10 kDa, a potencjały redoks w granicach od -490 do -300 mV.

Tagawa i Arnon [56] wykazali, że Fd roślinne i bakteryjne (na przykładzie Fd szpinaku i *C. pasteurianum*) mogą wzajemnie zastępować się w procesach: a) ciemnej redukcji nukleotydów pirydynowych przez chloroplasty w obecności H₂ jako donora elektronów i hydrogenazy z *C. pasteurianum*, b) fotowytwarzania wodoru przez układ chloroplasty—hydrogenaza z donorem, hydrosiarczynem. Rao i Hall [47] podają jednak,

że tylko hydrogenaza z *C. pasteurianum* jest „uniwersalna” i może efektywnie współdziałać z różnymi ferredoksynami. Inne hydrogenazy są bardziej specyficzne; z „niewłaściwymi” Fd dają mało aktywne układy.

WYTWARZANIE WODORU PRZEZ NAŚWIETLANE CHLOROPLASTY ROŚLIN WYŻSZYCH

Pierwsze doświadczenia nad wytwarzaniem wodoru przez naświetlane chloroplasty roślin wyższych przeprowadzili Arnon i wsp. [3]. Badali oni układ zawierający chloroplasty szpinaku, DCMU blokujący zespół PS2 i wydzielanie tlenu, cysteinę — donor elektronów, DCPIP i metylo- lub benzylo-wiologen jako przenośniki elektronów oraz hydrogenazę z *Chromatium*. Naświetlanie tego układu prowadziło, dzięki niecyklicznej fotofosforylacji, do syntezy ATP i wytwarzania wodoru.

Podobne wytwarzanie wodoru zaobserwowano również dla układu składającego się z chloroplastów szpinaku inaktywowanych częściowo ogrzaniem przez 5 min do 55°C, askorbinianu i DCPIP oraz surowego preparatu hydrogenazy z *Clostridium pasteurianum*, zawierającego prawdopodobnie Fd, dzięki czemu układ nie wymagał dodatku przenośnika elektronów, Mv.

Dalsze badania nad wytwarzaniem wodoru przez naświetlany układ chloroplasty—hydrogenaza zmierzały do znalezienia możliwie najbardziej aktywnych donorów i przenośników elektronów, a także do poprawienia wydajności układu (szybkości wytwarzania wodoru i czasu pracy układu). Zagadnienie poprawienia wydajności układu wiąże się z zahamowaniem autoutlenienia Fd i inaktywowania hydrogenazy, a także z przedłużeniem okresu stabilności zespołu PS2.

Rolę donorów elektronu może pełnić szereg związków. Benemann i wsp. [7] stwierdzili, że naświetlanie układu zawierającego tylko chloroplasty, Fd i hydrogenazę z *Clostridium kluyveri* prowadzi do krótkotrwałego wydzielania wodoru, co dowodzi, że rolę donora może pełnić woda, a reakcja wytwarzania wodoru przebiega według równania (3). Wniosek ten potwierdziły badania Rao i wsp. [48]: dodanie inhibitorów zespołu (DCMU, DBMIB) lub ogrzanie chloroplastów do 55°C przez 5 min blokuje wydzielanie wodoru, ale dodanie donora elektronów dla PS1, askorbinianu i DCPIP reaktywuje układ. Wydajność i trwałość takiego układu jest stosunkowo mała, dostarcza on średnio 10 μ moli H₂/mg chl. godz. przez 3 godziny.

Celem wyeliminowania dezaktywującego działania O₂ na hydrogenazę, Krampitz [41] rozdzielił fotochemiczną fazę reakcji, przebiegającą z udziałem chloroplastów, od ciemnej fazy wydzielania wodoru, katalizowanej przez hydrogenazę. W pierwszym szklanym naczyniu naświetla-

nie mieszaniny chloroplastów ze szpinaku oraz NADP^+ prowadziło do redukcji dwunukleotydu. Utworzony NADPH dializowano i przepompowywano do drugiego naczynia, zawierającego hydrogenazę *C. kluyveri*. Po utlenieniu NADPH i wydzieleniu wodoru NADP^+ był ponownie przepompowywany do pierwszego naczynia. Wydajność tego dwustopniowego procesu była jednak niska z powodu nietrwałości przenośnika elektronów $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ i niestabilności zespołu PS2.

Wpływ niestabilności zespołu PS2 można wyeliminować, stosując sztuczne donory elektronów dla zespołu PS1: funkcję tę pełnią, prócz wymienionych poprzednio, cysteiny oraz pary askorbinian — DCPIP, dwutiotreitol [4] oraz NADP^+ (z pośrednikiem, metyłowiologenem) [43]. Znaczną szybkość wydzielania wodoru ($125 \mu\text{moli H}_2/\text{mg chl}^{-1} \cdot \text{godz.}^{-1}$) uzyskali Hoffmann i wsp. [34], naświetlając w warunkach anaerobowych zamknięte pęcherzyki tylakoidów (chloroplasty typu C) ze szpinaku w obecności hydrogenazy z *Clostridium*, askorbinianu i TMPD jako donora elektronów oraz MV jako przenośnika.

Dokładne badania optymalnych warunków wydzielania wodoru przez naświetlany układ chloroplasty roślin wyższych—hydrogenaza przeprowadzili i porównali z wcześniejszymi wynikami Rao i Hall [47]. Autorzy ci stwierdzili, że chloroplasty izolowane z różnych roślin wykazują podobną wydajność wydzielania wodoru. Zaobserwowano natomiast znaczne różnice stabilności chloroplastów: organelle te, izolowane w *Chenopodium quinca* w medium sorbitol-HEPES i przechowywane w ciemności w 4°C , są 9-krotnie stabilniejsze od chloroplastów szpinaku, izolowanych i przechowywanych w identycznych warunkach (jako kryterium stabilności przyjęto zdolność redukcji żelazicyjanku), a 3-krotnie stabilniejsze w warunkach ciągłego naświetlenia.

Według Hoffmanna i wsp. [34] chloroplasty fragmentowane działaniem ultradźwięków lub 0,4% digitoniny zachowują 30 - 40% aktywności wydzielania wodoru (za pośrednictwem anaerobowej redukcji MV) w porównaniu z chloroplastami typu C. Chloroplasty poddane działaniu 1% digitoniny tracą zdolność wydzielania wodoru. Natomiast nie zaobserwowano istotnych różnic aktywności między chloroplastami typu C i B.

Rao i Hall [47] opisują wyniki badań stechiometrii wydzielania wodoru. Naświetlenie chloroplastów rozsprężonych (z 5 mM NH_4Cl) prowadzi do wydzielania wodoru z szybkością 30 - 50 $\mu\text{moli H}_2/\text{mg chl. godz.}$ oraz do wydzielania tlenu z szybkością 200 - 400 $\mu\text{moli O}_2/\text{mg chl. godz.}$ (pomiar elektrodą tlenową). Wynika stąd, że tylko 10 - 20% całkowitego transportu elektronowego jest sprzężone z wydzielaniem wodoru. Za ten niski stopień sprzężenia odpowiedzialna jest głównie ferredoksyna: z jednej strony zredukowana forma Fd w pewnych warunkach może reagować szybciej z tlenem jak z hydrogenazą. Z drugiej strony, według

badań Kinga i wsp. [40], Fd znacznie efektywniej przekazuje elektrony do NADP^+ jak do protonów: K_m dla ciemnego wydzielania wodoru z hydrosiarczynem sodu i udziałem hydrogenazy z *Chlamydomonas reinhardtii* jest ok. 70 razy większa od K_m dla fotoredukcji NADP^+ katalizowanej preparatem tylakoidów.

Rao i Hall [47] opisali wyniki badań wpływu wstępnego naświetlenia na wydzielanie wodoru i tlenu. W serii doświadczeń naświetlano chloroplasty szpinaku, następnie dodawano akceptor elektronów, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ i mierzono elektrodą tlenową szybkość wydzielania tlenu, lub dodawano hydrogenazę z *C. pasteurianum* i mierzono szybkość wydzielania wodoru. Tą drogą stwierdzono, że w czasie 90 minut preiluminacji szybkość wydzielania wodoru rośnie do maksimum (od około 3 do 20 $\mu\text{moli H}_2/\text{mg chl. godz.}$), a szybkość wydzielania tlenu maleje trzykrotnie (do około 60 $\mu\text{moli O}_2/\text{mg chl. godz.}$). Fakty te można tłumaczyć gromadzeniem puli zredukowanej Fd, która pierwotnie reaguje z innymi, aktywniejszymi akceptorami elektronów, a dopiero po ich wyczerpaniu może wydajniej reagować z hydrogenazą.

Fotobiologiczne wytwarzanie wodoru różni się od innych fotochemicznych reakcji chloroplastów natężeniem nasycającym światła. Według Fry i wsp. [21] układ chloroplasty—hydrogenaza wykazuje maksymalną szybkość wydzielania wodoru przy niskich natężeniach światła, około $8 \cdot 10^3 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Zjawisko nasycenia dla tego procesu występuje przy natężeniach światła około 10-krotnie niższych niż dla wydzielania tlenu z akceptorami — $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ lub NADP^+ . Według wspomnianych autorów różnice te można przypisać temu, że najwolniejszym stadium wydzielania wodoru jest nie fotochemiczne tworzenie czynnika redukującego, lecz dyfuzja zredukowanych pośredników do Fd i hydrogenazy.

Fotosyntetyczny transport elektronów i wytwarzanie H_2 nie różnią się natomiast w istotny sposób optymalną wartością pH. Optimum pH dla transportu elektronowego od wody do $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ wynosi 7,6, natomiast dla wydzielania wodoru z układu chloroplasty—hydrogenaza jest zawarte w przedziale 7 - 7,5 [21].

Warto również wspomnieć o badaniach nad wpływem różnych substancji na wydzielanie wodoru. Znany jest stabilizujący i zwiększający fotochemiczną aktywność chloroplastów wpływ dodatku BSA [20]. Wpływ dodatku BSA na wydzielanie wodoru z układu chloroplasty—hydrogenaza zaznacza się znacznie wyraźniej w przypadku chloroplastów zamrożonych i rozmrożonych niż świeżych [47]. Działanie ochronne BSA polega prawdopodobnie na wiązaniu kwasów tłuszczowych, uwalnianych przez lipazy i proteazy.

Próby stabilizowania błon chloroplastowych wykazały, że najlepsze wyniki daje inkubacja materiału z 5 μmolami aldehydu glutarowego na

mg chlorofilu przez 30 min w 0°C. Tak preparowane błony chloroplastowe są znacznie stabilniejsze w ciemności (aktywność w transporcie elektronowym od wody do żelazicyjanku zmniejsza się do połowy dopiero po 30 godz.) od chloroplastów nie poddanych działaniu aldehydu glutarowego; związek ten nie chroni jednak chloroplastów przed dezaktywacją na świetle [47].

Zwiększoną trwałość układu na świetle próbowano również uzyskać przez immobilizację hydrogenazy i ferredoksyny. Stwierdzono, że różne metody immobilizacji prowadzą do znacznej stabilizacji układu (do kilku dni), jednak równocześnie silnie obniżają aktywność. W obecności naświetlanych chloroplastów immobilizowana Fd jest zdolna do przeniesienia elektronów od askorbinianu do rozpuszczalnej hydrogenazy, ale równoczesna immobilizacja Fd i hydrogenazy prowadzi do całkowitej utraty zdolności wytwarzania wodoru; przyczyną tego jest prawdopodobnie zbyt utrudniona dyfuzja przenośników elektronów.

Dodanie dysmutazy ponadtlenowej nie ma wpływu na wytwarzanie wodoru, można więc sądzić, że w naświetlanym układzie nie powstają rodniki O_2^- lub nie mają one wpływu na proces wytwarzania wodoru. Natomiast dodanie katalazy i etanolu stymuluje wydzielanie wodoru, co świadczy o hamowaniu tego procesu przez H_2O_2 , wytworzoną przez O_2 i glukozę w obecności oksydazy glukozowej [21, 48]. Wytwarzanie wodoru jest hamowane również przez askorbinian i PMS, prawdopodobnie dzięki ułatwieniu cyklicznego przepływu elektronów wokół zespołu PS1. Rozsprzęgacze (np. 10^{-6} M FCCP) nie mają wpływu na wytwarzanie wodoru przez układ zawierający rozsprzężone chloroplasty, ale zwiększają szybkość wydzielania wodoru przez chloroplasty sprzężone [47].

WYTWARZANIE WODORU PRZEZ NAŚWIETLANE GLONY

W odróżnieniu od roślin wyższych, w wielu glonach występują hydrogenazy, toteż proces wytwarzania wodoru przez te organizmy nie wymaga uzupełnienia badanego obiektu enzymem. Możliwe, że dzięki temu pierwszymi obiektami doświadczalnymi, w których zaobserwowano fotobiologiczne wytwarzanie wodoru, były glony: Gaffron i Rubin [23] stwierdzili, że naświetleniu glonów w warunkach beztlenowych towarzyszy wydzielanie wodoru. Proces ten stymuluje dodatek glukozy lub innych egzogennych donorów wodoru, a towarzyszy mu uwalnianie dwutlenku węgla.

Obszerne badania, prowadzone w wielu laboratoriach, zmierzały do poznania mechanizmu wytwarzania wodoru oraz udziału zespołów PS1 i PS2 w tym procesie, jak również powiązania tego procesu z innymi szlakami metabolicznymi. Stuart i Kaltwasser [55] stwierdzili, że mu-

tanty pozbawione zespołu PS1 wykazują bardzo niską aktywność wytwarzania wodoru. Stosując normalne kultury glonów uzyskano silne hamowanie wydzielania wodoru przez DSPD [4], antagonistę Fd [61]. Według Hallenbecka i Benemanna [27] dowodzi to bezpośredniej zależności procesu wytwarzania wodoru od przepływu elektronów przez PS1; nie wyklucza to jednak możliwości pośredniego udziału PS1 przez dostarczanie drogą cyklicznej fosforylacji energii, potrzebnej do ciemnych reakcji wytwarzających wodór. Przeciwno tej alternatywie przemawia stymulowanie wydzielania wodoru przez rozsprzęgacz CCCP [32, 38]. W procesie wytwarzania wodoru uczestniczą też przenośniki elektronów, czynne między zespołami PS1 i PS2. Wynika to z doświadczeń Bishopa i wsp. [8], którzy stwierdzili, że mutanty pozbawione wskutek delecji genetycznej cytochromu f 553 nie są zdolne do fotosyntezy, fotoredukcji (reakcja 6) i wytwarzania wodoru. Prawie całkowite zahamowanie wydzielania wodoru powoduje też antagonistą plastochinonu — DBMIB.

Udział zespołu PS2 w wytwarzaniu wodoru jest ciągle dyskusyjny. Szereg mutantów pozbawionych tego zespołu wykazuje normalną aktywność w procesie fotoredukcji CO₂, lecz silnie zahamowaną fotosyntezę i wytwarzanie wodoru; efekt ten może być jednak wywołany brakiem niektórych składników łańcucha transportu elektronowego. Healey [33] doszedł do wniosku, że glony zawierające hydrogenazę można podzielić na trzy grupy na podstawie wrażliwości na DCMU:

1. glony, w którym DCMU nie hamuje wytwarzania wodoru (niektóre odmiany *Chlamydomonas*),
2. proces wytwarzania wodoru jest hamowany przez DCMU w około 50% (niektóre odmiany *Scenedesmus* i *Chlorella pyrenoidosa*),
3. proces wytwarzania wodoru jest hamowany przez DCMU całkowicie (*Chlorella vulgaris* i *Chlorella* sp.).

Wydaje się, że o ile w glonach grupy 3 donorem elektronów jest woda (a więc zespół PS2 uczestniczy w procesie wytwarzania wodoru), o tyle w glonach pozostałych grup źródłem reduktorów mogą być związki organiczne. Stuart i Gaffron [53] stwierdzili, że w glonach *Chlorella* i *Scenedesmus* z wydzielaniem tlenu zablokowanym dodatkiem CCCP wytwarzanie wodoru hamuje w około 50% dodatek DCMU.

O udziale organicznych donorów w wytwarzaniu wodoru świadczą też wyniki następujących doświadczeń:

- a) jak już wspomniano wcześniej, wytwarzaniu wodoru towarzyszy uwalnianie CO₂ [38],
- b) wysokie stężenie CO₂ w fazie gazowej hamuje wydzielanie wodoru [32],
- c) długi okres ciemnej anaerobiozy obniża wydajność indukowanego światłem wytwarzania wodoru, prawdopodobnie wskutek wyczerpania

puli reduktorów. Efekt ten może być zniesiony wstępnym okresem fotosyntezy lub dodatkiem glukozy [32, 33]. Z wielu badanych metabolitów czynna jest tylko glukoza, co świadczy o związku procesu wytwarzania wodoru ze szlakiem glikolitycznym Embdena-Meyerhofa. Połączenie tych dwóch procesów nie jest jednak jasne, gdyż według stechiometrycznych pomiarów Stuarta i Gaffrona [52] 1 μmol glukozy powoduje wytworzenie 0,5 μmola H_2 .

d) o udziale cyklu kwasu cytrynowego w procesie wytwarzania wodoru przez glony *Chlamydomonas* świadczy hamowanie tego procesu przez fluorooctan [32].

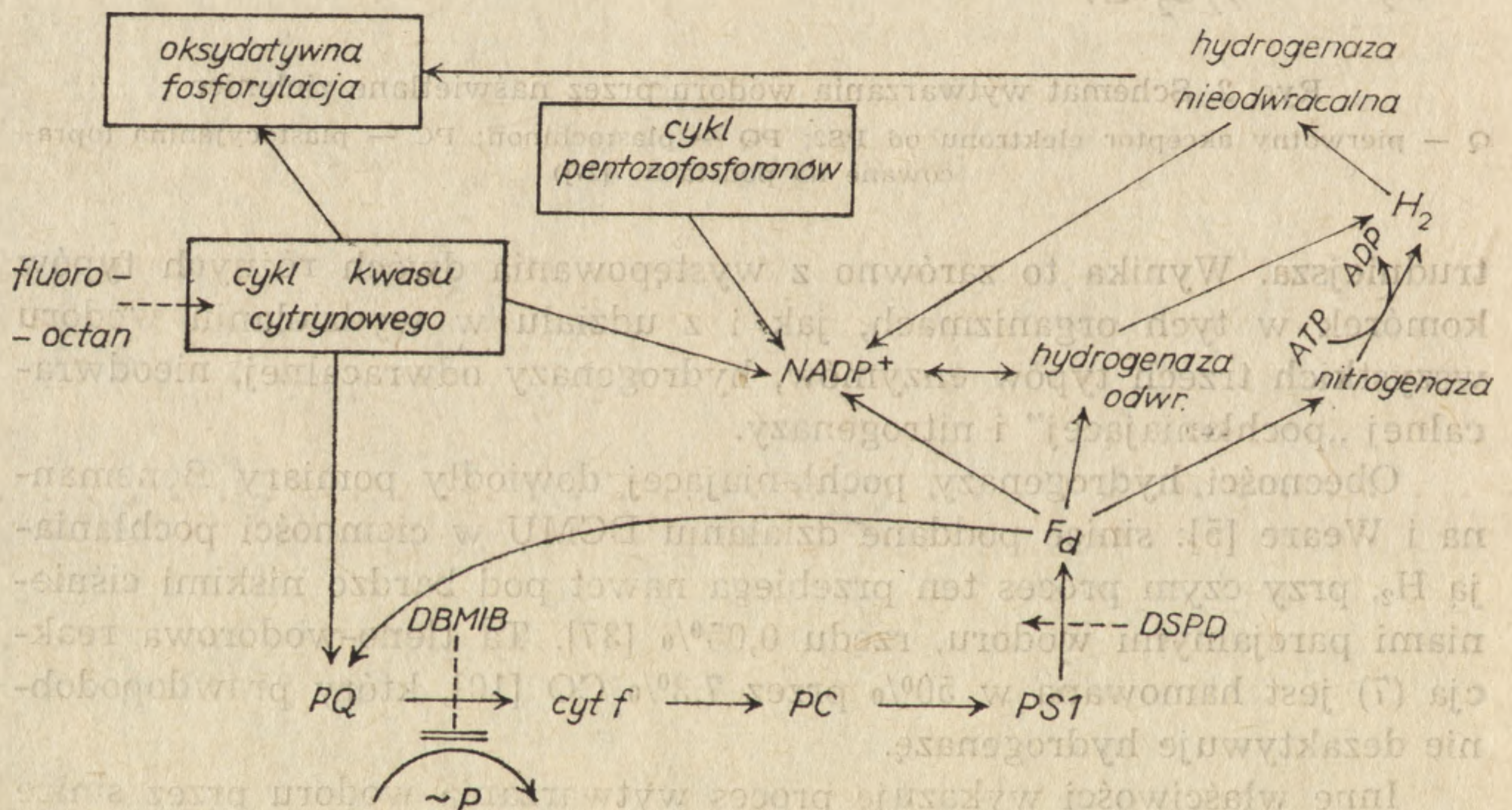
Na uwagę zasługują też pomiary kinetyki wydzielania tlenu i wodoru, na podstawie których można sądzić o różnicach mechanizmu tych dwóch procesów. Zastosowanie techniki błyskowego oświetlenia dowiodło, że wydzielanie tlenu z chloroplastów, przez dłuższy czas inkubowanych w ciemności, następuje dopiero przy trzecim błysku, następnie ma charakter oscylacji tłumionych z okresem co czwarty błysk [19]. Natomiast wytwarzanie wodoru następuje już przy pierwszym błysku ze stałą wydajnością przez co najmniej 26 błysków [26].

Przeprowadzono też badania kinetyki wytwarzania wodoru przy ciągłym oświetleniu [8, 52]. W ciągu pierwszych kilku minut naświetlania następuje „wybuch” wytwarzania wodoru (z szybkością 34 μl H_2/mg suchej masy \cdot godz. w ciągu pierwszej minuty [8]), po którym następuje długi okres wolniejszego wytwarzania wodoru z szybkością około 5 μl H_2/mg suchej masy \cdot godz. [33]. Te zmiany kinetyki wytwarzania wodoru przypisuje się albo szybkiemu gromadzeniu tlenu dezaktywującego hydrogenazę, albo szybkiemu obniżeniu poziomu zakumulowanych reduktorów do stanu fotostacjonarnego. Według Hallenbecka i Benemanna [27] „wybuch” wytwarzania wodoru może pełnić ważną funkcję fizjologiczną. Po dłuższym okresie ciemnej anaerobiozy wydzielanie tlenu jest silnie zakłócone, prawdopodobnie dzięki obniżeniu poziomu redoks puli przenośników elektronów (np. plastochinonu), które utrudnia efektywne utlenienie pierwotnego akceptora elektronów od PS2 [16]. Faza szybkiego wytwarzania wodoru może przyspieszyć powrót aparatu fotosyntezy do stanu w pełni wydajnego przez utlenienie puli przenośników elektronów. Sugestie te są poparte pośrednio wynikami doświadczeń Kesslera [39]: glony nie zawierające hydrogenaz po dłuższym okresie ciemnej anaerobiozy tracą na kilka minut zdolność wydzielania tlenu na świetle.

Procesy prowadzące do wytwarzania wodoru w zielenicach są przedstawione schematycznie na ryc. 2.

W porównaniu z omówionymi zielenicami, proces wytwarzania wodoru przez naświetlane sinice jest bardziej złożony, a jego interpretacja

nie wodoru jest uwarunkowane obecnością tlenu, źródłem energii jest więc fosforylacja oksydacyjna związana z łańcuchem oddechowym. Natomiast dla aktywności nitrogenazy potrzebne jest światło. Fay [18] stosując monochromatyczne światło wykazał, że redukcja acetyleny przebiega z udziałem zespołu PS1. Jak już wcześniej wspomniano, nitrogenaza jest zlokalizowana w heterocystach, ATP potrzebne dla tego enzymu jest więc tworzone w cyklicznej fotofosforylacji [57]. Nie wykluczony jest też udział fotofosforylacji niecyklicznej z wykorzystaniem donorów endogennych lub egzogennych, których funkcję mogą pełnić glikolan, jabłczan, bursztynian lub izocytrynian [44]. Donory endogenne są wytwarzane w cyklu kwasu cytrynowego: świadczy o tym hamowanie ciemnej reakcji redukcji acetyleny przez fluoroocetan.



Ryc. 3. Schemat wytwarzania wodoru w heterocystach naświetlanych sinic. Oznaczenia — jak na ryc. 2 (opracowane na podstawie [27])

Przepływ elektronów przez PS1 prowadzi do redukcji Fd, która jest fizjologicznym donorem elektronów dla nitrogenazy. W ciemności redukcja Fd może przebiegać inną drogą, kosztem NADPH, tworzonego w dużych ilościach w cyklu pentozofosforanów (aktywność enzymów tego cyklu wykryto w heterocystach) [63].

Schemat procesów, prowadzących do wytwarzania wodoru w naświetlanych sinicach przedstawiono na ryc. 3.

SZTUCZNE UKŁADY WYTWARZAJĄCE WODÓR

W sztucznych układach, wytwarzających wodór kosztem energii promieniowania, wykorzystywano zarówno związki nieorganiczne, jak i organiczne. Prace dotyczące układów nieorganicznych, działających według mechanizmów różnych od opisanych już układów biologicznych, opisał w artykule przeglądowym Krasnovsky [42].

Prace nad sztucznymi układami organicznymi zmierzają głównie do syntezy katalizatorów, zawierających Mn^{2+} i symulujących działanie enzymu rozkładającego wodę oraz do syntezy analogów miejsca czynnego ferredoksyny, zawierających żelazo i siarkę i związanych z niskocząsteczkowymi peptydami. Adams i wsp. [2] stwierdzili, że czterojądrowe kompleksy zawierające Fe_4S_4 i oktapeptyd lub sulfoetanol podlegają odwracalnej jednoelektronowej redukcji w obecności hydrosiarczynu. Kompleksy te są rozpuszczalne w wodzie i mogą zastąpić funkcję Fd w procesie wytwarzania wodoru katalizowanym hydrogenazą z *Clostridium pasteurianum* z donorem elektronów — hydrosiarczynem.

LITERATURA

- [1] ADAMS M. W. W., HALL D. O., Properties of the solubilized membrane-bound hydrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, Arch. Biochem. Biophys.: **195**: 288 - 299, 1979.
- [2] ADAMS M. W. W., REEVES S. G., HALL D. O., CHRISTOU G., RIDGE B., RYDON H. N., Biological activity of synthetic tetranuclear iron-sulphur analogues of the active sites of ferredoxins, Biochem. Biophys. Res. Commun., **79**: 1184 - 1191, 1977.
- [3] ARNON D., MITSUI A., PANEQUE A., Photoproduction of hydrogen gas coupled with photosynthetic phosphorylation, Science, **134**: 1425, 1961.
- [4] BEN-AMOTZ A., GIBBS M., H_2 metabolism in photosynthetic organisms. II. Light-dependent H_2 evolution by preparations from *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* and spinach, Biochem. Biophys. Res. Commun.: **64**: 355 - 359, 1975.
- [5] BENEMANN J. R., WEARE N. M., Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. III. Hydrogen-supported nitrogenase activity, Arch. Microbiol., **101**: 401 - 408, 1974.
- [6] — Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures, Science, **184**: 174 - 175, 1974.
- [7] BENEMANN J. R., BERENSON J. A., KAPLAN N. O., KAMEN M. D., Hydrogen evolution by a chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**: 2317 - 2320, 1973.
- [8] BISHOP N. I., FRICK M., JONES L., [w] Biological Solar Energy Conversion, red. A. Mitsui, Acad. Press, New York, 1977, str. 3 - 22.
- [9] BOTHE H., Photosynthetische Stickstofffixierung mit einem zellfreien Extrakt aus der Blaualge *Anabaena cylindrica*, Ber. dtsh. bot. Ges., **83**: 421 - 432, 1970.
- [10] BOTHE H., TENNIGKEIT J., EISBRENNER G., The utilization of molecular

- hydrogen by the blue-green alga *Anabaena cylindrica*, Arch. Microbiol., **114**: 43 - 49, 1977.
- [11] BRADLEY S., CARR N. G., The absence of a functional photosystem II in heterocysts of *Anabaena cylindrica*, J. Gen. Microbiol., **68**: XIII, 1971.
- [12] BRILL W. J., Biological nitrogen fixation, Sci. American, **236**: 68 - 81, 1977.
- [13] CAMMACK R., RAO K. K., BARGERON C. P., HUTSON K. G., ANDREW P. W., ROGERS L. J., Midpoint redox potentials of plant and algal ferredoxins, Biochem. J., **168**: 205 - 209, 1977.
- [14] CHEN J. S., MORTENSON L. E., Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W 5, Biochim. Biophys. Acta **371**: 283 - 298, 1974.
- [15] COX G. R., FAY P., Nitrogen fixation and pyruvate metabolism in cell-free preparations of *Anabaena cylindrica*, Arch. Mikrobiol., **58**: 357 - 365, 1967.
- [16] DINER B., MAUZERALL D., Feedback controlling oxygen production in a cross-reaction between two photosystems in photosynthesis, Biochim. Biophys. Acta, **305**: 329 - 352, 1973.
- [17] FAY P., Cell differentiation and pigment composition in *Anabaena cylindrica*, Arch. Mikrobiol., **67**: 62 - 70, 1969.
- [18] — Photostimulation of nitrogen fixation in *Anabaena cylindrica*, Biochim. Biophys. Acta, **216**: 353 - 356, 1970.
- [19] FORBUSH B., KOK B., MCGLOIN M., Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. II. Damping of flash yield oscillation, deactivation, Photochem. Photobiol., **14**: 307 - 321, 1971.
- [20] FRIEDLANDER M., NEUMANN J., Stimulation of photoreactions of isolated chloroplasts by serum albumine, Plant Physiol., **43**: 1249 - 1254, 1968.
- [21] FRY I., PAPAGEORGIOU G., TEL-OR E., PACKER L., Reconstitution of a system for H₂ evolution with chloroplasts, ferredoxin, and hydrogenase, Z. Naturforsch: **32c**: 110 - 117, 1977.
- [22] FUJITA Y., OHAMA H., HATTORI A., Hydrogenase activity in a cell-free preparation obtained from the blue green algae *Anabaena cylindrica*, Plant Cell Physiol., **5**: 305 - 311, 1964.
- [23] GAFFRON H., RUBIN J., Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae, J. Gen. Physiol., **26**: 195 - 240, 1942.
- [24] GITLITZ P. H., KRASNA A. I., Structural and catalytic properties of hydrogenase from *Chromatium*, Biochemistry, **14**: 2561 - 2567, 1975.
- [25] GOGOTOV I. N., ZORIN N. A., SEREBRIAKOVA L. T., KONDRATIEVA E. N., The properties of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*, Biochim. Biophys. Acta, **523**: 335 - 343, 1978.
- [26] GREENBAUM E., The photosynthetic unit of hydrogen evolution, Science, **196**: 879 - 888, 1977.
- [27] HALLENBECK P. C., BENEMANN J. R., Hydrogen from Algae, [w] Topics in Photosynthesis, red. J. Barber, t. 3, Photosynthesis in relation to model systems, Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam, 1979, str. 331 - 364.
- [28] HARTMAN H., KRASNA A., Studies on the "adaptation" of hydrogenase in *Scenedesmus*, J. Biol. Chem., **238**: 749 - 757, 1963.
- [29] — Properties of the hydrogenase of *Scenedesmus*, Biochim. Biophys. Acta, **92**: 52 - 58, 1964.
- [30] HAYSTEAD A., STEWART W. D. P., Characteristics of the nitrogenase system of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*, Arch. Mikrobiol., **82**: 325 - 336, 1972.

- [31] HAYSTEAD A., ROBINSON R., STEWART W. D. P., Nitrogenase activity in extracts of heterocystous and non-heterocystous blue-green algae, *Arch. Mikrobiol.*, **74**: 235 - 243, 1970.
- [32] HEALEY F. P., The mechanism of hydrogen evolution by *Chlamydomonas moewusii*, *Plant Physiol.*, **45**: 153 - 159, 1970.
- [33] — Hydrogen evolution by several algae, *Planta*, **91**: 220 - 226, 1970.
- [34] HOFFMANN D., THAUER R., TREBST A., Photosynthetic hydrogen evolution by spinach chloroplasts coupled to a *Clostridium hydrogenase*, *Z. Naturforsch.*, **32c**: 257 - 262, 1977.
- [35] ISAAKIDOU J., PAPAGEORGIOU G. C., Biochemical and biophysical properties of vegetative and heterocystous cells from filamentous cyanobacteria, [w] *Polarized Light Spectroscopy of Biological Systems*, Proc. Spring School, Kołobrzeg 1980, str. 55 - 60.
- [36] JACKOWSKA K., Problemy przetwarzania energii słonecznej na granicy faz półprzewodnik—roztwór elektrolitu, *Wiad. Chem.*, **34**: 225 - 241, 1970.
- [37] JONES L., BISHOP N., Simultaneous measurement of oxygen and hydrogen exchange from the blue-green alga *Anabaena*, *Plant Physiol.*, **57**: 659 - 665, 1976.
- [38] KALTWASSER H., STUART J. S., GAFFRON H., Light-dependent hydrogen evolution by *Scenedesmus*, *Planta*, **89**: 309 - 322, 1969.
- [39] KESSLER E., Effect of anaerobiosis on photosynthetic reactions and nitrogen metabolism of algae with and without hydrogenase, *Arch. Mikrobiol.*, **93**: 91 - 100, 1973.
- [40] KING D., ERBES D. L., BEN-AMOTZ A., GIBBS M., [w] *Biological Solar Energy Conversion*, red. A. Mitsui, Acad. Press, New York 1977, str. 69 - 75.
- [41] KRAMPITZ L. O., [w] *Biophotolysis of water*, NSF-RANN Report No HA2; N-73-014; 1973 cyt. wg poz. [47]
- [42] KRASNOVSKY A. A., Photoproduction of hydrogen in photosynthetic and artificial systems, [w] *Topics in Photosynthesis*, red. J. Barber, t. 3. Photosynthesis in relation to model systems, Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam 1979, str. 281 - 298.
- [43] KRASNOVSKY A. A., NIKANDROV V. V., GRIN G. P., GOGOTOV I. N., OSHCHEPKOV V. P., Photoformation of hydrogen in solutions of chlorophyll, NAD-H and chloroplasts, *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, **225**: 711 - 713, 1975.
- [44] MURAI T., KATOH T., Photosystem I-dependent oxidation of organic acids in blue-green alga, *Anabaena variabilis*, *Plant Cell Physiol.*, **16**: 789 - 797, 1975.
- [45] OESTERHELD H., Das Verhalten von Nitratreductase, Nitritreductase Hydrogenase und anderen Enzymen von *Ankistrodesmus braunii* bei Stickstoffmangel, *Arch. Mikrobiol.*, **79**: 25 - 43, 1971.
- [46] PETERSON R. B., BURRIS R. H., Hydrogen metabolism in isolated heterocysts of *Anabaena* 7120, *Arch. Microbiol.*, **116**: 125 - 132, 1978.
- [47] RAO K. K., HALL D. O., Hydrogen production from isolated chloroplasts, [w] *Topics in Photosynthesis*, red. J. Barber, t. 3, Photosynthesis in relation to model systems, Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam 1979, str. 299 - 329.
- [48] RAO K. K., ROSA L., HALL D. O., Prolonged production of hydrogen gas by a chloroplast biocatalytic system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**: 21 - 28, 1976.
- [49] SCHNEIDER K., SCHLEGEL H. G., Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16, *Biochim. Biophys. Acta*, **452**: 66 - 80, 1976.

- [50] STEWART W. D. P., HAYSTEAD A., PEARSON H. W., Nitrogenase activity in heterocysts of blue-green algae, *Nature (Lond.)*, **224**: 226 - 228, 1969.
- [51] STILLER M., LEE J. K.-H., Hydrogenase activity in *Chlorella*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **93**: 174 - 176, 1964.
- [52] STUART T. S., GAFFRON H., The kinetics of hydrogen photoproduction by adapted *Scenedesmus*, *Planta*, **100**: 228 - 243, 1971.
- [53] — The mechanism of hydrogen photoproduction by several algae. II. The contribution of photosystem II, *Planta*, **106**: 101 - 112, 1972.
- [54] — The gas exchange of hydrogen-adapted algae as followed by mass spectrometry, *Plant Physiol.*, **50**: 136 - 140, 1972.
- [55] STUART T. S., KALTWASSER H., Photoproduction of hydrogen by photosystem I of *Scenedesmus*, *Planta*, **91**: 302 - 313, 1970.
- [56] TAGAWA K., ARNON D. I., Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas, *Nature (Lond.)*, **195**: 537 - 543, 1962.
- [57] TEL-OR E., STEWART W. D. P., Photosynthetic electron transport. ATP synthesis and nitrogenase activity in isolated heterocysts of *Anabaena cylindrica*, *Biochim. Biophys. Acta*, **423**: 189 - 195, 1976.
- [58] — Photosynthetic components and activities of nitrogen-fixing isolated heterocysts of *Anabaena cylindrica*, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B*, **198**: 61 - 83, 1977.
- [59] TEL-OR E., LUIJK L. W., PACKER L., An inducible hydrogenase in cyanobacteria enhances N₂ fixation, *FEBS Lett.*, **78**: 49 - 52, 1977.
- [60] — Hydrogenase in N₂-fixing cyanobacteria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**: 185 - 194, 1978.
- [61] TREBST A., BURBA A., Über die Hemmung photosynthetischer Reaktionen in isolierten Chloroplasten und in *Chlorella* durch Disalicydenpropandiamin, *Z. Pflanzenphysiol.*, **57**: 419 - 433, 1967.
- [62] WARD M. A., Adaptation of hydrogenase in cell-free preparations from *Chlamydomonas*, *Phytochemistry*, **9**: 267 - 274, 1970.
- [63] WINKENBACH F., WOLK C. P., Activities of enzymes of the oxidative and the reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of a blue-green alga, *Plant Physiol.*, **52**: 480 - 483, 1973.
- [64] WOLK C. P., Movement of carbon from vegetative cells to heterocysts in *Anabaena cylindrica*, *J. Bacteriol.*, **96**: 2138 - 2143, 1968.
- [65] WOLK C. P., SIMON R. D., Pigments and lipids of heterocysts, *Planta*, **86**: 92 - 97, 1969.
- [66] YAGI T., KIMURA K., DAIDOJI H., SAKAI F., TAMURA S., INOKUCHI H., Properties of purified hydrogenase from the particulate fraction of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki, *J. Biochem. (Tokyo)*, **79**: 661 - 671, 1976.

Otrzymano: 10 marca 1981.

Przyjęto: 15 marca 1981.

Adres autora: Tamka 2, 50-137 Wrocław

STRUKTURA BŁON TYLAKOIDÓW A PROCES FOSFORYLACJI FOTOSYNTETYCZNEJ *

THYLAKOID MEMBRANE STRUCTURE AND PHOTOSYNTHETIC PHOSPHORYLATION

Grażyna MAJEWSKA i Stanisław WIĘCKOWSKI

Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie. W artykule dokonano przeglądu piśmiennictwa na temat struktury błon tylakoidów oraz przedstawiono współczesne poglądy na mechanizm fosforylacji fotosyntetycznej. Szczególną uwagę zwrócono na takie zagadnienia, jak skład peptydowy lamell, modele błon tylakoidów, sprzężenie fosforylacji fotosyntetycznej z łańcuchem transportu elektronów, powstawanie różnicy potencjału elektrycznego w błonach tylakoidów, struktura czynnika sprzęgającego (CF₁) i chemiosmotyczna teoria fosforylacji fotosyntetycznej.

Summary. The structure of thylakoid membranes and the hypothesis of photosynthetic phosphorylation have been reviewed. In particular, this presentation deals with the polypeptide composition of chloroplast lamellae, the models of thylakoid membranes, coupling of photophosphorylation with electron transport chain, the structure of coupling factor (CF₁), and with the chemiosmotic hypothesis of photosynthetic phosphorylation.

Stosowane skróty

SDS — siarczan dodecyłu sodu

PS I — I układ fotosyntezy

PS II — II układ fotosyntezy

LHC (light harvesting chlorophyll *a/b* protein complex) — kompleks chlorofil *a/b*-białko zbierający energię

CF₁ (coupling factor) — chloroplastowy czynnik sprzęgający

* Referat wygłoszony na Sympozjum „Biochemiczne podstawy wykorzystania energii słonecznej”, XVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Warszawa, 11 - 13 września 1980 r.

CF₀ — białka błon tylakoidów stanowiące łącznie z CF₁ kompleks syntazy ATP

PQ — plastochinon A

Q — pierwotny akceptor elektronów w PS II

Pi — fosforan nieorganiczny

DCMU — 3-(3,4-dwuchlorofenylo)-1,1-dimetylomocznik

DBMIB — 2,5-dwubromo-3-metylo-6-izopropilo-p-benzochinon

εADP — 1,N⁶-etenoadenozyno dwufosforan

AMP-PNP — adenyloimidodwufosforan

εAMP-PNP — 1,N⁶-etenoadenyloimidodwufosforan

arylazido-ATP (-ADP) — 3-0-{3-[N-(4-azydo-2-nitrofenylo)amino] propionilo}adenozyno trójfosforan (dwufosforan)

NBD — 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oksy-1,3-diazol

EDTA — kwas etylenodiaminotetraoctowy

WSTĘP

Od kilkunastu lat struktura i funkcja systemu lamellarnego chloroplastów budzi duże zainteresowania zarówno wśród wielu biologów, jak również chemików i fizyków. W błonach tych odbywa się bowiem transformacja energii świetlnej w chemiczną w wyniku czego zachodzi redukcja NADP⁺ i fosforylacja ADP. Te pierwotne produkty fotosyntezy (NADPH, ATP) są wykorzystywane w określonych reakcjach wiązania CO₂ i syntezy związków organicznych.

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie współczesnych poglądów na temat struktury błon tylakoidów oraz mechanizmu fosforylacji fotosyntetycznej. Czytelników zainteresowanych określonymi aspektami poruszanych zagadnień odsyłamy do innych opracowań publikowanych w języku polskim [42, 47 - 49, 59, 77].

SKŁAD CHEMICZNY I MODELE BŁON TYLAKOIDÓW *

Dotychczas otrzymane wyniki wskazują, iż struktura błon tylakoidów jest zgodna z ogólnym modelem błon cytoplazmatycznych, opracowanym przez Singera i Nicolsona [129], tzn. zrąb stanowią dwie warstwy lipidów, w których zanurzone są białka integralne o charakterze hydrofobowym lub amfipatycznym, a na powierzchni znajdują się białka powierzchniowe stosunkowo luźno związane z hydrofilową częścią warstwy lipidów (patrz [4]). Powierzchnia jest pokryta jonizującymi grupa-

* Patrz również [153].

mi, przy czym gęstość ładunków elektrycznych jest uzależniona od pH [1, 105] i od stężenia kationów [82].

W skład frakcji lipidowej wchodzi fosfolipidy (fosfatydyloglicerol, fosfatydylocholina), glikolipidy (monoacylodiglicerydy, digalaktozydiliglicerydy) i sulfolipidy; na obojętne glikolipidy przypada około 80%, natomiast resztę stanowią ujemnie naładowane fosfo- i sulfolipidy [2]. W lipidach błon tylakoidów, zwłaszcza w glikolipidach, znajduje się stosunkowo dużo kwasów nienasyconych (głównie kwasu linolenowego), przez co błona ma charakter półpłynny. Zdaniem niektórych badaczy (patrz [4]) nie wszystkie lipidy mogą się jednak przemieszczać w horyzontalnej płaszczyźnie błony.

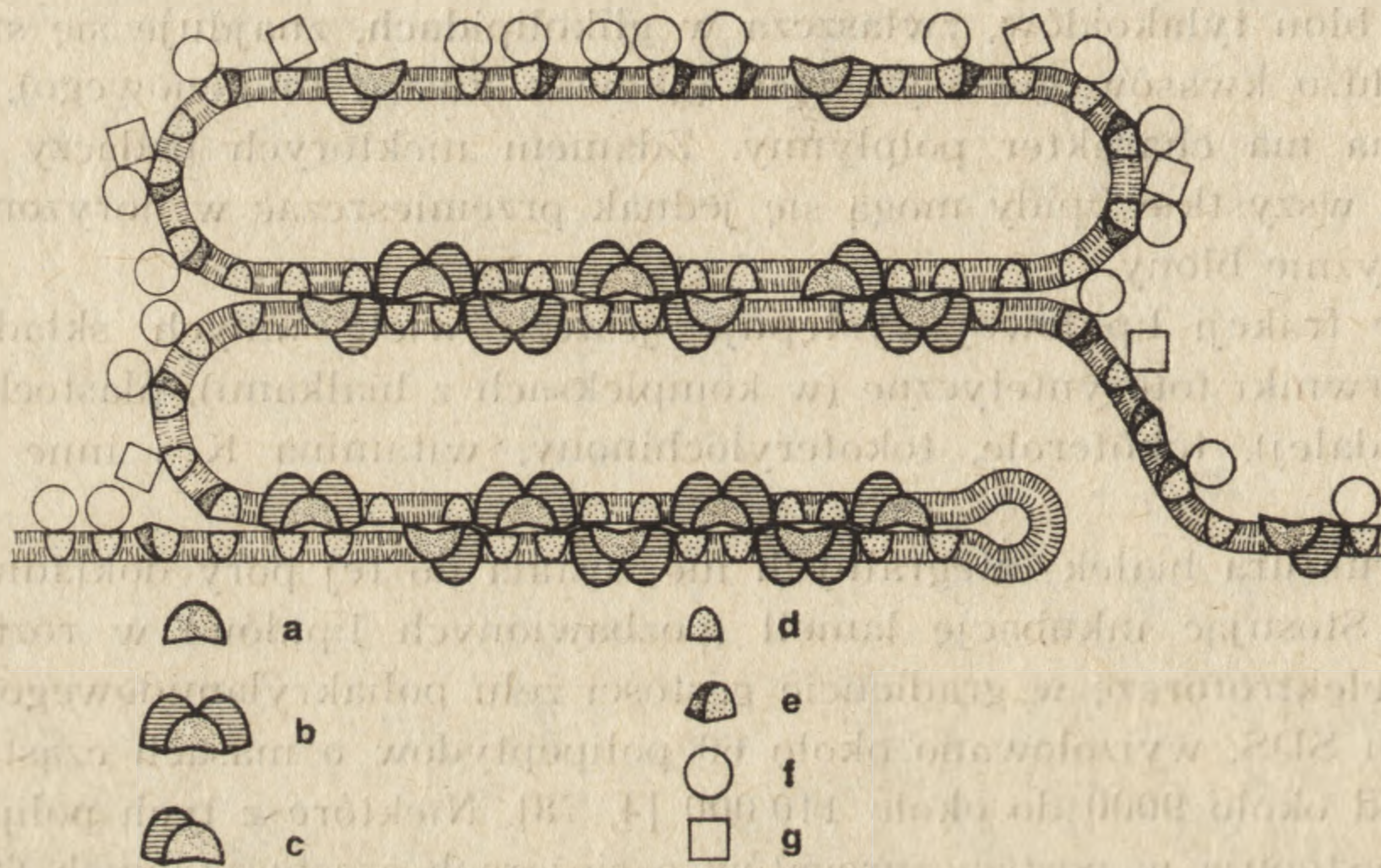
We frakcji lipidowej występuje jeszcze wiele innych składników jak: barwniki fotosyntetyczne (w kompleksach z białkami), plastochinony (patrz dalej), tokoferole, tokoferylochiny, witamina K i inne (patrz [153]).

Struktura białek integralnych nie została do tej pory dokładnie poznana. Stosując inkubację lamell (pozbawionych lipidów) w roztworze SDS i elektroforezę w gradiencie gęstości żelu poliakrylamidowego z dodatkiem SDS, wyizolowano około 60 polipeptydów o masach cząsteczkowych od około 9000 do około 110 000 [4, 78]. Niektóre z tych polipeptydów występują w postaci agregatów o ciężarach cząsteczkowych 60 000 - 80 000; dysocjacja zachodzi dopiero w obecności wyższych stężeń detergentu [73]. Również polipeptydy o masach cząsteczkowych 24 000 i 16 000 można wyizolować w postaci odpowiednich dimerów o ciężarach cząsteczkowych 48 000 lub 31 000 [6].

Stosując SDS i elektroforezę z lamell chloroplastów nie poddanych wcześniej delipidacji, wyizolowano sześć typów kompleksów chlorofilowo-białkowych [5, 156]. Dwa z nich o masach cząsteczkowych około 70 000 zawierały P700, co oznacza, że pochodziły one z I układu fotosyntezy. Trzy kompleksy o masach cząsteczkowych około 25 000 nie zawierały centrów reakcji; zostały one zidentyfikowane jako składniki kompleksu chlorofilowo-białkowego zbierającego energię. Ponadto wyizolowano zielony kompleks, w skład którego wchodziły polipeptydy o masach cząsteczkowych 50 000 i 47 000; zlokalizowane tu były centra reakcji PS II.

Na podstawie analizy elektronogramów sądzi się, że w błonach tylakoidów białka integralne wchodzi w skład 4-5 typów globul, których średnica waha się od około 9,0 nm do około 18,0 nm [4, 85, 87, 132]. Globule (cząstki) te są widoczne zarówno na powierzchniach lamell, jak również na replikach powierzchni komplementarnych powstałych w wyniku rozłupania lamell gran lub stromy przez hydrofobowe wnętrza [28]. Na powierzchniach łupania obserwuje się zwykle dwa typy cząstek: duże

o średnicy około 17,5 nm i małe o średnicy około 11,0 nm. Niektórzy badacze (np. [13]) są zdania, że duże cząstki stanowią kompleksy PS II łącznie z LHC, natomiast mniejsze mają stanowić PS I. Tego typu obserwacje były podstawą opracowania kilku modeli błon tylakoidów, spośród których jeden przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Model błon tylakoidów według L. A. Staehelin i wsp. [133]

a — PS II (cząstki o średnicy 8 nm), b — PS II + LHC (cząstki o średnicy około 14 nm), c — PS II + część LHC (cząstki o średnicy 14 nm), d — PS I, cytochromy, LHC? (cząstki o średnicy około 8 nm), e — PS I + LHC? (cząstki o średnicy około 11,5 nm), f — CF_1 , g — karboksylaza rybulozo 1,5-bisfosforanowa

Powstaje teraz pytanie, czy system lamellarny w chloroplastach granowych jest homo- czy heterogenny. Największą dyskusję budzi problem ewentualnych różnic między strukturą i funkcją lamell stromy i lamell gran. Według Parka i Sane (patrz [120]) lamelle stromy są pozbawione PS II, natomiast na ich zewnętrznych powierzchniach, podobnie jak na powierzchniach zewnętrznie położonych lamell gran, zlokalizowane są CF_1 i reduktaza ferredoksyna-NADP. Natomiast nie budzi wątpliwości problem występowania PS I i PS II w obrębie lamell gran. Inni badacze uważają jednak, iż oba fotoukłady występują zarówno w obrębie gran, jak i lamell stromy. Na przykład Hall i wsp. [54] oraz Nir i Pease [100] stosując metody cytochemiczne wykazali, iż fotoredukcja żelazicyjanku (reakcja katalizowana przez PS II) odbywa się zarówno na powierzchni lamell stromy, jak również lamell gran. Wyniki badań Arntzena i wsp. [9] wykazują także, że na terenie lamell stromy występują kompleksy PS II. Kompleksy te mają być jedynie pozbawione lub uboższe w LHC. Badacze ci wykazali jednak, że w chloroplastach *Pisum sativum* 75-80% aktywności PS II związanych jest z granami.

Struktura błon tylakoidów ma charakter dynamiczny, gdyż np. oświetlenie prowadzi do powstania bardziej „upakowanych” lamell i przez to ich grubość na terenie gran zmniejsza się o około 25% [93]; białka integralne mogą nawet zmieniać swoje położenie [10].

Stan konformacyjny białek i konfiguracyjny błon tylakoidów oraz zależna od tych procesów aktywność fotochemiczna są także regulowane stężeniem jedno- i dwuwartościowych jonów. Na przykład dodanie do zawiesiny chloroplastów 10 mM $MgCl_2$ stymuluje aktywność fotochemiczną i natężenie fosforylacji fotosyntetycznej [52, 81, 126, 151] oraz zwiększa efektywność redukcji $P700^+$ [40]. Z tego wynika również, że kationy dwuwartościowe kontrolują pośrednio lub bezpośrednio przebieg reakcji oksydacyjno-redukcyjnych w chloroplastach i ich sprzężenie z reakcjami transformacji energii. Regulują one również rozdział energii wzbudzenia pomiędzy fotoukłady; w nieobecności Mg^{2+} większa część energii jest przekazywana na PS I [63, 95, 133]. Ponieważ jony Mg^{2+} są wiązane przez LHC, dlatego wielu autorów ([12, 39] i in.) uważa, że regulacja rozdziału energii wzbudzenia odbywa się poprzez zmiany konformacyjne w LHC. Rzeczywiście udało się wykazać, że u licznych mutantów pozbawionych tego kompleksu lub w początkowym etapie rozwoju aparatu fotosyntetycznego (synteza składników LHC odbywa się z pewnym opóźnieniem) kationy dwuwartościowe wywierają mniejszy efekt lub są bez wpływu na rozdział energii wzbudzenia między oba fotoukłady [12]. Problem ten wymaga jednak dalszych badań, gdyż np. Boardman i Thorne [22] stwierdzili, że u mutantu jęczmienia pozbawionego chlorofilu b i LHC kationy dwuwartościowe wpływały na omawiany proces.

Kationy dwuwartościowe (Mg^{2+} , Ca^{2+} , w stężeniu 3 - 4 mM) lub jednowartościowe (w stężeniu 100-200 mM) przyczyniają się do utrzymania struktury granowej chloroplastów [7, 43, 64, 94, 133]. Natomiast kationy jednowartościowe w niskich stężeniach działają antagonistycznie do kationów dwuwartościowych. Proces tworzenia lub zaniku struktury granowej nie musi być jednak związany ze zmianami w rozdziale energii wzbudzenia [139].

ASYMETRIA W STRUKTURZE BŁONY TYLAKOIDU

Błona tylakoidu ma strukturę asymetryczną, która wynika z asymetrycznego rozłożenia w niej poszczególnych składników białkowych. Wiele cennych informacji na ten temat uzyskano dzięki zastosowaniu metod immunologicznych (patrz [42]). Metody te opierają się na obserwacjach, z których wynika, że wprowadzenie specyficznych przeciwciał do zawiesiny błon cytoplazmatycznych wywołuje precypitację błon i inaktywację określonego enzymu tylko wówczas, gdy determinanty

antygenowe znajdują się na powierzchni, gdyż błony cytoplazmatyczne są nieprzepuszczalne dla przeciwciał. W przypadku nienaruszonych tylakoidów reakcja przeciwciało-antygen zajdzie wówczas, gdy determinanty antygenowe znajdują się na zewnętrznych powierzchniach. Natomiast determinanty znajdujące się na wewnętrznych powierzchniach stają się dostępne dla przeciwciał dopiero po „otwarciu” tylakoidu. Stosując metody immunologiczne wykazano, że w przypadku nie rozerwanych tylakoidów precypitacja błon i inaktywacja określonego ogniwa transportu elektronów zachodzi po wprowadzeniu przeciwciał przeciwko ferredoksynie [60], reduktazie ferredoksyna-NADP [19], białkom I układu fotosyntezy [29], LHC [23], substancji redukującej ferredoksynę [110] i P700 [106]. Natomiast po rozbiciu tylakoidów zachodzi również aglutynacja po wprowadzeniu przeciwciał przeciwko cytochromowi f [106], plastocyjaninie [57] oraz wielu białkom wchodzącym w skład II układu fotosyntezy [29, 75]. Wiadomo również, że w napeężonych tylakoidach obserwuje się wyraźniejszą precypitację po wprowadzeniu przeciwciał specyficznych przeciwko plastocyjaninie [123]. Dane te wskazują więc, że takie białka, jak ferredoksyna, składniki PS I, reduktaza ferredoksyna, składniki PS I, reduktaza ferredoksyna-NADP, substancja redukująca ferredoksynę i częściowo LHC znajdują się na zewnętrznej stronie błony tylakoidu, natomiast cytochrom f, wiele białek wchodzących w skład PS II — po stronie wewnętrznej. Wyniki te potwierdzono stosując inne metody badawcze. Na przykład wykazano, że białka znajdujące się na zewnętrznej powierzchni łatwiej ulegają proteolizie przy udziale enzymów proteolitycznych, a zwłaszcza pronazy [8]. Ponadto udowodniono, że wystające reszty tyrozyłowe białek znajdujących się tylko na wewnętrznej powierzchni ulegają jodowaniu (^{125}J) przy udziale laktope-roksydazy i H_2O_2 [8, 146].

Należy jeszcze nadmienić, że również lipidy są prawdopodobnie rozłożone w błonie tylakoidu w sposób asymetryczny; w zewnętrznej warstwie lipidowej ma być względnie więcej mono- digalaktolipidów [92, 101].

SPRZEŻENIE FOSFORYLACJI Z ŁAŃCUCHEM TRANSPORTU ELEKTRONÓW

Od ponad 20 lat wiadomo, że fosforylacja fotosyntetyczna jest sprzężona z łańcuchem transportu elektronów [144]. Z otrzymanych danych doświadczalnych wynikało również jednoznacznie, że istnieją dwa miejsca sprzężenia syntezy ATP z niecyklicznym transportem elektronów. Wykazano bowiem, że w fosforylacji niecyklicznej stosunek $\text{P}/2\text{e}^-$ wynosi najczęściej około 1,3, czyli jest większy od jedności (patrz [109,

142]). Stosując określone inhibitory transportu elektronów (DCMU, DBMIB) oraz odpowiednie egzogenne reduktory i utleniacze udowodniono, że jedno miejsce sprzężenia znajduje się między PQ a plastocyjaniną, a drugie jest związane z układem rozkładającym wodę [102, 145].

Drugi typ fosforylacji fotosyntetycznej, tj. fosforylacja cykliczna, odbywa się tylko przy udziale I układu fotosyntezy i nie jest związana z redukcją NADP^+ i rozkładem wody; sprzężona jest ona z cyklicznym przepływem elektronów przez takie przenośniki, jak P700, ferredoksyna, cytochrom b_6 , PQ, cytochrom f i plastocyjanina (patrz [37]). Według danych Chaina [37] cytochrom f uczestniczy w cyklicznym i niecyklicznym transporcie, gdyż jego redukcja jest modyfikowana zarówno przez DCMU (inhibitor niecyklicznego przepływu elektronów), jak również przez antymycynę A (inhibitor cyklicznego transportu)*. Fosforylacja cykliczna jest stymulowana przez NADPH, co łączy się z powrotem czynnika redukcyjnego z NADPH na ferredoksynę [11]. Miejsce sprzężenia tej fosforylacji znajduje się również między PQ a plastocyjaniną. Przyjmuje się dzisiaj, że ATP powstały w fosforylacji cyklicznej stanowi uzupełniające źródło fosforanu i energii, tzn. tych czynników, które są wykorzystywane w reakcjach ciemnych fotosyntezy. Jak wiadomo dla przyswojenia 1 mola CO_2 w cyklu Calvina-Bensona stosunek molowy ATP do NADPH powinien wynosić 1,5 [18]. Ilości ATP powstałe w fosforylacji niecyklicznej nie pokrywają więc pełnego zapotrzebowania na ten związek w procesie wiązania CO_2 . Ponadto wiadomo, że fosforylacja cykliczna odgrywa większą rolę w początkowym etapie rozwoju aparatu fotosyntetycznego, tzn. wtedy, gdy nie funkcjonuje jeszcze PS II (patrz [155]) i w roślinach oświetlanych wyższymi intensywnościami światła [58].

Czasem występuje również fosforylacja pseudocykliczna, w której synteza ATP sprzężona jest z transportem elektronów od H_2O do O_2 jako końcowego akceptora [44, 46]; redukcja O_2 odbywa się przypuszczalnie poprzez zredukowaną ferredoksynę.

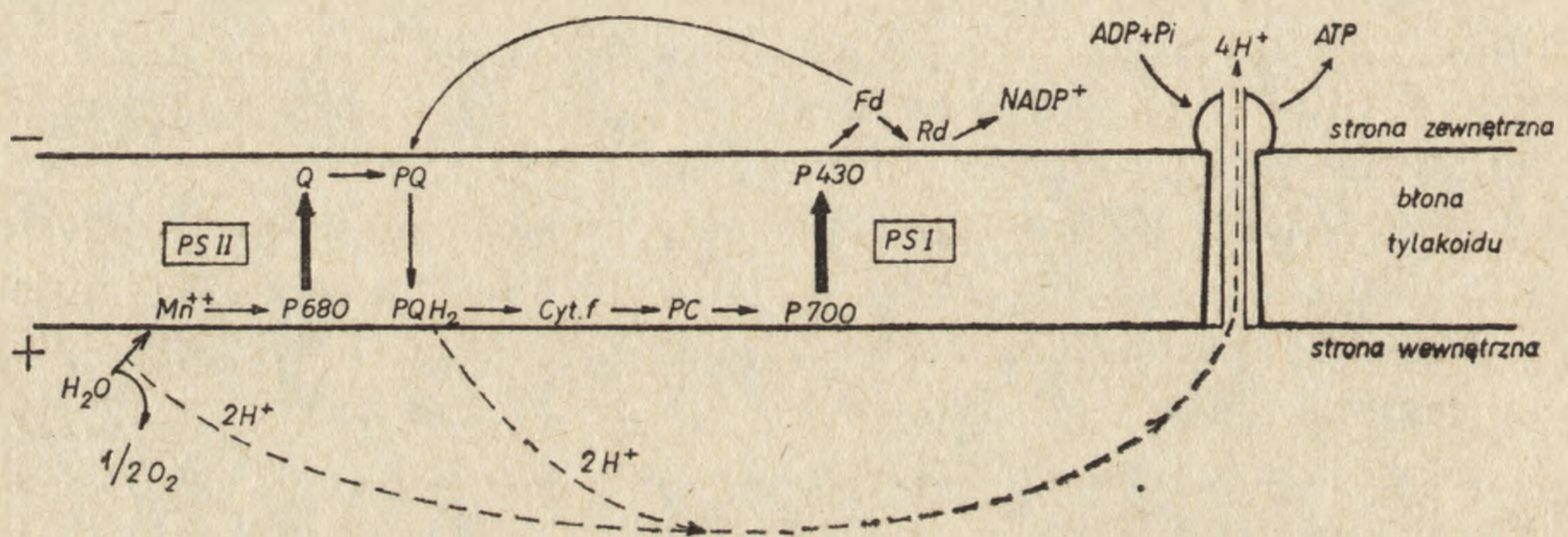
WYTWARZANIE RÓŻNICY POTENCJAŁU ELEKTRYCZNEGO W TYLAKOIDACH

Dzięki asymetrycznej lokalizacji poszczególnych układów enzymatycznych i przenośników elektronów, rozkład wody odbywa się po stronie wewnętrznej błony tylakoidu, a redukcja NADP^+ — po stronie zewnętrznej (ryc. 2). Ze schematu przedstawionego na ryc. 2 wynika również, że zespoły barwników fotosyntetycznych uczestniczą w stymulowa-

* Według danych Haehnela [53] około 25% P700 nie uczestniczy w liniowym transporcie elektronów, lecz tylko w transporcie cyklicznym.

nym światłem transporcie elektronów w stronę powierzchni zewnętrznej, natomiast plastochinon umożliwia przedostanie się elektronów i protonów w kierunku wnętrza tylakoidu. Plastochinon odgrywa więc w tych procesach szczególną rolę.

W chloroplastach roślin wyższych i glonów wykryto kilka różnych typów plastochinonów, przy czym w największych ilościach występuje plastochinon A (patrz [3, 143]) z dziewięcioma resztami izoprenowymi w łańcuchu bocznym. Forma ta pełni istotną rolę w fotosyntezie, natomiast funkcja pozostałych form jest jeszcze nie wyjaśniona. U fotoauto-



Ryc. 2. Schemat przepływu elektronów i protonów w błonach tylakoidów

P680 — centrum reakcji PS II, P700 — centrum reakcji PS I, Q — pierwotny akceptor elektronów w PS II, PQ — plastochinon, cyt. f — cytochrom f, PCy — plastocyjanina, P430 — pierwotny akceptor elektronów w PS I, Fd — ferredoksyna. Według Trebsta i Avrona [144], uproszczony

trofów bakteryjnych zamiast plastochinonu wykryto ubichinon. Należy jeszcze nadmienić, że semichinonowa forma plastochinonu A pełni prawdopodobnie funkcję pierwotnego akceptora elektronów (Q) w fotoukładzie II [74], natomiast forma anionowa ma stanowić ogniwo pośrednie między Q a pulą PQ [24].

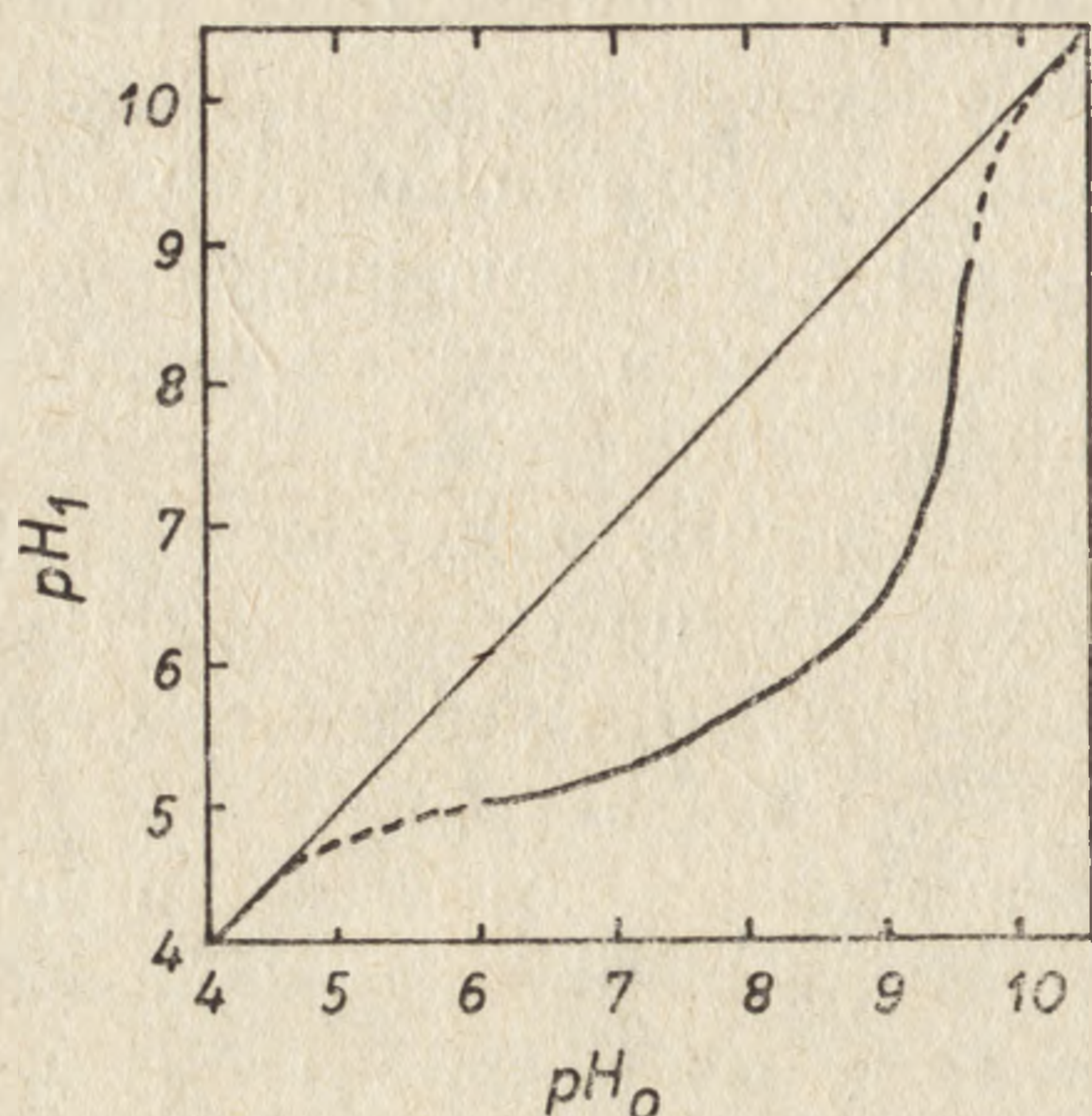
Liczba cząsteczek PQ w zasadniczej puli przewyższa 7-krotnie liczbę cząsteczek innych przenośników elektronów [134]. Wykazano również, że istnieje wspólna pula plastochinonu dla około dziesięciu łańcuchów transportu elektronów, gdyż zablokowanie w około 90% aktywności P680 przez DCMU nie hamuje efektywności redukcji P700 [128, 159]. Plastochinon stanowi więc pewnego rodzaju bufor dla elektronów i protonów między fotoukładami.

Mechanizm transportu wodoru (elektronów i protonów) w kierunku wnętrza tylakoidu nie został jeszcze wyjaśniony. Wiadomo tylko, że PQ jest redukowany w hydrofobowej warstwie znajdującej się bliżej powierzchni zewnętrznej [14], a powstały plastohydrochinon zostaje utleniony po stronie wewnętrznej. Do tej pory nie udało się jednak wyizolo-

wać z chloroplastów odpowiednich dehydrogenaz i reduktaz (patrz [38]). Tiemann i wsp. [141] stwierdzili, że istnieje stechiometryczna zależność między natężeniem pobierania H^+ ze stromy (wyrażona zmianą absorpcji czerwieni krezolowej) a natężeniem redukcji lub utleniania plastochinonu (zmiany absorpcji w pasmie 265 nm) i natężeniem wydzielania protonów do wnętrza tylakoidu (zmiany natężenia fluorescencji 9-aminoakrydyny w pasmie 454 nm). Dane te wskazują, że przynajmniej w przypadku chloroplastów roślin wyższych nie funkcjonuje cykl Q. Według Tiemanna i wsp. [141] teoretycznie należy brać pod uwagę dwa mechanizmy transportu protonów przez błonę: zredukowana cząsteczka PQ wykazywałaby tendencję do przemieszczania się w kierunku wnętrza tylakoidu, natomiast forma utleniona w kierunku odwrotnym, lub atomy wodoru są stopniowo przerzucane na cząsteczki PQ znajdujące się coraz to bliżej powierzchni wewnętrznej. Należy dodać, że choć cząsteczki plastochinonu znajdują się w ruchliwej (płynnej) frakcji lipidowej błony, to jednak ich ruchliwość jest ograniczona ze względu na długi łańcuch poliizoprenowy. Jeśli występuje forma całkowicie trans, to łańcuch ten zajmuje przestrzeń dwóch warstw lipidowych, co zdaniem niektórych badaczy [112] wyklucza możliwość sprawnego przemieszczania się cząsteczek PQ w poprzek błony. Trzeba nadmienić, że istnieją jeszcze inne koncepcje tłumaczące mechanizm przenoszenia elektronów i protonów przez błony tylakoidów przy udziale plastochinonu. Na przykład Trebst [143] sugeruje, iż w błonach tych istnieją kanały, które kontaktują się z wnętrzem i do których wydzielane są bezpośrednio protony. Droga transportu czynnika redukcyjnego byłaby w ten sposób znacznie skrócona.

Jak wynika z przedstawionych rozważań, w strukturach lamellarnych odbywa się stymulowany światłem wektorialny transport elektronów i protonów, co doprowadza najpierw do rozdziału ładunków elektrycznych, a następnie do wytworzenia różnicy potencjału ($\Delta\Psi$) lub (i) gradientu pH (ΔpH) między zewnętrzną a wewnętrzną powierzchnią błony tylakoidu. Są to podstawowe procesy, które warunkują istnienie fosforylacji fotosyntetycznej i od których uzależniony jest w dużym stopniu przebieg pozostałych reakcji związanych z fotosyntezą (patrz [150, 159]).

Na skutek rozkładu cząsteczki wody i transportu dwóch elektronów od H_2O do $NADP^+$ wewnątrz tylakoidu zostaje wzbogacone w cztery protony (ryc. 2), wskutek czego ulega ono zakwaszeniu, a otoczenie — alkalizacji [66, 99]. Przynajmniej w izolowanych chloroplastach różnica ta może osiągać 3 - 3,4 jednostek pH [115, 125, 149]. Nie dochodzi jednak do znacznego zakwaszenia wnętrza tylakoidu, gdyż jest ono zbufurowane (ryc. 3) i przez to około 99,9% H^+ ulega związaniu [70, 114, 150]. Trans-



Ryc. 3. Zależności pH wnętrza tylakoidu (pH_1) od wartości pH buforu zawiesiny (pH_0)

Odcinki linii przerywanej reprezentują wartości uzyskane przez ekstrapolację, linia cienka przedstawia zależność pH_1 od pH_0 w nieoświetlonej zawieszynie chloroplastów przy założeniu, że $pH_0 = pH_1$. Według Walz, Golstein, Avron [150]

portowi protonów towarzyszy zawsze transport niektórych kationów (np. Mg^{2+}) w kierunku odwrotnym. Po oświetleniu chloroplastów wytwarza się jednak zawsze pewna różnica potencjału elektrycznego (wewnątrz tylakoidu jest przewaga ładunków dodatnich), która może osiągać wartość od 10 mV do około 100 mV [51, 117, 160]. Stosując mikroelektrodę szklaną wykazano, że w przypadku chloroplastów *Peperomia metallica* znaczna różnica potencjału elektrycznego pojawia się bezpośrednio po oświetleniu chloroplastów i spada w ciągu kilkadziesiąt ms do około 20% wartości początkowej [149].

Jagendorf i Uride [67] byli pierwszymi, którym udało się w sztuczny sposób wytworzyć gradient pH między zewnętrzną a wewnętrzną stroną błony tylakoidu (przejście kwasowo-zasadowe) i wskazać, że w takich warunkach synteza ATP może odbywać się w ciemności. Hind i wsp. [61] i Krause [76] uzyskali bezpośrednio dowody na to, iż oświetlenie zaadaptowanych do ciemności chloroplastów prowadzi do pobierania H^+ z otoczenia i wydzielania Mg^{2+} . Po wyłączeniu światła odbywa się przepływ tych jonów w kierunku odwrotnym.

Należy jeszcze dodać, że Joliot [69] analizując kinetykę zaniku opóźnionej luminescencji w izolowanych chloroplastach i całych komórkach *Chlorella pyrenoidosa* doszli do wniosku, że w przypadku nie uszkodzonych komórek glonów występuje gradient stężenia protonów również w ciemności, przypuszczalnie dzięki hydrolizie ATP pochodzenia mitochondrialnego.

CHLOROPLASTOWY CZYNNIK SPRZĘGAJĄCY

Jak podano wcześniej powstanie $\Delta\Psi$ lub (i) ΔpH między wnętrzem tylakoidu a jego otoczeniem stanowi warunek niezbędny dla przebiegu

fosforylacji fotosyntetycznej. Fosforylacja fotosyntetyczna odbywa się bezpośrednio przy udziale syntetazy ATP. Enzym ten z jednej strony katalizuje przebieg reakcji: $ADP + P_i = ATP$, a z drugiej strony, uczestniczy w anizotropowym transporcie kationów.

Struktura i właściwości syntetazy ATP (OS ATPazy, ang. oligomycin sensitive ATPazy) były i są przedmiotem licznych badań. Okazało się przy tym, że istnieje duże podobieństwo w strukturze tego enzymu uzyskanego z różnych źródeł (chloroplasty, mitochondria, komórki bakteryjne). Do tej pory względnie dokładnie poznano budowę czynnika sprzęgającego CF_1 , który odpowiada F_1 w mitochondriach, natomiast znacznie mniej wiadomo na temat struktury i funkcji CF_0 *. Potraktowanie trypsyną [147], ditiotreitolem [84] lub podgrzewanie [147] prowadzi do odblokowania w CF_1 in vitro właściwości ATPazy zależnej od jonów wapnia;** w kompleksie takim odbywa się również reakcja wymiany P_i -ATP (patrz [154]). W pewnych warunkach CF_1 połączony z błonami tylakoidów powoduje hydrolizę ATP, co jest związane z przedostaniem się protonów do wnętrza tylakoidów [36] i powrotnym przepływem elektronów [16, 111, 124].

Prowadząc obserwacje w mikroskopie elektronowym wykazano, że CF_1 jest zlokalizowany na zewnętrznej powierzchni błon tylakoidów, skąd można go usunąć przez przemywanie buforem o niskiej sile jonowej [138] lub roztworem EDTA [15, 71]. In vivo czynnik sprzęgający uczestniczy w terminalnym etapie fosforylacji fotosyntetycznej i odpowiedzialny jest za utrzymanie ΔH^+ ; usunięcie CF_1 zwiększa przewodnictwo błony o około 2,5-krotnie [121].

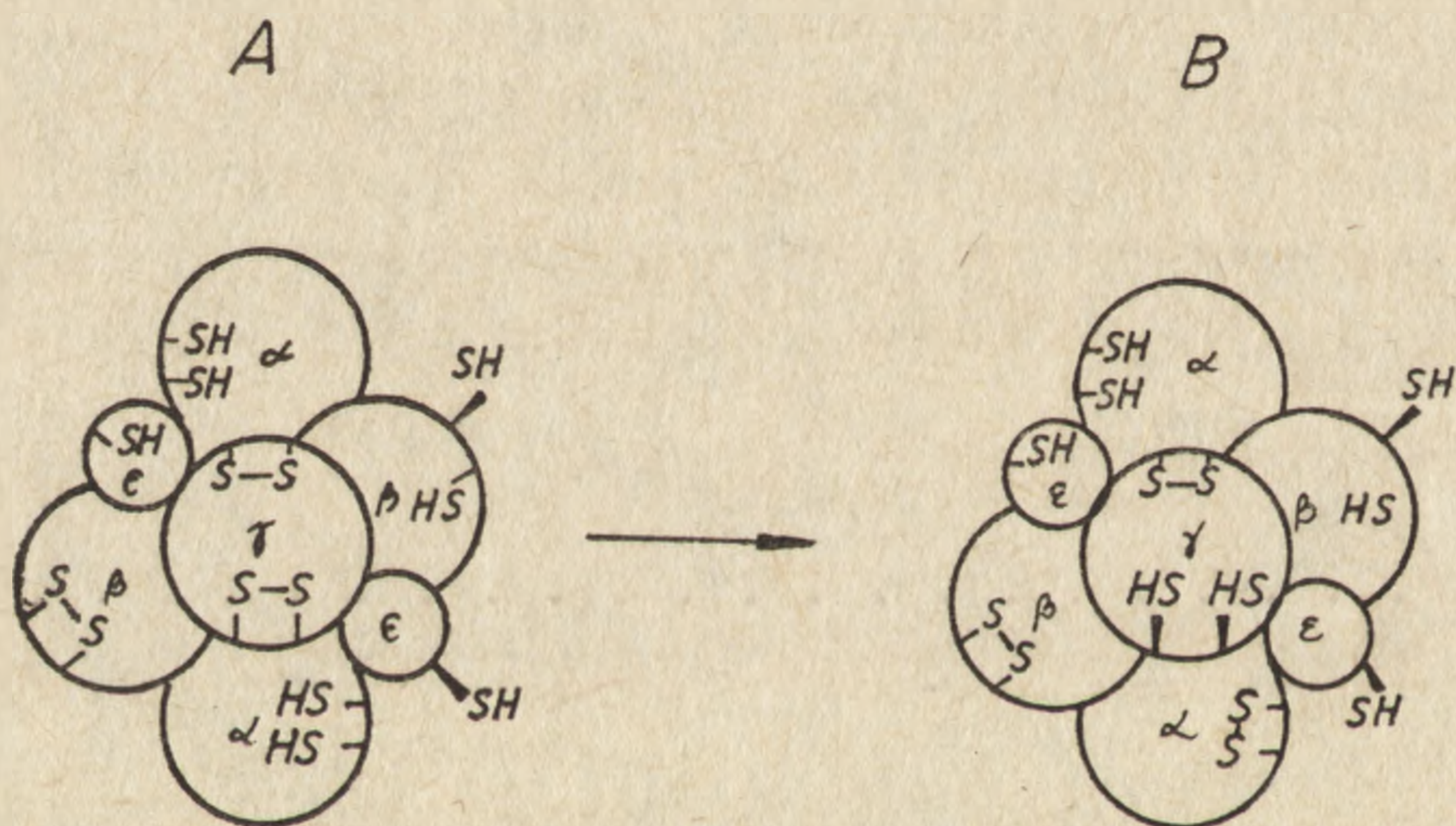
Czynnik sprzęgający z liści szpinaku posiada ciężar cząsteczkowy około 325 000 [45, 103] i występuje w ilości 1 mol na około 860 moli chlorofilu [138]. Z pomiarów rozproszenia promieni X małym kątem wynika, że jest to struktura sferyczna o większej średnicy około 11,5 nm, przy czym stopień uwodnienia wynosi 0,59 mg/g enzymu [103]. W skład CF_1 wchodzi pięć typów podjednostek (α , β , γ , δ , ϵ) o masach cząsteczkowych: 61 000, 57 000, 34 500, 20 900 i 15 700 [21]. Binder i wsp. [21],

* Przepuszczalnie w skład CF_0 wchodzi kilka lipofilnych łańcuchów polipeptydowych, m.in. proteolipid o masie cząsteczkowej około 9000 [97]. CF_0 wykazuje zdolności wiązania protonów oraz wrażliwość na oligomycynę i dicykloheksylokarbodiimid.

** Aktywność ATPazy chromatoforów *Rh. rubrum* zależy od obecności różnych jonów dwuwartościowych, w tym Ca^{2+} i Mg^{2+} , natomiast in vitro aktywność ta jest najczęściej uwarunkowana obecnością Ca^{2+} , ale nie Mg^{2+} [68]. Według Soe i wsp. [131] u tych bakterii występuje specjalny czynnik (m.in. zawierający nienasycone kwasy tłuszczone), który jest odpowiedzialny za przemianę ATPazy zależnej od Ca^{2+} w ATPazę zależną od Mg^{2+} .

porównując zawartość aminokwasów w CF_1 jako całości i w poszczególnych podjednostkach oraz oznaczając ilości błękitu brylantowego wiążącego się z każdą podjednostką, doszli do wniosku, że w skład chloroplastowego czynnika sprzęgającego wchodzi po dwie podjednostki α , β i ϵ oraz po jednej podjednostce γ i δ . Według Bairda i Hammesa [17] podjednostki α i β łączą się wzajemnie ze sobą i z każdą z pozostałych. Obie podjednostki β prawdopodobnie występują obok siebie. Podjednostki γ i ϵ kontaktują się ze sobą, przy czym podjednostki ϵ są rozdzielone przez podjednostki γ . Natomiast podjednostka δ łączy się z podjednostkami α i β .

W skład CF_1 wchodzi około 12 reszt cysteiny; według Nelsona i wsp. [96, 98] dwie z nich znajdują się w podjednostce α , trzy reszty w podjednostce β , sześć reszt w podjednostce γ i jedna reszta w podjednostce ϵ . Natomiast według Bindera i wsp. [21] w podjednostkach α , β , γ ,



Ryc. 4. Rozmieszczenie grup -SH na podjednostkach CF_1

A — przed podgrzaniem, B — po podgrzaniu do temperatury $63^\circ C$. Według Ravizzini, Andreo i Vallejos [108]

δ , ϵ występują odpowiednio 2, 2, 3, 1 i 1 reszty cysteiny. Ostatnio Ravizzini i wsp. [108] przytoczyli dane, z których wynika, że CF_1 nie wykazujący aktywności ATPazy posiada osiem grup -SH: cztery w podjednostce α , dwie w podjednostce β i dwie w podjednostce ϵ . Natomiast po podgrzaniu (CF_1 wykazuje aktywność ATPazy) występują po dwie grupy -SH w podjednostkach α , β , γ , ϵ (ryc. 4). Próbowano również określić funkcję poszczególnych podjednostek. Inkubacja w roztworze trypsyny prowadzi do usunięcia podjednostek δ , γ , ϵ . Nienaruszona część CF_1 wykazuje jednak zdolności do hydrolizy ATP, ale nie wiąże się z błoną [138]. Wiązanie CF_1 z błoną odbywa się za pośrednictwem podjednostki δ [162]. Reakcja przeciwciał z podjednostkami α lub γ prowadziła do zahamowania fosforylacji i aktywności ATPazy zależnej od

Mg^{2+} [96]. Według danych tych samych badaczy przeciwciała przeciwko największej podjednostce hamowały także stymulowany przez ATP przepływ protonów w chloroplastach. Najmniejsza podjednostka pełni funkcję inhibitora ATPazy [41, 98] i dlatego uważa się, iż może ona regulować aktywność kompleksu ATPazy. Wyizolowana podjednostka ϵ ma postać kuli o średnicy około 3,2 nm [122].

Z czynnikami sprzęgającymi związana jest zawsze pewna liczba cząsteczek ADP i ATP. Wiele danych wskazuje [30, 140, 148] na istnienie dwóch typów miejsc wiązania nukleotydów adenilowych: w jednym z nich nukleotydy są związane w sposób silny (ale nie kowalencyjny), natomiast w drugim — względnie słabiej. Carlier i Hammes [34] stwierdzili, że po usunięciu słabiej związanych nukleotydów na jeden kompleks CF_1 przypada jedna cząsteczka ADP, która ulegała wymianie z ATP środowiska; całkowita wymiana ADP na $MgATP$ lub $CaATP$ zachodziła w ciągu 10 min, podczas gdy połowiczny okres wymiany na ADP środowiska wynosił 4 godziny. Związany ATP ulegał łatwo hydrolizie na ADP i P_i . Cantley i Hammes [30] obserwowali wiązanie ADP, ϵ ADP, AMP-PNP i ϵ AMP-PNP do dwóch, ich zdaniem, identycznych miejsc na CF_1 . Uwalnianie nukleotydów zachodziło jednak zbyt wolno, aby mogła odbywać się hydroliza ATP. Sugerowali oni, że nukleotydy te mogą pełnić funkcje regulacyjne; wiązanie bowiem w tych miejscach ADP hamowało aktywność enzymu, natomiast wiązanie ATP aktywowało ATPazę. Ogrzanie preparatu spowodowało ujawnienie się dodatkowych miejsc wiążących nukleotydy; jedno z nich wiązało silnie AMP-PNP i według tych badaczy mogło ono pełnić funkcję katalityczną. Należy dodać, że również wyniki innych badań (np. [148]) wskazują na istnienie więcej niż dwóch miejsc, w których odbywało się wiązanie ADP, ϵ ADP, AMP-PNP, oraz ϵ AMP-PNP. Próbowano również zlokalizować miejsca wiązania nukleotydów na poszczególnych podjednostkach. Na przykład Carlier i wsp. [35] wbudowali arylazydo-ATP do miejsca silnie wiążącego ADP oraz arylazydo-ATP do miejsca słabo wiążącego ADP. Stosując następnie SDS i elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS wykazano, że arylazydo-ADP jest odnajdywany w podjednostce β , natomiast arylazydo-ADP — w podjednostkach α i β . Wyniki te zdają się świadczyć, że miejsca silnie wiążące nukleotydy znajdują się na podjednostkach β . Pozostałe dwa miejsca zlokalizowane są bądź na podjednostkach α i β , bądź na ich styku.

W chloroplastowym czynniku sprzęgającym znajduje się również kilka miejsc wiążących specyficznym pewne substancje, które często mają charakter potencjalnych inhibitorów ATPazy. Do takich związków należy NBD, który zostaje przyłączony do jednej z dwóch reszt tyrozyny w podjednostce β [41]. Kwercecytyna reaguje prawdopodobnie z podjedno-

stkami α i β [41], a imid kwasu N-etylomaleinowego — z podjednostką γ [83]. Lokalizację tych miejsc oraz ich wzajemne odległości próbowano określić przez pomiar rezonansowego przeniesienia energii [17, 31 - 33, 62].

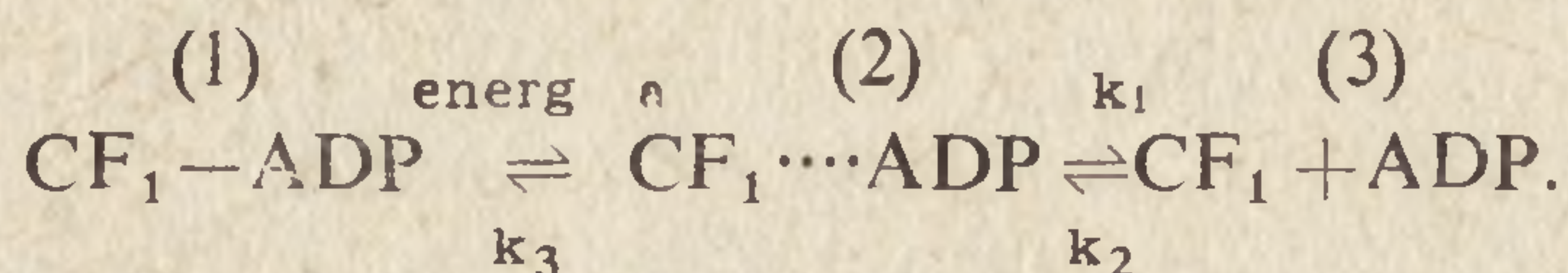
Stosując różne metody wykazano, że energizacja błon wpływa na stan konformacyjny białek wchodzących w skład czynników sprzęgających [65]. Zmiany te z kolei wywołują określone zmiany właściwości czynników sprzęgających. Na przykład stwierdzono, że oświetlenie zawiesiny chloroplastów w wodzie trytowanej prowadzi do intensywnej wymiany wodoru na tryt w CF_1 [118, 119]. Zjawisko to wytłumaczono w ten sposób, że po oświetleniu chloroplastów zachodzą zmiany konformacyjne w CF_1 , w wyniku czego zostają odsłonięte grupy zawierające łatwo wymienne atomy wodoru. Podobne zmiany konformacyjne wywołano zmieniając środowisko zasadowe na kwaśne. Natomiast wprowadzenie do mieszaniny reakcyjnej ADP i Pi lub inhibitorów fosforylacji prowadzi do zahamowania tego procesu [119].

Po oświetleniu tylakoidów zachodzi prawdopodobnie również odsłonięcie grup sulfhydrylowych na podjednostkach γ ; odsłonięte grupy reagują z imidem kwasu N-etylomaleinowego doprowadzając w konsekwencji do częściowego zahamowania fotofosforylacji [83]. Weiss i McCarty [152] wykazali, że diimid kwasu o-fenylmaleinowego wchodzi w reakcję z grupami $-SH$ podjednostki γ w ciemności i na świetle, przy czym tylko reakcja z grupami odsłoniętymi przez oświetlenie prowadzi do zahamowania fotofosforylacji.

Oświetlenie wywołuje również zmiany w położeniu reszt tyrozylo- wych w podjednostkach α , β i γ [101]. Ponadto wiadomo, że oświetlenie tylakoidów lub zmiana środowiska z zasadowego na kwaśne indukują wymianę nukleotydów z nukleotydami środowiska na podjednostkach α i β [50, 79, 80, 135, 136]. Wykazano również, że tej wymianie podlegają zarówno ADP, jak i ATP; jony Mg^{2+} znacznie stymulowały wiązanie tego ostatniego [50, 135, 136]. W mechanizmie wiązania ADP wyróżniono dwie odwracalne reakcje i trzy związane z nimi stany konformacyjne CF_1 :

1. stabilny kompleks CF_1 -ADP,
2. niestabilny, przejściowy kompleks CF_1 -ADP (cząsteczka ADP jest luźno związana z CF_1),
3. niestabilny zdysocjowany kompleks (miejsce wiązania ADP jest wolne).

Te stany konformacyjne mogą przechodzić wzajemnie w siebie, przy czym przejście stanu 1 w stan 2 wymaga wkładu energii pochodzącej z fotosyntetycznego transportu elektronów lub gradientu pH:



Niezależnie od obecności ADP lub ATP w mieszaninie reakcyjnej CF_1 w oświetlonych tylakoidach zawiera jedną cząsteczkę ADP, co może sugerować, że związany ATP ulega hydrolizie w tych warunkach; miejsce wiązania ATP należałoby więc traktować jako miejsce katalityczne [80]. Również analogiczna zależność wymiany nukleotydów w miejscu wiązania ATP i fosforylacji od intensywności światła, stężenia jonów wodorowych, stężenia inhibitorów może sugerować o ścisłym wzajemnym powiązaniu tych dwóch procesów [137]. Należy jednak dodać, iż wymiana nukleotydów jest od 50- do 100-krotnie wolniejsza niż natężenie fotofosforylacji [135]. Procesy te różnią się między sobą specyficznością względem nukleotydów: GDP ulega znacznie wolniejszej wymianie niż ADP, natomiast natężenie fosforylacji obu nukleotydów jest podobne. Ponadto wykazano, że nukleotydy związane ulegają o wiele wolniej fosforylacji niż łatwo wymienialne z nukleotydami znajdującymi się w środowisku [127]. Z tych też powodów należy być bardzo ostrożnym w utożsamianiu miejsca silnie wiążącego nukleotydy z miejscem katalitycznym.

POGLĄDY NA MECHANIZM FOSFORYLACJI FOTOSYNTETYCZNEJ

Dotychczas otrzymane wyniki sugerują, iż sposób wytwarzania ATP w chloroplastach pod wieloma względami jest podobny do mechanizmu syntezy ATP w mitochondriach i komórkach bakteryjnych. Ponieważ mechanizm ten nie został jeszcze poznany, dlatego naszym zdaniem jest niecelowe dokładne opisywanie różnych hipotez. Należy zaznaczyć jedynie, że spośród kilku powszechnie znanych hipotez tłumaczących mechanizm fosforylacji oksydacyjnej i fotosyntetycznej [25, 26, 50, 88 - 90, 157, 158] najwięcej zwolenników posiada chemiosmotyczna teoria Mitchella [88 - 90]. Teorię tę traktuje się jednak wciąż jako hipotezę roboczą (patrz [72]).

Zgodnie z chemiosmotyczną teorią istotne znaczenie w syntezie ATP przy udziale syntetazy ATP ma powstanie różnicy potencjału elektrycznego między zewnętrzną a wewnętrzną stroną błony tylakoidu. Wartość w ten sposób uwolnionej energii ($\Delta G'$) można wyrazić równaniem

$$G = \Delta\Psi + \Delta\text{pH},$$

gdzie $\Delta\Psi$ jest różnicą wartości potencjału elektrycznego. Można również stwierdzić, że wielkość elektrochemicznego gradientu protonów ($\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$)

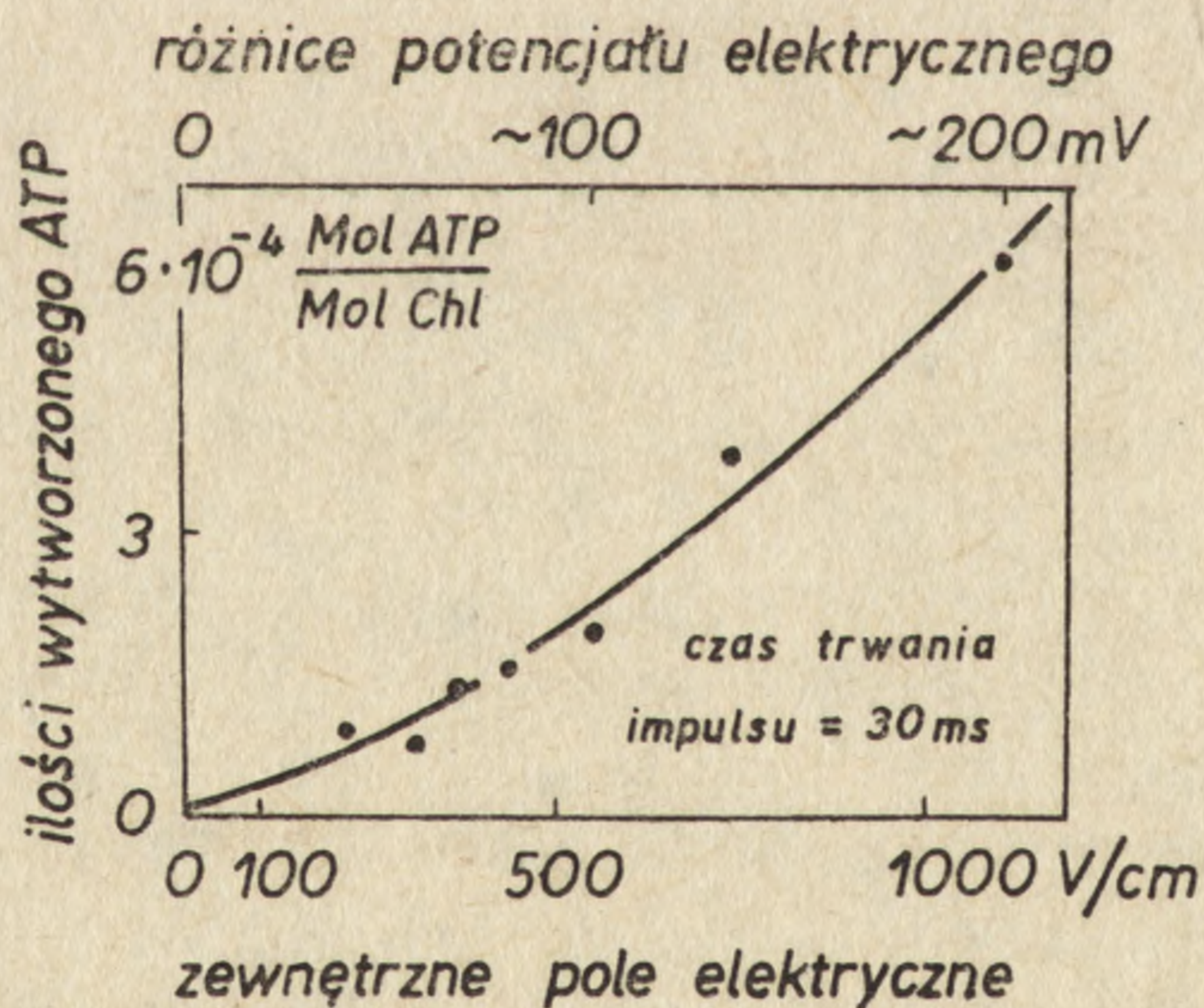
lub siły poruszającej protony (Δ_p albo PMF, ang. proton motive force) jest zgodna z wyrażeniem:

$$\Delta_p = \Delta\tilde{\mu}\Delta_{H^+} = \Delta\Psi - 2,303 \frac{RT}{F} \Delta\text{pH},$$

gdzie R — stała gazowa, T — temperatura w skali Kalvina, F — stała Faradaya.

Wyrażenie $2,303 RT/F$ posiada wartość 59 mV w 298 K.

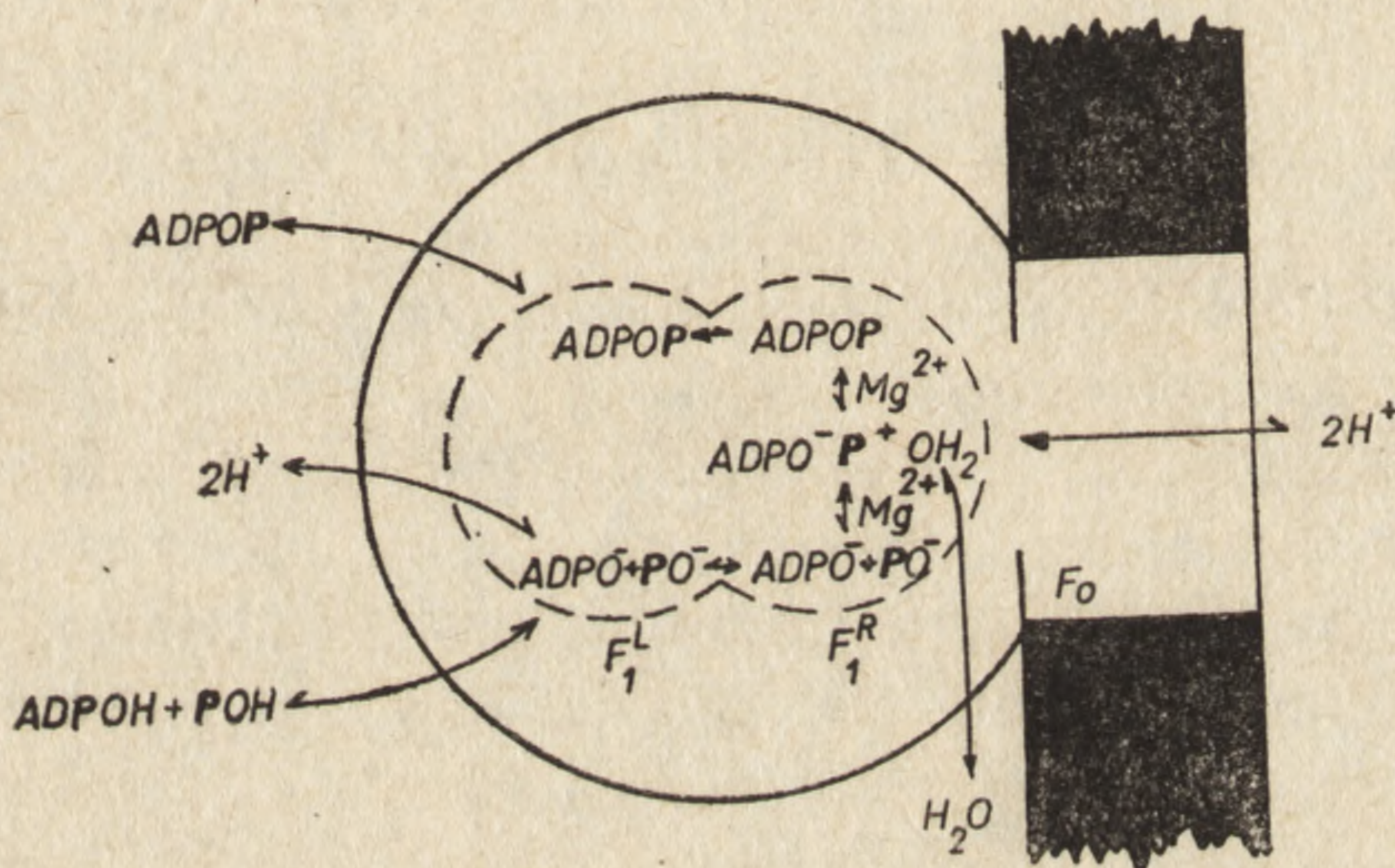
PMF jest odpowiedzialna za syntezę ATP w izolowanych chloroplastach, natomiast niewiele wiadomo na temat tej siły w układzie *in vivo*. W izolowanych chloroplastach PMF posiada na tyle duże wartości, aby pokryć zapotrzebowanie energetyczne fosforylacji fotosyntetycznej ($\Delta G'$) przebiegającej w tych warunkach [109]; jak wiadomo zapotrzebowanie to wynosi od $-8,2$ kcal/mol do około $-11,5$ kcal/mol. *In vivo* $\Delta\Psi$ jest indukowane światłem, natomiast w izolowanych chloroplastach synteza ATP może przebiegać nie tylko pod wpływem światła, ale również w ciemności po wytworzeniu gradientu pH (ryc. 5) [67] lub przyłożeniu zewnętrznego pola elektrycznego [161] w poprzek błony. Indukowane przyłożeniem zewnętrznego pola elektrycznego powstawanie ATP jest



Ryc. 5. Ilości wytworzonego ATP w zaciemnionych chloroplastach jako funkcja przyłożonego zewnętrznego pola elektrycznego. Według Gräber, Schlodder, Witt [50]

niewrażliwe na DCMU, co wskazuje na niezależność tego procesu od transportu elektronów, natomiast jest ono hamowane przez inhibitory aktywności ATPazy (np. florydzyne). Należy jednak podkreślić, że przyłożenie zewnętrznego pola elektrycznego inicjuje nie tylko syntezę ATP w ciemności, ale również wywołuje zmiany konformacyjne w CF_1 . Zdaniem Witta [159] indukowane zmiany konformacyjne w kompleksie syntetazy ATP umożliwiają wydostanie się protonów z wnętrza tylakoidu do stromy.

Końcowy etap syntezy ATP odbywa się przy udziale CF_1 . Według hipotezy Mitchella $\Delta\Psi$ jest wykorzystywana bezpośrednio do dehydratacji ADP i Pi w centrach aktywnych znajdujących się w obrębie CF_1 , podobnie zresztą jak w mitochondrialnym F_1 . Zdaniem Mitchella [90, 91] nieorganiczny fosforan (POH) i ADP (ADPOH) przy udziale ATPazy działającej w sposób odwracalny ulegają najpierw dehydratacji przechodząc odpowiednio w PO^- i w takiej postaci dostają się do centrum aktywnego, gdzie PO^- ulega protonacji najpierw do POH, a następnie do POH_2 i wówczas zachodzi reakcja z $ADPO^-$, w wyniku czego powstaje ATP (ryc. 6). W procesie tym uczestniczą H^+ , które są transportowane z wnętrza tylakoidów poprzez CF_0 . Jony $ADPO^-$ i PO^- dostają się do centrum aktywnego przypuszczalnie w postaci soli z Mg^{2+} lub K^+ .



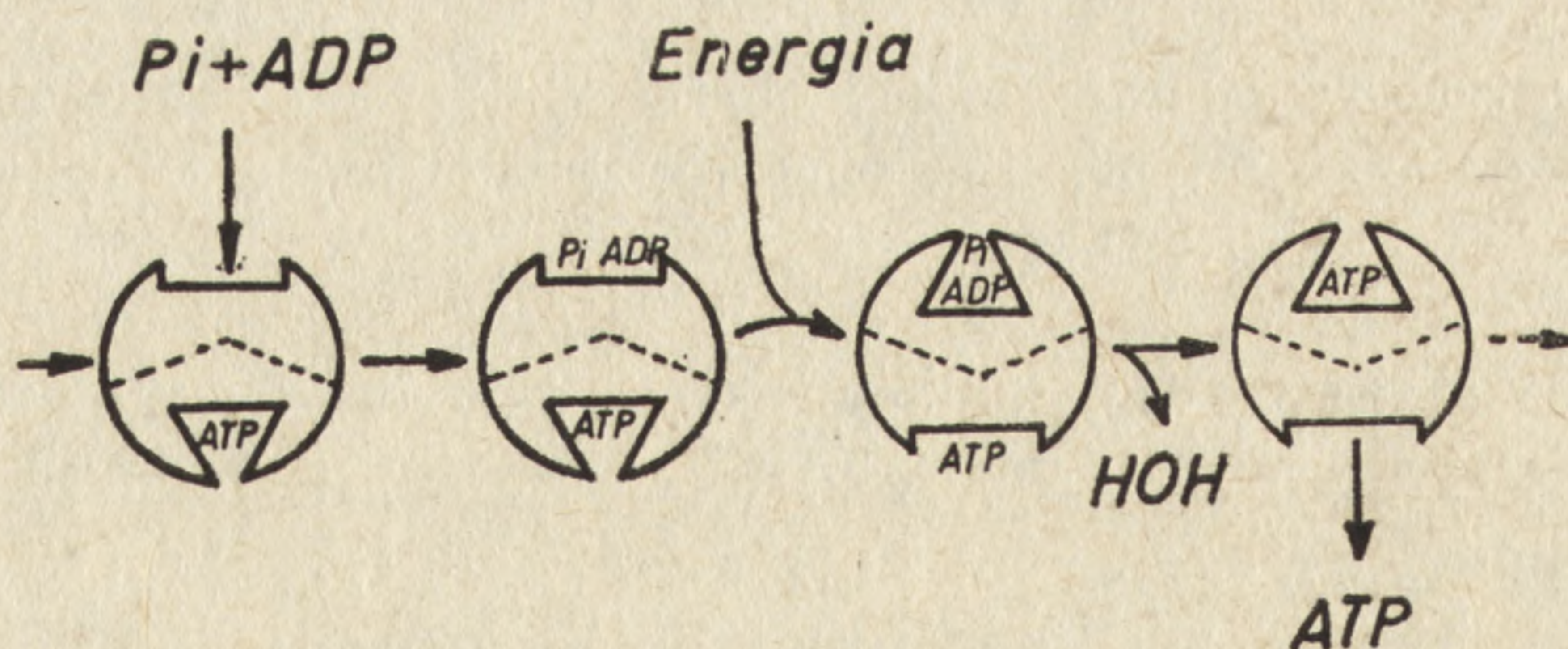
Ryc. 6. Końcowy etap fosforylacji oksydacyjnej według Mitchella [91]

F_1^L , R_1^R — dwa stany konformacyjne kompleksów substrat — F_1 w miejscu aktywnym.
Inne szczegóły podane w tekście

Według Slatera i wsp. [56] energia jest zużywana nie bezpośrednio do syntezy ATP z ADP i Pi, lecz do wywołania zmian konformacyjnych w czynniku sprzęgającym i uwolnienia nukleotydów.

Boyer [25, 26] uważa, że transport elektronów indukuje w białkach zmiany konformacyjne, które są stopniowo przekazywane na CF_1 , gdzie dochodzi w konsekwencji do uwolnienia mocno związanego ATP. Zmiany konformacyjne lub (i) rozdział ładunku mają być odpowiedzialne za wytwarzanie transmembranowego potencjału lub (i) gradientu stężenia H^+ . Boyer [26] zakłada istnienie tzw. zmieniających się miejsc katalitycznych: zmiany konformacyjne w CF_1 prowadzą do osłabienia wiązania ATP w jednym miejscu katalitycznym i zwiększenia powinowactwa ADP i Pi do drugiego miejsca katalitycznego (ryc. 7), gdzie ma zachodzić synteza ATP.

Jednym z wielu zagadnień, na których skupia się uwaga licznej grupy badaczy, jest rodzaj pierwotnego akceptora fosforanu. Roy i Moudrianakis [116] wysunęli przypuszczenie, że tym akceptorem jest AMP, a nie ADP, gdyż inkubując izolowane chloroplasty z izotopem fosforanu (^{32}P), piętno radioaktywne odnajdywano w pozycji β zarówno ADP, jak ATP. Jednakże zmieniając środowisko chloroplastów z zasadowego na kwaśne [130] lub stosując oświetlenie światłem błyskowym [55] wykazano, że wbudowywanie piętna radioaktywnego do ADP i ATP w pozycje β było o wiele wolniejsze od procesu fotosyntetycznej fosforylacji i nie obserwowano fosforylacji egzogenego AMP. Według danych Smitha i wsp. [130] pierwotnym nukleotydem powstałym na skutek wiązania ^{32}P był ATP z piętnem radioaktywnym w pozycji γ . Natomiast Harris i Slater [56] wskazują na możliwość powstawania silnie związanego ATP z ADP, będącego w kompleksie z ATPazą i P_i ze środowiska. Z drugiej strony, z danych przedstawionych przez Rosinga i wsp. [113] wynikałoby, iż ^{32}P ATP powstaje w wyniku fosforylacji ADP, który znajduje się w środowisku. Natomiast Beyeler i Bachofen [20] badając kinetykę wbudowywania ^{32}P do różnych nukleotydów przez cząstki subchloroplastowe ze szpinaku wykryli intensywne wbudowywanie piętna radioaktywnego do ADP i przeto sugerują, że w początkowym etapie zachodzi fosforylacja AMP do ADP; reakcja ta była niezależna od światła. Wyjaśnienie natury pierwotnego akceptora fosforanu nieorganicznego, podobnie jak inne szczegóły mechanizmu fosforylacji wymagają jeszcze wykonania wielu dalszych badań.



Ryc. 7. Model zmieniających się miejsc katalitycznych w czynniku sprzęgającym i synteza ATP. Według Boyera [27]

Należy jeszcze dodać, że zdaniem Williamsa [157, 158] protony w postaci H_3O^+ są transportowane na drodze kontrolowanej dyfuzji przez kanały w warstwie lipidowej. Transport ten jest niezależny od ΔpH , natomiast zależy od ΔG grup wiążących protony w obrębie błony. Proces fosforylacji według hipotezy Mitchella wymaga istnienia pęcherzykowatych struktur błoniastych, aby utrzymać niezbędną do tego procesu

ΔH^+ lub $\Delta \Psi$, natomiast według Williamsa gradient stężenia H^+ wytwarza się w obrębie błony, dlatego struktury pęcherzykowate nie są konieczne dla sprawnie przebiegającej fosforylacji.

LITERATURA

- [1] ALLEN C. F., HIRAYAMA O., GOOD P., Lipid composition of photosynthetic systems, *Biochemistry of Chloroplasts*, red. Goodwin T. W., t. 1, 195 - 200, Academic Press, London 1966.
- [2] ALLEN C. F., TROSPER T., PARK R. B., Chlorophyll, glycerolipid and protein ratios in spinach chloroplast grana and stroma lamellae, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **48**: 907 - 913, 1972.
- [3] AMESZ J., The function of plastoquinone in photosynthetic electron transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **301**: 35 - 51, 1973.
- [4] ANDERSON J. M., The molecular organization of chloroplast thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta*, **416**: 191 - 235, 1975.
- [5] — P700 content and polypeptide profile of chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta*, **591**: 113 - 126, 1980.
- [6] ANDERSON L. E., MANABE K., Disulfide-linked peptides in the chloroplast thylakoid membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **579**: 1 - 9, 1979.
- [7] ANDERSON J. M., VERNON L. P., Digitonin incubation of spinach chloroplasts in tris (hydroxymethyl) methylglycine solutions of varying ionic strengths, *Biochim. Biophys. Acta*, **143**: 363 - 376, 1967.
- [8] APEL K., MILLER K. R., BOGORAD L., MILLER G. J., *Chloroplast membranes of the green alga Acetabularia mediterranea*. II. Topography of the chloroplast membranes, *J. Cell Biol.*, **71**: 876 - 893, 1976.
- [9] ARMOND P. A., ARNTZEN C. J., Localization and characterization of photosystem II in grana and stroma lamellae, *Plant Physiol.*, **59**: 398 - 404, 1977.
- [10] ARMOND P. A., STAEHELIN L. A., Lateral and vertical displacement of integral membrane proteins during lipid phase transition in *Anacystis nidulans*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**: 1901 - 1905, 1979.
- [11] ARNON D. J., CHAIN R. K., Regulation of ferredoxin-catalysed photosynthetic phosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 4961 - 4965, 1975.
- [12] ARNTZEN C. J., ARMOND P. A., BRIANTAIS J. M., BURKE J. J., NOVITZKY W. P., Dynamic interactions among structural components of the chloroplast membrane, *Brookhaven Sym. Biol.*, **28**: 316 - 337, 1976.
- [13] ARNTZEN C. J., DILLEY R. A., CRANE F. L., A comparison of chloroplast membrane surfaces visualized by freeze-etch and negative staining techniques; and ultrastructural characterization of membrane fractions obtained from digitonin-treated spinach chloroplasts, *J. Cell Biol.*, **43**: 16 - 31, 1969.
- [14] AUSLÄNDER W., JUNGE W., The electric generator in the photosynthesis of green plants. II. Kinetic correlation between protolytic reactions and redox reactions, *Biochim. Biophys. Acta*, **357**: 285 - 298, 1974.
- [15] AVRON M., A coupling factor in photophosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **77**: 699 - 702, 1963.
- [16] AVRON M., SCHREIBER U., Proton gradients as possible intermediary energy transducers during ATP-driven reverse electron flow in chloroplasts, *FEBS Letters*, **77**: 1 - 6, 1977.

- [17] BAIRD B. A., HAMMES G. G., Structure of oxidative and photophosphorylation coupling factor complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **549**: 31 - 35, 1979.
- [18] BASSHAM J. A., CALVIN M., *Udział węgla w fotosyntezie*, PWRiL, Warszawa 1962.
- [19] BERZBORN R. J., Demonstration of ferredoxin — NADP⁺ reductase on the surface of the lamellar system of chloroplasts by antibodies, [w] *Progress in Photosynthesis Research*, red. Metzner H., t. 1, str. 106 - 114, International Union of Biological Sciences, Tübingen 1969.
- [20] BEYELER W., BACHOFEN R., Initial events of light-dependent ATP synthesis in spinach subchloroplast particles, *Eur. J. Biochem.*, **88**: 61 - 67, 1978.
- [21] BINDER A., JAGENDORF A., NGO E., Isolation and composition of the subunits of spinach chloroplast coupling factor protein, *J. Biol. Chem.*, **253**: 3094 - 3100, 1978.
- [22] BOARDMAN N. K., THORNE S. W., Cation effects on light-induced chlorophyll *a* fluorescence in chloroplasts lacking both chlorophyll *b* and chlorophyll-protein complex II, *Plant Science Letters*, **7**: 219 - 224, 1976.
- [23] BOSE S., BURKE J. J., ARNTZEN C. J., Cation-induced microstructural changes in chloroplast membranes: effects on photosystem II activity, [w] *Bioenergetics of Membranes*, red. Packer L. P., Papageorgiou G. C., Trebst A., str. 245 - 256, Elsevier, Amsterdam 1977.
- [24] BOUGES-BOCQUET B., Electron transfer between the two photosystems in spinach chloroplast, *Biochim. Biophys. Acta*, **314**: 250 - 256, 1973.
- [25] BOYER P. D., Carboxyl activation as a possible common reaction in substrate-level and oxidative phosphorylation and in muscle contraction, [w] *Oxidases and Related Redox Systems*, red. King T. E., Mason H. S., Morrison M., str. 994 - 1008, Wiley, New York 1965.
- [26] BOYER P. D., Conformational coupling in oxidative phosphorylation and photophosphorylation, *Trends in Biochem. Sci.*, **2**: 38 - 41, 1977.
- [27] BOYER P. D., CHANCE B., ERNSTER L., MITCHELL P., RACKER E., SLATER E. C., Oxidative phosphorylation and photophosphorylation, *Ann. Rev. Biochem.*, **46**: 955 - 1026, 1977.
- [28] BRANTON D., Fracture faces of frozen membranes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**: 1048 - 1056, 1966.
- [29] BRIANTAIS J. M., PICAUD M., Immunological evidences for a localization of system I on the outside face and of system II on the inside face of the chloroplast lamellae, *FEBS Letters*, **20**: 100 - 104, 1972.
- [30] CANTLEY L. C., HAMMES G. G., Characterization of nucleotide binding sites on chloroplast coupling factor 1, *Biochemistry*, **14**: 2968 - 2975, 1975.
- [31] — Fluorescence energy transfer between ligand binding sites on chloroplast coupling factor 1, *Biochemistry*, **14**: 2976 - 2981, 1975.
- [32] — Investigation of quercetin binding sites on chloroplast coupling factor 1, *Biochemistry*, **15**: 1 - 8, 1976.
- [33] — Characterization of sulfhydryl groups on chloroplast coupling factor 1 exposed by heat activation, *Biochemistry*, **15**: 9 - 14, 1976.
- [34] CARLIER M. F., HAMMES G. G., Interaction of nucleotides with chloroplast coupling factor 1, *Biochemistry*, **18**: 3446 - 3451, 1979.
- [35] CARLIER M. F., HOLOWKA D. A., HAMMES G. G., Interaction of photoreactive and fluorescent nucleotides with chloroplast coupling factor 1, *Biochemistry*, **18**: 3452 - 3457, 1979.

- [36] CARMELI C., Proton translocation induced by ATPase activity in chloroplasts, *FEBS Letters*, **7**: 297 - 300, 1970.
- [37] CHAIN R. K., The role of cytochrome *f* in ferredoxin-dependent electron-transport reactions in spinach chloroplasts, *FEBS Letters*, **105**: 365 - 369, 1979.
- [38] CRANE F. L., Hydroquinone dehydrogenases, *Ann. Rev. Biochem.*, **46**: 439 - 469, 1977.
- [39] DAVIS D. J., GROSS E. L., Protein-protein interactions of lightharvesting pigment protein from spinach chloroplasts. I. Ca⁺ binding and its relation to protein association, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**: 577 - 567, 1975.
- [40] DAVIS D. J., KROGMANN D. W., SAN PIETRO A., Electron donation to photosystem I, *Plant Physiol.*, **65**: 697 - 702, 1980.
- [41] DETERS D. W., RACKER E., NELSON N., NELSON H., Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XV. Approaches to the active site of coupling factor 1, *J. Biol. Chem.* **250**: 1041 - 1047, 1975.
- [42] DROBA M., STRZAŁKA K., Zastosowanie metod immunologicznych do badań struktury błon tylakoidów, *Post. Biochem.*, **22**: 511 - 525, 1976.
- [43] DUNIEC J. T., SCULLEY M. J., THORNE S. W., An analysis of the effect of mono- and di-valent cations on the forces between charged lipid membranes with special reference to the grana thylakoid of chloroplasts, *J. Theor. Biol.*, **79**: 473 - 484, 1979.
- [44] EGNEUS H., HEBER U., MATTHIESSEN U., KIRK M. R., Reduction of oxygen by the electron transport chain of chloroplasts during assimilation of carbon dioxide, *Biochim. Biophys. Acta*, **408**: 252 - 268, 1975.
- [45] FARRON F., Isolation and properties of a chloroplast coupling factor and heat-activated adenosine triphosphatase, *Biochemistry*, **9**: 3823 - 3828, 1970.
- [46] FORTI G., GEROLA P., Inhibition of photosynthesis by azide and cyanide and the role of oxygen in photosynthesis, *Plant Physiol.*, **59**: 859 - 862, 1977.
- [47] FRĄCKOWIAK D., Fizyczne badania fotosyntezy, *Post. Biochem.*, **13**: 335 - 357, 1967.
- [48] FRĄCKOWIAK B., Struktura i funkcja błon chloroplastów, *Post. Biochem.*, **17**: 235 - 248, 1971.
- [49] FRĄCKOWIAK D., FIKSIŃSKI K., Przekazywanie energii w jednostkach fotosyntetycznych, *Post. Biochem.*, **22**: 439 - 465, 1976.
- [50] GRÄBER P., SCHLODDER E., WITT H. T., Conformational change of the chloroplast ATPase induced by a transmembrane electric field and its correlation to phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **461**: 426 - 440, 1977.
- [51] GRÄBER P., WITT H. T., On the extent of the electrical potential across the thylakoid membrane induced by continuous light in *Chlorella cells*, *Biochim. Biophys. Acta*, **333**: 389 - 392, 1974.
- [52] GROSS E., DILLEY R. A., SAN PIETRO A., Control of electron flow in chloroplasts by cations, *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**: 450 - 462, 1969.
- [53] HAEHNEL W., Electron transport between plastoquinone and chlorophyll *a*₁ in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **305**: 618 - 631, 1973.
- [54] HALL D. O., EDGE H., KALINA M., The site of ferricyanide photoreduction in the lamellae of isolated spinach chloroplasts: a cytochemical study, *J. Cell Sci.*, **9**: 289 - 303, 1971.
- [55] HARRIS D. A., CROFTS A. R., The initial stages of photophosphorylation studies using excitation by saturating short flashes of light, *Biochim. Biophys. Acta*, **502**: 87 - 102, 1978.

- [56] HARRIS D. A., SLATER E. C., Tightly bound nucleotides of the energy transducing ATPase of chloroplasts and their role in photophosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**: 335 - 348, 1975.
- [57] HAUSKA G. A., McCARTY R. E., BERZBORN R. J., RACKER E., Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation VII. The function of plastocyanin and its interactions with a specific antibody, *J. Biol. Chem.* **246**: 3524 - 3531, 1971.
- [58] HEBER U., EGNEUS H., HANCK U., JENSEN M., KÖSTER S., Regulation of photosynthetic electron transport and photophosphorylation in intact chloroplasts and leaves of *Spinacia oleracea* L., *Planta*, **43**: 41 - 49, 1978.
- [59] HENDRICH W., Struktura chloroplastów a biochemia fotosyntezy, *Post. Biochem.*, **13**: 311 - 333, 1967.
- [60] HIEDEMANN-VAN WYK D., KANNAGARA C. G., Localization of ferredoxin in the thylakoid membrane with immunological methods, *Z. Naturforsch.*, **26b**: 46 - 50, 1971.
- [61] HIND G., NAKATANI H. Y., IZAWA S., Light-dependent redistribution of ions in suspensions of chloroplast thylakoid membranes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 1484 - 1488, 1974.
- [62] HOLOWKA D. A., HAMMES G. G., Chemical modification and fluorescence studies of chloroplast coupling factor, *Biochemistry*, **16**: 5538 - 5545, 1977.
- [63] HOMANN P. H., Cation effects on fluorescence of isolated chloroplasts, *Plant Physiol.*, **44**: 932 - 936, 1969.
- [64] IZAWA S., GOOD N. E., Effects of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts. I. Light scattering and volume changes, *Plant Physiol.*, **41**: 533 - 543, 1966.
- [65] JAGENDORF A. T., Chloroplast membranes and coupling factor conformations, *Feder. Proced.*, **34**: 1718 - 1722, 1975.
- [66] JAGENDORF A. T., HIND G., Studies on the mechanism of photophosphorylation, [w] *Photosynthetic Mechanism of Green Plants*, str. 599 - 610, Natl. Acad. Sci. Natl. Res. Council, Washington 1963.
- [67] JAGENDORF A. T., URIBE E., ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**: 170 - 177, 1966.
- [68] JOHANSSON B. C., BALTCHEFFSKY M., BALTSCHJEFFSKY H., BACCARINI-MELANDRI A., MELANDRI B. A., Purification and properties of a coupling factor (Ca_2^+ -dependent adenosine triphosphatase) from *Rhodospirillum rubrum*, *Eur. J. Biochem.*, **40**: 109 - 117, 1973.
- [69] JOLIOT P., JOLIOT A., Dependence of delayed luminescence upon adenosine triphosphatase activity in *Chlorella*, *Plant Physiol.*, **65**: 691 - 696, 1980.
- [70] JUNGE W., AUSLÄNDER W., MCGREER A. J., RUNGE T., The buffering capacity of the internal phase of thylakoids and the magnitude of the pH changes inside under flashing light, *Biochim. Biophys. Acta*, **546**: 121 - 141, 1979.
- [71] KARU A. E., MOUDRIANAKIS E. N., Fractionation and comparative studies of enzymes in aqueous extracts of spinach chloroplasts, *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**: 655 - 671, 1969.
- [72] KELL D. B., On the functional proton current pathway of electron transport phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta.*, **549**: 55 - 99, 1979.
- [73] KLEIN S. M., VERNON L. P., Composition of a photosystem I chlorophyll protein complex from *Anabaena flos-aquae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **459**: 364 - 375, 1977.

- [74] KNAFF D. B., MALKIN R., MYRON J. C., STOLLER M., The role of plastoquinone and β -carotene in the primary reaction of plant photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **459**: 402 - 411, 1977.
- [75] KOENIG F., MENKE W., CRAUBNER H., SCHMID G. H., RADUNZ A., Photochemically active chlorophyll-containing proteins from chloroplasts and their localization in the thylakoid membrane, *Z. Naturforsch.*, **27b**: 1225 - 1238, 1972.
- [76] KRAUSE G. H., Light-induced movements of magnesium ions in intact chloroplasts. Spectroscopic determination with eriochrome blue, *Biochim. Biophys. Acta*, **460**: 500 - 510, 1977.
- [77] KRZYSTYNIAK K., Fizjologiczna rola cyklicznej fotofosforylacji, *Post. Biochem.*, **20**: 369 - 378, 1974.
- [78] MACHOLD O., HOYER-HANSEN G., Polypeptide composition of thylakoids from *viridis* and *xantha* mutants in barley, *Carlsberg Res. Commun.*, **41**: 359 - 366, 1976.
- [79] MAGNUSSON R. P., McCARTY R., Light-induced exchange of nucleotides into coupling factor 1 in spinach chloroplast thylakoids, *J. Biol. Chem.*, **251**: 7412 - 7422, 1976.
- [80] — Illumination of chloroplast thylakoids in the presence of ATP causes the binding of ADP to one of the large subunits of coupling factor 1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**: 1283 - 1289, 1976.
- [81] MARSHO T. V., KOK B., Photosynthetic regulation by cations in spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **333**: 353 - 365, 1974.
- [82] MASAMOTO K., ITOH S., NISHIMURA M., Salt-induced pH changes in spinach chloroplast suspension. Changes in surface potential and surface pH of thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **591**: 142 - 152, 1980.
- [83] McCARTY R., FAGAN J., Light-stimulated incorporation of N-ethylmaleimide into coupling factor 1 in spinach chloroplasts, *Biochemistry*, **12**: 1503 - 1507, 1973.
- [84] McCARTY R., RACKER E., Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. III. Activation of adenosine triphosphatase and ^{32}P -labeled orthophosphate-adenosine triphosphate exchange in chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **243**: 129 - 137, 1968.
- [85] MILLER K. R., A particle spanning the photosynthetic membrane, *J. Ultrastruct. Res.*, **54**: 159 - 167, 1976.
- [86] MILLER K. R., MILLER G. J., McINTYRE K. R., The light-harvesting chlorophyll-protein complex of photosystem II. Its location in the photosynthetic membrane, *J. Cell Biol.*, **71**: 624 - 638, 1976.
- [87] MILLER K. R., STAEHELIN L. A., Analysis of the thylakoid outer surface: coupling factor is limited to unstacked membrane regions, *J. Cell Biol.*, **68**: 30 - 47, 1976.
- [88] MITCHELL P., Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, **191**: 144 - 148, 1961.
- [89] — Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation, *Biol. Rev.*, **41**: 445 - 502, 1966.
- [90] — A chemiosmotic molecular mechanism for protontranslocating adenosine triphosphatases, *FEBS Letters*, **43**: 189 - 194, 1974.
- [91] — A commentary on alternative hypotheses of protonic coupling in the membrane systems catalysing oxidative and photosynthetic phosphorylation, *FEBS Letters*, **78**: 1 - 20, 1977.

- [92] MÜHLETHALER K., Introduction to structure and function of the photosynthetic apparatus, [w] *Photosynthesis I. Encyclopedia of Plant Physiology New Series*, red. Trebst A., Avron M., t. 5, str. 503 - 521, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977.
- [93] MURAKAMI S., PACKER L., Protonation and chloroplast membrane structure, *J. Cell Biol.*, **47**: 332 - 351, 1970.
- [94] — The role of cations in the organization of chloroplast membranes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**: 337 - 347, 1971.
- [95] MURATA N., Control of excitation transfer in photosynthesis. V. Correlation of membrane structure to regulation of excitation transfer between two pigment systems in isolated spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **245**: 365 - 372, 1971.
- [96] NELSON N., DETERS D. K., NELSON H., RACKER E., Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XIII. Properties of isolated subunits of coupling factor 1 from spinach chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **248**: 2049 - 2055, 1973.
- [97] NELSON N., EYTON E., NOTSANI B., SIGRIST H., SIGRIST-NELSON K., GITLER C., Isolation of a chloroplast N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid active in proton translocation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**: 2375 - 2378, 1977.
- [98] NELSON N., NELSON H., RACKER E., Partial resolution of the enzyme catalyzing photophosphorylation. XII. Purification and properties of an inhibitor isolated from chloroplast coupling factor 1, *J. Biol. Chem.*, **247**: 7657 - 7662, 1972.
- [99] NEUMANN J., JAGENDORF A. T., Light-induced pH changes related to phosphorylation by chloroplasts, *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**: 109 - 119, 1964.
- [100] NIR I., PEASE D. C., Chloroplast organization and the ultrastructural localization of photosystem I and II, *J. Ultrastruct. Res.*, **42**: 534 - 550, 1973.
- [101] OLIVER D., JAGENDORF A., Exposure of free amino groups in the coupling factor of energized spinach chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **251**: 7168 - 7175, 1976.
- [102] OUITRAKUL R., IZAWA S., Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor. II. Acceptor specific inhibition by KCN, *Biochim. Biophys. Acta*, **305**: 105 - 118, 1973.
- [103] PARADIES H. H., ZIMMERMANN J., SCHMIDT U. D., The conformation of chloroplast coupling factor 1 from spinach in solution; *J. Biol. Chem.*, **253**: 8972 - 8979, 1978.
- [104] POINCELOT R. P., Isolation and lipid composition of spinach chloroplast envelope membrane, *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**: 134 - 142, 1973.
- [105] PROCHASKA L. J., GROSS E. L., Evidence for the location of divalent cation binding sites on the chloroplast membrane, *J. Memb. Biol.*, **36**: 13 - 32, 1977.
- [106] RACKER E., HAUSKA C. A., LIEN S., BERZBORN R. J., NELSON N., Resolution and reconstitution of the system of photophosphorylation, [w] *IInd International Congress on Photosynthesis, Stresa 1971*, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2, str. 1097 - 1113, dr. W. Junk N. V. Publishers, The Hague, 1972.
- [107] RADUNZ A., Asymmetric distribution of lipids and proteins in the thylakoid membrane. A study with specific antisera, [w] *Abstracts of the Fifth International Congress on Photosynthesis*, str. 460, Halkidiki, 1980.
- [108] RAVIZZINI R. A., ANDREO C. S., VALLEJOS R. H., Sulfhydryl groups in

- photosynthetic energy conservation. VI. Subunit distribution of sulfhydryl groups and on sulfide bands in chloroplast coupling factor and ATPase activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **591**: 135 - 141, 1980.
- [109] REEVES S. G., HALL D. O., Photophosphorylation in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **463**: 275 - 297, 1978.
- [110] REGITZ G., OETTMEIER W., On the isolation of the possible primary acceptor of photosystem I by immunochemical methods, [w] IInd International Congress on Photosynthesis, Stresa 1971, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 1, str. 499 - 506, Dr. W. Junk N. V. Publishers, The Hague, 1972.
- [111] RIENTIS K., HARDT H., AVRON M., Energy-dependent reverse electron flow in chloroplasts, *Eur. J. Biochem.*, **43**: 291 - 298, 1974.
- [112] ROBERTSON R. N., BOARDMAN N. K., The link between charge separation proton movement and ATPase reactions, *FEBS Letters*, **60**: 1 - 6, 1975.
- [113] ROSING J., SMITH D. J., KAYALAR C., BOYER P. D., Medium ADP and ADP already tightly bound to thylakoid membranes forms the initial ATP in chloroplast phosphorylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**: 1 - 8, 1976.
- [114] ROTTENBERG H., GRUNWALD T., AVRON M., Direct determination of Δ pH in chloroplasts and its relation to the mechanisms of photoinduced reactions, *FEBS Letters*, **13**: 41 - 44, 1971.
- [115] — Determination of Δ pH in chloroplasts. 1. Distribution of (¹⁴C) methylamine, *Eur. J. Biochem.*, **25**: 54 - 63, 1972.
- [116] ROY H., MOUDRIANAKIS E. N., Interaction between ADP and the coupling factor of photophosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 464 - 468, 1971.
- [117] RUMBERG B., Field changes, [w] Photosynthesis I. Encyclopedia of Plant Physiology New Series, red. Trebst A., Avron M., t. 5, str. 405 - 415, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977.
- [118] RYRIE I. T., JAGENDORF A. T., An energy-linked conformational change in the coupling factor protein in chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **246**: 3771 - 3774, 1971.
- [119] — Correlation between a conformational changes in the coupling factor protein and the high energy state in chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **247**: 4453 - 4459, 1972.
- [120] SANE P. V., The topography of the thylakoid membrane of the chloroplast, [w] Photosynthesis I. Encyclopedia of Plant Physiology New Series, red. Trebst A., Avron M., t. 5, str. 522 - 542, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1977.
- [121] SCHMID R., SHAVIT N., JUNGE W., The coupling factor of photophosphorylation and the electric properties of the thylakoid membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **430**: 145 - 153, 1976.
- [122] SCHMIDT U. D., PARADIES H. H., The structure of the ϵ subunit from the chloroplast coupling factor (CF₁) studied by means of small angle x-ray scattering and inelastic light scattering, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **78**: 383 - 392, 1977.
- [123] SCHMID G. H., RADUNZ A., MENKE W., The effect of an antiserum to plastocyanin an various chloroplast preparations, *Z. Naturforsch.*, **30c**: 201 - 212, 1975.
- [124] SCHREIBER U., AVRON M., Properties of ATP-driven reverse electron flow in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **546**: 436 - 447, 1979.

- [125] SCHRÖDER H., MUHLE H., RUMBERG B., Relationship between ion transport phenomena and phosphorylation in chloroplasts, [w] IInd International Congress on Photosynthesis, Stresa 1971, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2, str. 919 - 930, Dr. W. Junk N. V. Publishers, The Hague, 1972.
- [126] SHAVIT N., AVRON M., The relation of electron transport and phosphorylation to conformational changes in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **131**: 516 - 525, 1967.
- [127] SHAVIT N., LIEN S., SAN PIETRO A., On the role of membrane-bound ADP and ATP in photophosphorylation in chloroplast membranes, *FEBS Letters*, **73**: 55 - 58, 1977.
- [128] SIGGEL U., RENER G., STIEHL H. H., RUMBERG B., Evidence for electronic and ionic interaction between electron transport chains in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **256**: 328 - 335, 1972.
- [129] SINGER S. J., NICOLSON G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**: 720 - 731, 1972.
- [130] SMITH D. J., STOKES B. O., BOYER P. D., Probes of initial phosphorylation events in ATP synthesis by chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **251**: 4165 - 4171, 1976.
- [131] SOE G., NISHI N., KAKUNO T., YAMASHITA J., HORIO T., Purification and identification of the factor capable of converting Ca^{2+} -ATPase into Mg^{2+} -ATPase present in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores, *J. Biochem.*, **87**: 473 - 481, 1980.
- [132] STAEHELIN L. A., Chloroplast membrane structure. Intramembranous particles of different sizes make contract in stacks mebrane regions, *Biochim. Biophys. Acta*, **408**: 1 - 11, 1975.
- [133] STAEHELIN L. A., ARNTZEN C. J., Effects of ions and gravity forces on the supramolecular organization and excitation energy distribution in chloroplast membranes, [w] Ciba Foundation Symposium 61 (new series), 147 - 175, 1979.
- [134] STIEHL H. H., WITT H. T., Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis, *Z. Naturforsch.*, **24b**: 1588 - 1598, 1969.
- [135] STROTMANN H., BICKEL-SANDKOTTER S., Energy-dependent exchange of adenine nucleotides on chloroplast coupling factor (CF_1), *Biochim. Biophys. Acta*, **460**: 126 - 135, 1977.
- [136] STROTMANN H., BICKEL-SANDKOTTER S., SHOSHAN V., Kinetic analysis of light-dependent exchange of adenine nucleotides on chloroplast coupling factor 1, *FEBS Letters*, **101**: 316 - 320, 1979.
- [137] STROTMANN H., BICKEL S., HUCHERMEYER B., Energy-dependent release of adenine nucleotides tightly bound to chloroplast coupling factor CF_1 , *FEBS Letters*, **61**: 194 - 198, 1976.
- [138] STROTMANN H., HESSE H., EDEIMANN K., Quantitative determination of coupling factor CF_1 of chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **314**: 202 - 210, 1973.
- [139] TELFER A., NICOLSON J., BARBER J., Cation control of chloroplast structure and chlorophyll *a* fluorescence yield and its relevance to the intact chloroplasts, *FEBS Letters*, **65**: 77 - 83, 1976.
- [140] TIEFERT M. A., ROY H., MOUDRIANAKIS E. N., Binding of adenine nucleotides and pyrophosphate by the purified coupling factor of photophosphorylation, *Biochemistry*, **16**: 2396 - 2404, 1977.
- [141] TIEMANN R., RENGER G., GRÄBER P., WITT H. T., The plastoquinone pool as possible hydrogen pump in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **546**: 498 - 518, 1979.

- [142] TREBST A., Organization of the photosynthetic electron transport system of chloroplasts in the thylakoid membrane, [w] Energy Conservation in Biological Membranes, red. Schäfer G., Klingenberg M., str. 84 - 95, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1978.
- [143] TREBST A., Plastoquinones in photosynthesis, Phil. Trans. R. Soc. Lond., B, 284: 591 - 599, 1978.
- [144] TREBST A., AVRON M., Introduction, [w] Photosynthesis I. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, red. Trebst A., Avron M., t. 5, str. 1 - 4, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977.
- [145] TREBST A., REIMER S., Properties of photoreductions by photosystem II in isolated chloroplasts. An energy-conserving in the photoreductions of benzoquinones by photosystem II in the presence of dibromothymoquinone, Biochim. Biophys. Acta, 305: 129 - 139, 1973.
- [146] TSAI C. M., HUANG C. C., CANELLAKIS E. S., Iodination of cell membranes. I. Optimal conditions for the iodination of exposed membrane components, Biochim. Biophys. Acta, 332: 47 - 58, 1973.
- [147] VAMBUTAS V. K., RACKER E., Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. I. Stimulation of photophosphorylation by a preparation of a latent Ca^{++} -dependent adenosine triphosphatase from chloroplasts, J. Biol. Chem., 240: 2660 - 2667, 1965.
- [148] VANDERMEULEN D. L., GOVINDJEE, Binding of modified adenine nucleotides to isolated coupling factor from chloroplasts as measured by polarization of fluorescence, Eur. J. Biochem., 78: 585 - 598, 1977.
- [149] VREDENBERG W. J., TONK W. J. M., On the steady-state of electrical potential difference across the thylakoid membranes of chloroplasts in illuminated plant cells, Biochim. Biophys. Acta, 387: 580 - 587, 1975.
- [150] WALZ D., GOLDSTEIN L., AVRON M., Determination and analysis of the buffer capacity of isolated chloroplasts in the light and in the dark, Eur. J. Biochem., 47: 403 - 407, 1974.
- [151] WANG A. Y., PACKER L., Mobility of membrane particles in chloroplasts, Biochim. Biophys. Acta, 305: 488 - 492, 1973.
- [152] WEISS M. K., McCARTY R., Cross-linking within a subunit of coupling factor 1 increases the proton permeability of spinach chloroplast thylakoids, J. Biol. Chem., 252: 8007 - 8012, 1977.
- [153] WIĘCKOWSKI S., Struktura błon tylakoidów, Post. Biol. Kom., 2: 147 - 164, 1975.
- [154] — Czynniki sprzęgające z błon przetwarzających energię, Zeszyty Naukowe UJ, Prace z Biol. Molek., z. 4: 131 - 141, 1977.
- [155] — Reakcje pierwotne fotosyntezy i transport elektronów w rozwijających się chloroplastach, Probl. Nauk Roln., (w druku).
- [156] WILD A., URSCHEL B., Chlorophyll-protein complexes of *Chlorella fusca*, Z. Naturforsch., 35c: 627 - 637, 1980.
- [157] WILLIAMS R. J. P., Possible functions of chains of catalysts, J. Theor. Biol., 1: 1 - 17, 1961.
- [158] — The history and the hypotheses concerning ATP-formation by energised protons, FEBS Letters, 85: 9 - 19, 1978.
- [159] WITT H. T., Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods. The central role of the electric fields, Biochim. Biophys. Acta, 505: 355 - 427, 1979.
- [160] WITT H. T., RUMBERG B., JUNGE W., DORING G., STIEHL H. H., WEIKARD J., WOLFF C., Evidence for the coupling of electron transfer, field

changes, proton translocation and phosphorylation in photosynthesis, [w] Progress in Photosynthesis Research, red. Metzner H., t. 3, str. 1361 - 1373, 1969.

- [161] WITT H. T., SCHLÖDDER E., GRÄBER P., Membrane-bound ATP synthesis generated by an external electric field, FEBS Letters, **69**: 272 - 276, 1976.
- [162] YOUNIS H., WINGET G. D., RACKER E., Requirement of the δ subunit of chloroplast coupling factor 1 for photophosphorylation, J. Biol. Chem., **252**: 1814 - 1818, 1977.

Otrzymano: 24 lutego 1981.

Przyjęto: 2 marca 1981.

Adres autorów: Grodzka 53, 31 - 001 Kraków.

CZYNNIKI BIOFIZYCZNE I BIOCHEMICZNE
WARUNKUJĄCE PRODUKTYWNOŚĆ FOTOSYNTETYCZNA ROŚLIN *

BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL FACTORS LIMITING
THE PHOTOSYNTHETIC PRODUCTIVITY OF PLANTS

Stanisław MALESZEWSKI i Grażyna BYSTRZEJEWSKA

Zakład Fizjologii i Adaptacji Roślin, Instytut Botaniki,
Uniwersytet Warszawski, Krakowskie Przedmieście 26/28,
00-927 Warszawa

Streszczenie. Przedyskutowano czynniki wpływające na produktywność roślin związane z typem ich fotosyntetycznego metabolizmu (C_3 , C_4). Uwzględniono: 1. stopień akumulacji w tkankach roślin energii fotosyntetycznie aktywnego promieniowania, 2. zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy, 3. wpływ fotooddychania, 4. wydajność przekształcania energii świetlnej w fotosyntezie. Stwierdzono, że zwiększona produktywność roślin może być związana z podwyższonym fizjologicznym zapotrzebowaniem kwantowym fotosyntezy.

Summary. The factors affecting plant productivity, related to the type of photosynthetic metabolism (C_3 , C_4) has been discussed. It was examined: 1. accumulation of photosynthetically active light energy in plant materials, 2. quantum requirements of photosynthesis, 3. effect of photorespiration, 4. the efficiency of light energy conversion in photosynthesis. It is suggested that increased plant productivity may be connected with the higher values of quantum requirements of photosynthesis.

Wykaz stosowanych skrótów

FAP — fotosyntetycznie aktywne promieniowanie

G3—P — aldehyd 3-fosfoglicerynowy

2-PG — kwas 2-fosfoglikolowy

3-PGA — kwas 3-fosfoglicerynowy

RuBP — rybulozo 1,5-dwufosforan

ZK — zapotrzebowanie kwantowe

* Referat wygłoszony na Sympozjum „Biochemiczne podstawy wykorzystania energii słonecznej”, XVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Warszawa, 11 - 13 września 1980 r.

WSTĘP

Energia przepływająca przez każdy ekosystem jest pochłonięta przez rośliny i przetworzoną w procesie fotosyntezy energią promieniowania słonecznego. Wydajność fotosyntezy jest więc jednym z podstawowych czynników, określających ogólną ilość energii wykorzystywanej przez organizmy. Także niemal cała energia jaką zużywa człowiek, zarówno dla zaspokojenia potrzeb metabolicznych, jak też we wszelkiej działalności, jest zakumulowaną w procesie fotosyntezy energią słoneczną. Bezpośrednio dostarczają jej produkty fotosyntezy i materiały wytwarzane w wyniku ich wtórnych przemian. Do materiałów tych należą także powstałe w minionych epokach złoża węgla, ropy naftowej i gazu ziemnego. Człowiek współczesny, zwłaszcza w zakresie produkcji żywności, jest prawie całkowicie zależny od dopływu i możliwości wykorzystania energii słonecznej. Także w zaspokajaniu całości naszych potrzeb energetycznych, udział energii innego pochodzenia (energia jądrowa, energia geotermiczna) ma tylko marginesowe znaczenie [11]. Jeśli nawet w niedalekiej przyszłości udział ten uda się istotnie zwiększyć, a także opanować metody wytwarzania związków organicznych na drodze przemysłowej syntezy chemicznej, to — jak się obecnie wydaje — zasadniczy sposób wytwarzania środków żywności jeszcze długo będzie polegał na uprawie roślin, a więc wykorzystaniu procesu fotosyntezy. Proces ten będzie także nadal podstawą dla uzyskiwania szeregu surowców i materiałów energetycznych [11]. Uzasadnione jest więc pytanie, w jakim stopniu fotosyntetyczna produkcja roślinna może zaspokajać nasze, stale rosące w tym zakresie, potrzeby. Aby na nie odpowiedzieć, trzeba poznać główne środowiskowe i wewnętrzne ograniczenia tego procesu natury fizycznej, fizjologicznej i biochemicznej. Należy też dokładniej wyjaśnić biochemiczne mechanizmy regulacji fotosyntezy i ich funkcjonowanie w różnych warunkach środowiskowych. Ponadto, konieczne jest uwzględnienie czynników ekologicznych, struktury oraz funkcjonowania różnych ekosystemów, a zwłaszcza upraw polowych i prowadzonych w środowisku kontrolowanym. Dopiero kompleksowe ujęcie fotosyntezy i warunków w jakich proces ten przebiega może dać właściwe podstawy dla oceny możliwości fotosyntetycznej produktywności roślin i dane dla wyczerpującej odpowiedzi na postawione pytanie. Obecnie odpowiedź na nie może być tylko fragmentaryczna. W artykule tym poruszono także tylko niektóre biofizyczne i biochemiczne aspekty zagadnienia fotosyntetycznej produktywności roślin.

AKUMULACJA ENERGII FOTOSYNTETYCZNEJ AKTYWNEGO
PROMIENIOWANIA SŁONECZNEGO

Dane dotyczące akumulacji przez rośliny lądowe docierającego do powierzchni Ziemi fotosyntetycznie aktywnego promieniowania (FAP) słonecznego, tj. promieniowania o długościach fal od około 380 do 720 nm, wskazują, że tylko niewielka część energii tego promieniowania jest przekształcana w energię chemiczną zawartą w produktach fotosyntezy. Przyjmując za Nichiporovichem [44], że do powierzchni naszej planety dociera w okresie roku energii FAP około $1 \cdot 10^{24}$ J i że wytworzona równocześnie biomasa w ilości około $100 \cdot 10^9$ ton zawiera energii około $1,8 \cdot 10^{21}$ J otrzymuje się, że rośliny akumulują w wytworzonych w wyniku fotosyntezy związkach mniej niż 0,2% energii FAP. W opracowaniach innych autorów [21, 22, 33] można znaleźć podobne liczby, charakteryzujące akumulację FAP przez rośliny.

Interesujące jest porównanie przytoczonych danych z wielkością globalnego zużycia energii przez człowieka. Pozwala to bowiem na ocenę wartości FAP jako potencjalnego źródła energii.

Wielkość rocznego światowego zużycia energii jest oceniana na około $3 \cdot 10^{20}$ J, a dotychczas wykorzystana energia w postaci paliw kopalnych wszystkich typów na około $6 \cdot 10^{21}$ J [22]. Liczby te wskazują więc, że całkowite światowe roczne zużycie energii jest prawie o rząd mniejsze od energii FAP akumulowanej przez rośliny i nieporównywalnie mniejsze od całkowitej ilości FAP docierającej do powierzchni Ziemi.

Średnia akumulacja FAP w wytworzonej biomase roślinnej, wynosząca poniżej 0,2%, jest oczywiście znacznie niższa od wydajności przekształcania energii świetlnej w energię chemiczną w naturalnych zespołach roślinnych. Uzyskana została bowiem przy uwzględnieniu w obliczeniach promieniowania słonecznego docierającego także do obszarów nie mających warunków sprzyjających wegetacji roślin. Natomiast przy bardzo dobrych warunkach glebowych i klimatycznych, optymalnej strukturze ładu i długim okresie wegetacji roślin ilość energii zmagazynowanej w wytworzonej masie roślinnej może dochodzić w uprawach polowych do 5 - 6%, a w okresach najwyższej fotosyntetycznej aktywności roślin nawet do 10 - 12% FAP padającego na rośliny. Ostatnia wartość jest uważana za bliską maksymalnej fotosyntetycznej wydajności roślin lądowych i może być osiągnana tylko w warunkach szczególnie korzystnych [35, 37, 45, 46].

Na podstawie teoretycznych założeń potencjalną wydajność akumulacji FAP w fotosyntezie ocenia się na około 25% pochłoniętej przez chlorofil energii świetlnej [51, 62]. Stwierdzana w warunkach Polski akumulacja FAP w uprawach polowych nie przekracza jednak 1% [36,

39], jest więc zaledwie około 5 razy większa od wartości średniej dla całej roślinności Ziemi.

Znaczne różnice między stopniem akumulacji FAP w wytworzonej w wyniku fotosyntezy masie roślinnej: średnim dla całej roślinności (około 0,2%), średnim dla upraw polowych (około 1%), stwierdzanym w warunkach optymalnych (5 - 12%) i określanym teoretycznie jako potencjalny (około 25%) sugerują, że dopływ energii słonecznej nie stanowi czynnika ograniczającego produkcję związków organicznych w fotosyntezie. Uzasadnia to podejmowanie badań mających na celu lepsze wykorzystanie tego źródła energii.

TEORETYCZNE ZAPOTRZEBOWANIE KWANTOWE FOTOSYNTAZY

Podstawowym czynnikiem fotosyntetycznej produktywności roślin jest zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy i wydajność przekształcania pochłanianej energii świetlnej w energię chemiczną zawartą w wytwarzanych związkach organicznych. Zapotrzebowaniem kwantowym (ZK) fotosyntezy nazywana jest liczba kwantów (lub einsteinów) niezbędna dla związania 1 cząsteczki (lub mola) CO_2 oraz wytworzenia 1 cząsteczki (lub mola) O_2 . Odwrotność tej wartości, nazywanej też wymogiem kwantowym, nosi nazwę wydajności kwantowej fotosyntezy.

Na podstawie znajomości przebiegu reakcji fazy świetlnej i ciemnej fotosyntezy można łatwo obliczyć teoretyczne zapotrzebowanie kwantowe tego procesu. Uwzględniając, że a) dla asymilacji i redukcji 1 cz. CO_2 niezbędne są 3 cz. ATP i 2 cz. NADPH [7, 30], b) stechiometria fotosyntetycznej fosforylacji niecyklicznej jest 1 NADPH: 1 ATP : 0,5 O_2 , c) dla wytworzenia 1 NADPH potrzebne są 2 elektrony, a tym samym 4 fotony, d) przy wytwarzaniu dodatkowej cząsteczki ATP w fosforylacji cyklicznej zużywany jest 1 kwant wzbudzający fotoukład I — otrzymuje się minimalne zapotrzebowanie kwantowe fotosyntetycznego cyklu C_3 wynoszące 9 kwantów na 1 cząsteczkę włączonego CO_2 .

Podobne obliczenia wskazują, że rośliny C_4 zużywają więcej energii niż rośliny C_3 w procesie asymilacji i redukcji CO_2 . W fotosyntezie u roślin C_4 potrzebne są bowiem dodatkowo 2 cząsteczki ATP na 1 cząsteczkę CO_2 [14]. Jeżeli więc rośliny C_3 zużywają 9 kwantów, minimalne zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy u roślin C_4 byłoby 11 kwantów na 1 cząsteczkę pobranego CO_2 lub wydzielonego O_2 [12].

WPLYW FOTOODDYCHANIA NA ZAPOTRZEBOWANIE KWANTOWE FOTOSYNTAZY

Minimalne zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy, wyliczone wyżej, uwzględnia jedynie zużycie energii w reakcjach asymilacji i reduk-

cji CO₂, prowadzących do wytworzenia heksozy jako końcowego produktu. Równocześnie przebiegają jednak w komórkach roślinnych i inne procesy zwiększające wartość wyznaczonego doświadczalnie fizjologicznego zapotrzebowania kwantowego fotosyntezy. Jednym z nich jest, ściśle związane z fotosyntezą, fotooddychanie. Mechanizm i fizjologiczne znaczenie tego procesu są obecnie intensywnie badane [2, 13, 15, 24, 27 - 29, 40, 54, 61]. Niektórzy autorzy sugerują, że ograniczenie lub całkowita eliminacja fotooddychania może spowodować zwiększenie natężenia fotosyntezy i fotosyntetycznej produktywności roślin [47, 60].

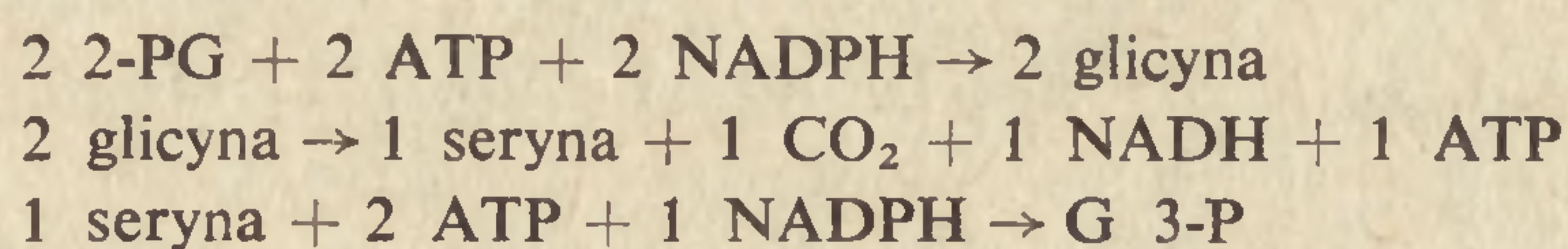
Wpływ fotooddychania na zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy może być określony na podstawie wielkości strat energetycznych związanych z fotooddychaniem oraz udziału tego procesu w ogólnych fotosyntetycznych przemianach węgla.

Obecnie nie ulega wątpliwości, że początkowym substratem fotooddychania jest 2-fosfoglikolan powstający w reakcji oksydacyjnego rozszczepienia RuBP, katalizowanego przez karboksylazę/oksygenazę RuBP [1, 8, 38]. Związek ten ulega przemianom nazywanym szlakiem kwasu glikolowego [53], w wyniku których co najmniej 25% jego węgla jest przekształcane w CO₂, a pozostały węgiel powraca do fotosyntetycznego cyklu C₃ [patrz Postępy Biochemii [27], str. 282 - 296].

Przyjmując, że cała ilość wytworzonego fosfoglikolanu jest metabolizowana w szlaku kwasu glikolowego, można obliczyć związane z tymi przemianami straty energetyczne. W szlaku kwasu glikolowego przekształcenie 1 cz. glikolanu w glicynę wymaga 1 cz. ATP i 2 cz. zredukowanej ferredoksyny lub 1 cz. NADPH dla wytworzenia donora grupy aminowej [27]. Przy przekształceniu 2 cz. glicyny w serynę odłączana jest grupa aminowa i CO₂. Badania nad mitochondrialną dekarboksylacją glicyny wykazały, że proces ten jest związany w wytworzeniem NADH [3, 43, 56] oraz ATP [3, 43], co częściowo bilansuje zużycie energii w innych reakcjach szlaku kwasu glikolowego. W zamykającym cykl kwasu glikolowego reakcjach wytworzenie cząsteczki aldehydu 3-fosfoglicerynowego (G3-P) z seryny poprzez hydroksypirogronian jest związane ze zużyciem 2 ATP i 1 NADPH. Jak wynika z tabeli 1, szlak kwasu glikolowego jest więc sumarycznie procesem zużywającym energię [12].

TABELA 1

Energetyka szlaku kwasu glikolowego [12]



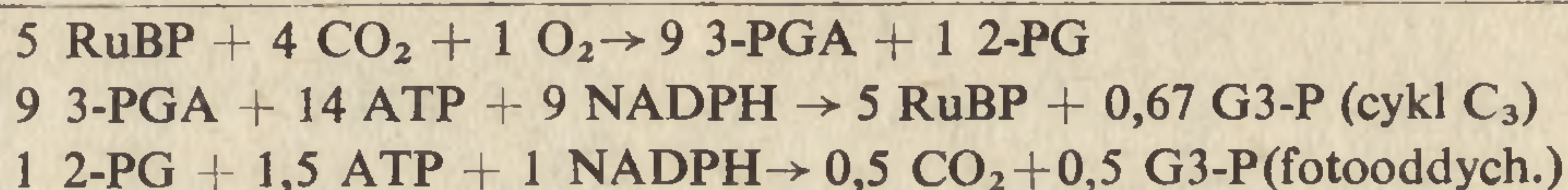
w sumie:



Rozważana była także możliwość całkowitego utleniania kwasu glikolowego do CO_2 oraz działanie w komórkach cyklu glikolan-glioksalan-glikolan, zużywającego wytwarzany w chloroplastach NADPH [53, 58]. Funkcjonowanie tych dróg, w większym stopniu niż szlak kwasu glikolowego, zwiększałoby energetyczny koszt asymilacji CO_2 . Powszechnie przyjmuje się jednak, że głównym mechanizmem fotooddychania jest zaproponowany przez Tolberta [53] szlak kwasu glikolowego.

Przy każdym z wymienionych mechanizmów przemian kwasu glikolowego całkowita strata energii zależy jednak przede wszystkim od ilościowego stosunku asymilacji CO_2 do syntezy glikolanu. Stosunek ten, jak wskazują wyniki licznych badań, zależy głównie od stężenia O_2 , stężenia CO_2 , wysokości temperatury i natężenia światła [25, 26, 53, 58]. Campbell i Black [12], przyjmując za Laing i wsp. [31], że w naturalnych warunkach środowiskowych na 5 cząsteczek RuBP z CO_2 reagują 4 cząsteczki, a z O_2 jedna cząsteczka, obliczyli łączne zużycie energii w fotosyntetycznym cyklu C_3 i w fotooddychaniu (tabela 2).

TABELA 2

Energetyka fotosyntetycznego cyklu C_3 i fotooddychania [12]w sumie: 1 CO_2 : 4,4 ATP: 2,9 NADPH

Wychodząc z założeń Lainga i wsp. [31] można obliczyć energię zużywaną przy naturalnych warunkach środowiskowych w procesie fotooddychania. Energia ta odpowiada różnicy pomiędzy ilością potrzebnej energii dla funkcjonowania cyklu C_3 i fotooddychania a ilością energii zużywanej tylko w cyklu C_3 . Na 1 cz. włączonego CO_2 energia ta wynosi około

$$(4,4 \text{ ATP} + 2,9 \text{ NADPH}) - (3 \text{ ATP} + 2 \text{ NADPH}) =$$

$$= 1,4 \text{ ATP} + 0,9 \text{ NADPH} \approx 4 \text{ kwanty FAP}$$

Jeżeli więc minimalne teoretyczne zapotrzebowanie kwantowe cyklu C_3 jest 9 kwantów, to łącznie z fotooddychaniem zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy przebiegające w naturalnych warunkach środowiskowych powinno wynosić u roślin C_3 13 kwantów, a u roślin C_4 odpowiednio 15 kwantów na 1 cz. związanego CO_2 . W tym drugim przypadku jedynie pod warunkiem, że założenia Lainga i wsp. [31] mogą być zastosowane do fotosyntezy u roślin C_4 .

Niewątpliwie stosunek między karboksylacją i oksigenacją RuBP może być inny od założonego przez Lainga i wsp. [31]. Obliczenia oparte na założeniach przyjętych przez tych autorów są jednak dobrą ilustracją wpływu fotooddychania na energetykę fotosyntezy.

FIZJOLOGICZNE ZAPOTRZEBOWANIE KWANTOWE FOTOSYNTAZY

Wyniki eksperymentalnych oznaczeń zapotrzebowania kwantowego fotosyntezy, przeprowadzanych w odpowiednich warunkach, są tylko nieco wyższe od przytoczonych w poprzednim rozdziale rezultatów teoretycznych wyliczeń i w zasadzie je potwierdzają.

Pomiary tzw. fizjologicznego zapotrzebowania kwantowego fotosyntezy, tj. dokonywane przy stężeniach O_2 i CO_2 , natężeniach światła i temperaturach zbliżonych do naturalnych, przeprowadzane przez różnych autorów, a zebrane przez Campbella i Blacka [12], dawały wyniki mieszczące się w zakresie od 13,1 do 19,5 kwantów na 1 cząsteczkę CO_2 (tabela 3). Średnia wartość fizjologicznego zapotrzebowania kwantowego fotosyntezy, obliczona na podstawie tych danych, wynosi około 17 kwantów na 1 cz. CO_2 . Ściśle biorąc, liczba ta określa rzeczywiste zapotrzebowanie kwantowe, w warunkach zbliżonych do naturalnych, przede wszystkim fotosyntezy i fotooddychania, ale także i innych procesów bezpośrednio nie związanych z absorpcją światła.

TABELA 3

Fizjologiczne zapotrzebowanie kwantowe (ZK) fotosyntezy łącznie z fotooddychaniem [12]

| Materiał doświadczalny | ZK (kwantów \cdot cz ⁻¹ CO_2) | Literatura |
|--|---|------------|
| <i>Minulus cardinalis</i> (C ₃) | 17 | [4] |
| <i>Atriplex rosea</i> (C ₄) | 18,4 | [5] |
| <i>Atriplex patula</i> (C ₃) | 19,5 | |
| <i>Atriplex patula</i> (C ₃) | 17,0 | [6] |
| Liście 22 gat. C ₃ i C ₄ | 13,4 średnio | [41] |
| Owies (C ₃) | 17,2 | |
| | 14,9 | |
| Burak cukrowy (C ₃) | 16,4 | |
| Kukurydza (C ₄) | 15,4 | |
| Liście 7 gat. C ₃ | 19 średnio | [17] |
| Liście 5 gat. C ₄ | 18,7 średnio | |
| <i>Encelia californica</i> (C ₃) | 19,2 | |
| <i>Atriplex rosea</i> (C ₄) | 18,8 | |
| Średnio | 17,3 | |

Faktyczny wpływ fotooddychania na zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy można ocenić porównując wartości ZK fotosyntezy stwierdzone w warunkach normalnych (przy 21% O_2 , 0,03% CO_2 i temperaturach zbliżonych do temperatury optymalnej) z wartościami ZK fotosyntezy uzyskanymi w warunkach istotnie ograniczających fotooddychanie (przy obniżonym stężeniu O_2 lub podwyższonym stężeniu CO_2). Dane

uzyskane w takich warunkach przez różnych autorów, zebrane przez Campbella i Blacka [12], mieszczą się w zakresie 9 - 15 kwantów na 1 cz. CO₂. Średnio, zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy przebiegającej w warunkach ograniczających fotooddychanie wynosiło około 12 kwantów na 1 cz. CO₂.

TABELA 4

Zapotrzebowanie kwantowe (ZK) fotosyntezy uzyskane w warunkach ograniczających fotooddychanie, tj. przy obniżonym stężeniu O₂ lub podwyższonym stężeniu CO₂ [12]

| Material doświadczalny | ZK (kwantów × cz. ⁻¹ CO ₂) | Literatura |
|--|--|------------|
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (C ₃) | 9 | [18] |
| Liście 9 gat. C ₃ | 11 (minimum) | [55] |
| <i>Navicula minima</i> (C ₃) | 9 | [52] |
| | 9 | |
| <i>Atriplex patula</i> (C ₃) | 13,7 | [5] |
| <i>Atriplex patula</i> (C ₃) | 12,5 | [6] |
| | 12,5 | |
| | 15,4 | |
| Burak cukrowy (C ₃) | 11,9 | [41] |
| Liście 7 gat. C ₃ | 13,6 średnio | [17] |
| Średnio | 12 | |

Björkman [6] stosując w doświadczeniach liście *Atriplex patula* przy normalnych stężeniach CO₂ i O₂ uzyskiwał wartości ZK fotosyntezy 17 kwantów na 1 cz. CO₂, a przy ograniczających fotooddychanie niskich stężeniach O₂ (1,5%) wartość ZK fotosyntezy wynosiła tylko około 12 kwantów na 1 cz. CO₂.

W podobnych doświadczeniach Björkman i wsp. [5] uzyskiwali średnie wartości ZK fotosyntezy odpowiednio 19,5 i 13,7 kwantów na 1 cz. CO₂.

Podwyższenie stężenia CO₂ do 0,072% powodowało również obniżenie ZK fotosyntezy, w tym przypadku do średniej wartości 15,4 kwantów na 1 cz. CO₂.

Także Ehleringer i Björkman [17] badając 7 gatunków roślin C₃ uzyskiwali ZK fotosyntezy wynoszące średnio w normalnych warunkach 19,0 kwantów na 1 cz. CO₂, a w warunkach ograniczających fotooddychanie (przy 2% stężeniu O₂) — 13,6 kwantów na 1 cz. CO₂.

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez McCree [41] oraz Ehleringera i Björkmana [17] wskazują, że u roślin C₃ zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy zależy wyraźnie od temperatury i że jest większe w temperaturach wyższych. W skrajnych przypadkach autorzy ci

uzyskiwali wartości ZK fotosyntezy przekraczające 23 kwanty na 1 cz. CO₂. Dowodzi to, że w wyższych temperaturach zwiększa się zużycie energii w procesach metabolicznych roślin C₃ przebiegających na świetle, co jest prawdopodobnie głównie spowodowane wzrostem natężenia fotooddychania.

Analiza zebranych przez Campbella i Blacka [12] wyników badań przeprowadzonych przez różnych autorów (tabela 3) prowadzi do wniosku, że przy umiarkowanych temperaturach, normalnym stężeniu CO₂ i O₂ rośliny C₄ nie różnią się istotnie od roślin C₃ pod względem wartości zapotrzebowania kwantowego fotosyntezy. U roślin C₄ zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy nie zależy jednak od stężenia tlenu [9, 17]. U rośliny C₄ *Atriplex rosea* nie stwierdzono też wpływu temperatury zmienianej w zakresie od 12° do 39°C na zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy [17]. McCree [41] stwierdził natomiast, że u kukurydzy, przedstawiciela roślin C₄, zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy zwiększa się istotnie w miarę starzenia się rośliny, co jest prawdopodobnie spowodowane wzrastającym fotooddychaniem [10, 50, 58].

Przytoczone wyniki dowodzą, że fotooddychanie zwiększa zapotrzebowanie energetyczne rośliny, przy czym spowodowany tym procesem wzrost ZK fotosyntezy zależy od typu rośliny oraz od szeregu czynników zewnętrznych i wewnętrznych. U roślin C₃ rosnących w warunkach zbliżonych do optymalnych zwiększenie ZK fotosyntezy spowodowane fotooddychaniem wynosi około 30 - 40%, jednakże w szczególnych przypadkach może dochodzić do około 100%. Wyniki te wskazują ponadto, że w warunkach ograniczających fotooddychanie rzeczywiste ZK fotosyntezy jest znacznie większe od teoretycznego minimalnego ZK cyklu C₃ wynoszącego, jak podano wcześniej, około 9 kwantów na 1 cz. CO₂. Różnica występująca między danymi eksperymentalnymi a wartością teoretyczną odpowiada prawdopodobnie ilości energii potrzebnej dla dalszego przekształcania pierwotnych produktów fotosyntezy. Wartość fizjologicznego ZK fotosyntezy wyraża bowiem nie tylko energię zużywaną w reakcjach asymilacji i redukcji CO₂, lecz także w procesach transportu metabolitów, syntezy oligo- i polisacharydów, syntezy białek i w innych procesach niezbędnych dla funkcjonowania metabolizmu i wzrostu roślin, w których bezpośrednio lub pośrednio może być wykorzystana energia świetlna przetwarzana w fotosyntezie.

W licznych badaniach fizjologicznych prowadzonych z użyciem nie-naruszonych liści stwierdzono, że u roślin C₄ brak jest zewnętrznych przejawów fotooddychania, co może wskazywać, że proces ten nie występuje u roślin C₄ lub jest znacznie mniej intensywny niż u roślin C₃. W komórkach liści roślin C₄ wykazano jednak obecność enzymów katalizujących reakcje przemian kwasu glikolowego, których lokalizacja

wskazuje, że przynajmniej w komórkach pochwy okołowiązkowych proces fotooddychania może przebiegać [7, 10, 13, 15, 34]. Pomimo tego, u roślin C_4 zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy i natężenie asymilacji CO_2 w pewnym zakresie nie zależą od zmian stężenia O_2 , CO_2 oraz temperatury, co może powodować, że w odpowiednich warunkach środowiskowych rośliny C_4 charakteryzują się na ogół wyższym niż roślin C_3 natężeniem fotosyntezy. Dla wytłumaczenia tego wysunięto sugestię, że w wyniku funkcjonowania szlaku C_4 w miejscu działania karboksylazy/oksygenazy RuBP dwutlenek węgla występuje w zwiększonym stężeniu, hamującym fotooddychanie. Hatch [23] ocenia stężenie CO_2 w komórkach pochwy okołowiązkowych na 15 - 20 μM . Campbell i Black [12] uważają jednak, że nie może to być jedyną przyczyną wymienionych odmiennych właściwości aparatu fotosyntetycznego u roślin C_4 w porównaniu z właściwościami tegoż aparatu u roślin C_3 . Jeżeli bowiem K_m w stosunku do CO_2 karboksylazy RuBP wynosi 20 μM [10], to podane przez Hacha [23] stężenie CO_2 w komórkach pochwy okołowiązkowych byłoby jednak dużo niższe od stężenia wysycającego karboksylazę RuBP. Biorąc pod uwagę, że O_2 jest kompetycyjnym w stosunku do CO_2 inhibitorem karboksylazy RuBP należałoby więc w takich warunkach oczekiwać wyraźnych zmian natężenia asymilacji CO_2 oraz wartości ZK fotosyntezy przy zmianach stężenia O_2 również w zakresie stężeń od 2% do 21%. Campbell i Black [12] uwzględniając to, że takich zmian nie stwierdza się, chociaż stężenie O_2 wpływa na drogi przemian asymilowanego $^{14}CO_2$ [19, 20, 32], dochodzą do wniosku, że u roślin C_4 musi funkcjonować jeszcze inny mechanizm regulacji karboksylazy/oksygenazy RuBP, uniezależniający aktywność tego enzymu od zewnętrznego stężenia O_2 , CO_2 oraz w pewnym zakresie także i od temperatury.

WYDAJNOŚĆ PRZEKSZTAŁCANIA ENERGII ŚWIETLNEJ W FOTOSYNTEZIE

Na podstawie przytoczonych danych można oszacować potencjalną fotosyntetyczną wydajność przekształcania w liściu pochłoniętej energii świetlnej w energię chemiczną wytworzonych produktów fotosyntezy. W tym celu można przyjąć, że: a) fizjologiczne ZK fotosyntezy wynosi około 17 einsteinów $\cdot mol^{-1} CO_2$ (O_2), b) 1 einstein FAP wynosi średnio w przybliżeniu 50 kkal, c) związanie i redukcja w procesie fotosyntezy 1 mola CO_2 (lub wytworzenie 1 mola O_2) jest związane z akumulacją 112 kkal. Uwzględniając te założenia otrzymuje się, że wydajność akumulacji w fotosyntezie łącznie z fotooddychaniem pochłoniętego przez chlorofil FAP wynosi około 13%.

Bez strat energetycznych związanych z fotooddychaniem, tj. przy

ZK fotosyntezy równym 12 kwantów na 1 mol CO_2 , wydajność ta wynosiłaby około 19%. Natomiast teoretyczna wydajność akumulacji FAP w fotosyntezie uzyskana przy uwzględnieniu w obliczeniach ZK cyklu C_3 łącznie z fotooddychaniem (11 kwantów na 1 cz. CO_2) lub tylko ZK cyklu C_3 (9 kwantów na 1 cz. CO_2) wynosiłaby odpowiednio około 19% i 25%.

Obliczona na podstawie wielkości fizjologicznego ZK maksymalna wydajność przekształcania energii świetlnej w fotosyntezie, wynosząca około 13%, jest zbliżona do maksymalnej wartości współczynnika akumulacji FAP w roślinach, który — jak podaje Listowski [36] — może w praktyce dochodzić do 12-14% padającego na roślinę FAP. Oznacza to, że w optymalnych warunkach, przy maksymalnym wykorzystaniu FAP w fotosyntezie, w przybliżeniu cała energia docierającego do liści FAP jest efektywnie pochłaniana przez chlorofil. W takich warunkach czynnikiem ograniczającym fotosyntezę i produkcję masy roślinnej jest fizjologiczne zapotrzebowanie kwantowe fotosyntezy.

Możliwość osiągnięcia w praktyce stopnia akumulacji energii FAP w wytworzonej masie roślinnej zbliżonego do wydajności przekształcania pochłoniętej energii świetlnej wyznacza potencjalną fotosyntetyczną wydajność roślin. Wydajność ta na podstawie obliczeń teoretycznych, potwierdzonych w praktyce, może być określona na przeszło 10-krotnie wyższą od aktualnie uzyskiwanej w uprawach roślinnych. Teoretycznie, istnieje więc duży zakres podwyższania produktywności roślin uprawnych przez zwiększanie stopnia efektywnego pochłaniania docierającej do roślin energii FAP. Wydaje się, że jest to możliwe do osiągnięcia przez dobór odpowiednich roślin i optymalizację ich uprawy.

Dalsze zwiększanie wydajności fotosyntetycznej roślin wymagałoby zmniejszenia strat związanych z fotochemicznymi i biochemicznymi reakcjami fotosyntezy, fotooddychaniem i innymi procesami metabolicznymi. Mimo że podjęte zostały w tym kierunku próby, droga ta obecnie wydaje się mało realna.

Warto też zwrócić uwagę na to, że intensywniejsza fotosynteza u roślin C_4 w porównaniu z fotosyntezą u roślin C_3 oraz w niektórych przypadkach duża produktywność tych roślin (np. u kukurydzy, trzciny cukrowej) są związane z podwyższonym zapotrzebowaniem kwantowym fotosyntezy. Wskazuje to, że droga do podwyższania produktywności roślin może prowadzić przez zwiększenie fizjologicznego zapotrzebowania kwantowego fotosyntezy, a nie przez zmniejszenie tak jak w podjętych próbach [16, 47-49, 57, 59] mających na celu wyeliminowanie fotooddychania.

LITERATURA

- [1] ANDREWS T. J., LORIMER G. M., TOLBERT N. E., Ribulose diphosphate oxygenase. I. Synthesis of phosphoglycolate by fraction-1 protein of leaves, *Biochemistry*, **12**: 11 - 18, 1973.
- [2] BECK E., Glycolate synthesis, [w] *Encyclopedia of Plant Physiology New Series*, tom 6, Photosynthesis II, red. M. Gibbs, E. Latzko, Springer Verlag 1979, 325 - 337.
- [3] BIRD I. F., CORNELIUS M. I., KEYS A. I., WHITTINGHAM C. P., Oxidation and phosphorylation associated with the conversion of glycine to serine, *Phytochemistry*, **11**: 1587 - 1594, 1972.
- [4] BJÖRKMAN O., HIESEY W. M., NOBS M. A., Light utilization in ecological races of *Mimulus cardinalis*. *Carnegie Inst. Yearbook*, **64**: 420 - 425, 1965.
- [5] BJÖRKMAN O., GAUHL E., NOBS M. A., Comparative studies of *Atriplex* with and without β -carboxylation photosynthesis and the first generation hybrids. *Carnegie Inst. Wash. Yearbook*, **68**: 620 - 633, 1970.
- [6] BJÖRKMAN O., Interaction between the effects of oxygen and CO₂ concentration on quantum yield and light-saturated rate of photosynthesis in leaves of *Atriplex patula* ssp. *spicata*, *Carnegie Inst. Yearbook*, **70**: 520 - 526, 1971.
- [7] BLACK C. C., Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO₂ uptake, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**: 253 - 287, 1973.
- [8] BOWES G., OGREN W. L., HAGEMAN R. H., Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose-diphosphate carboxylase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**: 716 - 722, 1971.
- [9] BULLEY N. R., NELSON C. D., TREGUNA E. B., Photosynthesis: action spectra for leaves in normal and low oxygen, *Plant Physiol.*, **44**: 678 - 684, 1969.
- [10] BURRIS R. H., BLACK C. C., (red.), CO₂ Metabolism and Plant Productivity, str. 431, University Park Press, Baltimore, London, Tokyo 1976.
- [11] CALVIN M., Photosynthesis as a resource for energy and materials, *Photochemistry and Photobiology*, **23**: 425 - 444, 1976.
- [12] CAMPBELL W. H., BLACK C. C., The relationship of CO₂ assimilation pathways and photorespiration to the physiological quantum requirement of green plant photosynthesis, *BioSystems*, **10**: 253 - 264, 1978.
- [13] CANVIN D. T., Photorespiration: Comparison Between C₃ and C₄ Plants, [w] *Encyclopedia of Plant Physiology New Series*, tom 6, Photosynthesis II, red. M. Gibbs, E. Latzko, Springer Verlag 1979, 368 - 396.
- [14] CHEN T. M., BROWN R. H., BLACK C. C., Photosynthetic activity of chloroplasts isolated from Bermudagrass (*Cynon dactylon* L.), a species with a high photosynthetic capacity, *Plant Physiol.*, **44**: 649 - 654, 1969.
- [15] CHOLLET R., OGREN W. L., Regulation of photorespiration in C₃ and C₄ species, *Bot. Rev.*, **41**: 137 - 179, 1975.
- [16] CHOLLET R., Effect of glycidate on glycolate formation and photosynthesis in isolated spinach chloroplasts, *Plant Physiol.*, **57**: 237 - 240, 1976.
- [17] EHLERINGER J., BJÖRKMAN O., Quantum yields for CO₂ uptake in C₃ and C₄ plants, dependence on temperature, CO₂, and O₂ concentration, *Plant Physiol.*, **59**: 86 - 90, 1977.
- [18] EMERSON R., LEWIS C. M., The dependence of the quantum yield of chlorella photosynthesis on wave length of light, *Am. J. Bot.*, **30**: 165 - 178, 1943.

- [19] FOSTER A., BLACK C. C., *Panicum maximum* photosynthesis, *Plant Cell Physiol.*, Special Issue Three, str. 325 - 340, 1977.
- [20] GLACOLEVA T. A., ZALENSKY O. V., Oxygen effects on photosynthesis and ^{14}C metabolism in desert plants, *Plant Physiol.*, 62: 204 - 209, 1978.
- [21] HALL D. O., Photobiological energy conversion, *FEBS Letters*, 64: 1 - 16, 1976.
- [22] — Solar energy conversion through biology — could it be a practical energy source? *Fuel*, 57: 322 - 333, 1978.
- [23] HATCH M. D., The C_4 pathway of photosynthesis: Mechanism and function, [w] *CO₂ Metabolism and Plant Productivity*, red. R. H. Burris, C. C. Black, Univ. Park Press, Baltimore 1976, 59 - 81.
- [24] JENSEN R. G., Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylase-Oxygenase, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28: 379 - 400, 1977.
- [25] KAMIŃSKA Z., GUTKOWSKI R., MALESZEWSKI S., Photosynthesis in bean leaves treated with α -hydroxy-2-pyridine-methanesulfonic acid (α -PHMS), the glycolic acid oxidase inhibitor, *Z. Pflanzephysiol.*, 91: 17 - 24, 1979.
- [26] KAMIŃSKA Z., MALESZEWSKI S., The effect of O_2 and CO_2 concentration on photosynthesis and glycolate accumulation in bean leaves treated with α -hydroxy-2-pyridinemethanesulfonic acid (α -HPMS), the glycolate oxidase inhibitor, *Photosynthesis Research*, 1: 45 - 51, 1980.
- [27] KANIUGA Z., Regulacja włączania CO_2 w procesie fotosyntezy, *Post. Biochem.*, 22: 247 - 305, 1976.
- [28] — Regulacja fotooddychania. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego CCCCLXIV, *Prace z Biologii Molekularnej*, z. 4: 75 - 84, 1977.
- [29] KELLY G. J., LATZKO E., GIBBS M., Regulatory aspects of photosynthetic carbon metabolism, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 27: 181 - 205, 1976.
- [30] KOK B., Photosynthesis: The path of energy, [w] *Plant Biochemistry*, red. I. Bonner, I. E. Varner, Acad. Press, New York 1965, 903 - 960.
- [31] LAING W. A., OGREN W. L., HAGEMAN R. H., Regulation of soybean net photosynthetic CO_2 fixation by the interaction of CO_2 , O_2 and ribulose 1,5-diphosphate carboxylase, *Plant Physiol.*, 54: 678 - 685, 1974.
- [32] LEWANTY Z., MALESZEWSKI S., POSKUTA J., The effect of oxygen concentration on ^{14}C incorporation into products of photosynthesis of detached leaves of maize, *Z. Pflanzenphysiol.*, 65: 469 - 472, 1971.
- [33] LIETH H., Predicted annual fixation of carbon for the land masses and oceans of the world, [w] *Ecological Studies 1*, red. E. Reichle, Berlin, Heidelberg, New York 1970.
- [34] LIU A. Y., BLACK C. C., Glycolate metabolism in mesophyll cells and bundle sheath cells isolated from crabgrass, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., *Leaves*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 149: 269 - 280, 1972.
- [35] LISTOWSKI A., Z zagadnień fizjologii plonowania, *Post. N. Roln.*, 4: 3 - 34, 1975.
- [36] — Agrofizjologiczne podstawy produktywności roślin, PWN, Warszawa 1979.
- [37] LOOMIS R. S., WILLIAMS W. A., HALL A. E., Agricultural productivity, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 22: 431 - 468, 1971.
- [38] LORIMER G. M., ANDREWS T. J., TOLBERT N. E., Ribulose diphosphate oxygenase. II. Further proof of reaction products and mechanism of action, *Biochemistry*, 12: 18 - 23, 1973.
- [39] ŁYKOWSKI B., Wykorzystanie promieniowania słonecznego przez żyto i ziemniaki, *Materiały III Seminarium Fitoaktywności w Puławach*, 1975.

- [40] MALESZEWSKI S., Tlen jako element regulacji fotosyntezy, *Post. Biochem.*, **20**: 379 - 402, 1974.
- [41] McCREE K. J., The action spectrum, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants, *Agric. Meteorol.*, **9**: 191 - 216, 1972.
- [42] MIFLIN B. J. LEA P. J., The pathway of N-assimilation in plants. *Phytochemistry*, **15**: 879 - 885, 1976.
- [43] MOORE A. L., JACKSON C., HALLIWELL B., DENCH J. E., HALL D. O., Intramitochondrial localization of glycine decarboxylase in spinach leaves, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**: 483 - 491, 1977.
- [44] NICHIPOROVICH A. A., The role of plants in the bioregenerative systems, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **20**: 185 - 208, 1969.
- [45] — Energetическая эффективность и продуктивность фотосинтезирующих систем как интегральная проблема, *Физиол. Раст.*, **25**: 922 - 937, 1978.
- [46] OLECH K., KUZ M., BLAMOWSKI Z. K., STANEK R., Wykorzystywanie energii promieniowania słonecznego przez uprawy polowe, *Postępy Nauk Rolniczych*, **2/157**: 3 - 18, 1976.
- [47] OLIVER D. J., ZELITCH I., Increasing photosynthesis by inhibiting photorespiration with glyoxylate, *Science*, **196**: 1450 - 1451, 1977.
- [48] QUEBEDEAUX B., HARDY R. W. F., Oxygen as a new factor controlling reproductive growth, *Nature*, **243**: 477 - 479, 1973.
- [49] — Reproductive growth and dry matter production of *Glycine max* (L.) Merr in response to oxygen concentration, *Plant Physiol.*, **55**: 102 - 107, 1975.
- [50] RABINOVITCH E. I., Photosynthesis and related processes, tom 2, część 2, Wiley Interscience, New York 1956, 1211 - 2088.
- [51] SETLIK I., Ukoly a cile wyzkumu fotosyntezy u porostu kulturanych rastlin, [w] *Metody studia fotosyntheticke produkce rastlin*, red. W. Z. Šestak, I. Čat-sky, Akademia, Praha 1966, 54 - 104.
- [52] TANADA T., The photosynthetic efficiency of carotenoid pigments in *nericula minima*, *Am. J. Bot.*, **38**: 276 - 283, 1951.
- [53] TOLBERT N. E., Glycolate biosynthesis, [w] *Current Topics in Cellular Regulation*, Acad. Press, N. Y., **7**: 21 - 50, 1973.
- [54] — Glycolate metabolism by higher plants and algae, [w] *Encyclopedia of Plant Physiology New Series*, tom 6. Photosynthesis II, red. M. Gibbs, E. Latzko, Springer Verlag 1979, 338 - 352.
- [55] WASSINK E. C., Experiments on photosynthesis of horticultural plants, with the aid of the Warburg method, *Enzymologia*, **12**: 33 - 55, 1946.
- [56] WOO K. C., OSMOND C. B., Glycine decarboxylation in mitochondria isolated from spinach leaves, *Aust. J. Plant Physiol.*, **3**: 771 - 785, 1976.
- [57] ZELITCH I., Increased rate of net photosynthetic carbon dioxide uptake caused by the inhibition of glycolate oxidase, *Plant Physiol.*, **41**: 1623 - 1631, 1966.
- [58] — Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity, Acad. Press, N. Y. 1971.
- [59] — The effect of glycidate, an inhibitor of glycolate synthesis, on photorespiration and net photosynthesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **163**: 367 - 377, 1974.
- [60] — Improving the efficiency of photosynthesis, *Science*, **188**: 625 - 633, 1975.
- [61] — Photorespiration: Studies with Whole Tissues, [w] *Encyclopedia of Plant*

Physiology New Series, tom 6. Photosynthesis II, red. M. Gibbs, E. Latzko, Springer Verlag 1979, 353 - 367.

[62] ZURZYCKI J., Fotosynteza a problemy wyżywienia, Nowości Nauki i Techniki, Warszawa 1963.

Otrzymano: 27 lutego 1981.

Przyjęto: 4 marca 1981.

Adres autorów: Krakowskie Przedmieście 26/28, 00 - 927 Warszawa.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem histologicznym, anatomicznym i embriologicznym.

Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

Prace należy przysyłać w dwu egzemplarzach — zarówno tekst, jak i załączniki. Objętość tekstu (bez rysunków wraz z objaśnieniami) nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie, z podwójną interlinią, marginesem około 4 cm po lewej stronie oraz ponumerowany. W tekście nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem.

Na pierwszej stronie należy podać, przed tekstem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, pod nim imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów oraz nazwę zakładu naukowego, w którym autorzy pracują, następnie krótkie streszczenie (ok. 1/2 strony) — również w języku polskim i angielskim. Za streszczeniem, z pozostawieniem około 5 cm odstępu, następuje tekst główny. W tekście nie należy zamieszczać żadnych tabel, rysunków, fotografii ani schematów. Dla ustalenia ich lokalizacji należy pozostawić wolny wiersz w żądanym miejscu i odpowiednio zaznaczyć ołówkiem na marginesie: tab. 1, ryc. 1 itp.

Tekst podzielony na rozdziały jest bardziej przejrzysty. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Za tekstem należy dołączyć spis literatury. Powinna być ona ułożona w porządku alfabetycznym. Powoływanie się na cytowaną literaturę następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach prostokątnych, np. [5].

Przykłady cytowania literatury:

- [1] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] Histone and Nucleohistones, red. D. M. P. Philips, Plenum Press. London, New York 1977, 60-64.
- [2] Sachsenmayer W., Remy U., Plattner R., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, Exptl. Cell. Res., 73: 41-48, 1972.

Tabele należy dołączyć na oddzielnych kartkach — każda powinna być podpisana. Rysunki, schematy, fotografie należy dołączyć w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Fotografie powinny być na błyszczącym papierze, kontrastowe. Podpisy pod ryciny powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Przy załącznikach powinno być podane ich pochodzenie.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów.

Autor na życzenie Redakcji obowiązany jest zrobić korektę autorską, którą powinien zwrócić w ciągu 3 dni. Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi Autor.

Artykuły honorowane są według ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 nadbitek bezpłatnie.

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

- do dnia 25 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV, Oddział w Warszawie, Nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter), 00-901 Warszawa, oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

Subscription orders for all the magazines published in Poland are available through the local press distributors or directly through the Foreign Trade Enterprise

ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

SPIS TREŚCI

| | |
|---|-----|
| P. M. VIGNAIS, J. MEYER AND P. C. HALLENBECK, Photoproduction of H ₂ photosynthetic bacteria. Hydrogenase-nitrogenase interrelationship | 141 |
| W. HENDRICH, Fotobiologiczne wytwarzanie wodoru | 163 |
| G. MAJEWSKA i S. WIĘCKOWSKI, Struktura błon ty-lakoidów a proces fosforylacji fotosyntetycznej | 183 |
| S. MALESZEWSKI i G. BYSTRZEJEWSKA, Czynniki biofizyczne i biochemiczne warunkujące produktywność fotosyntetyczną roślin | 211 |