

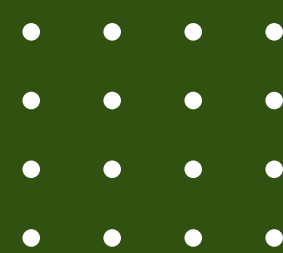


UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU

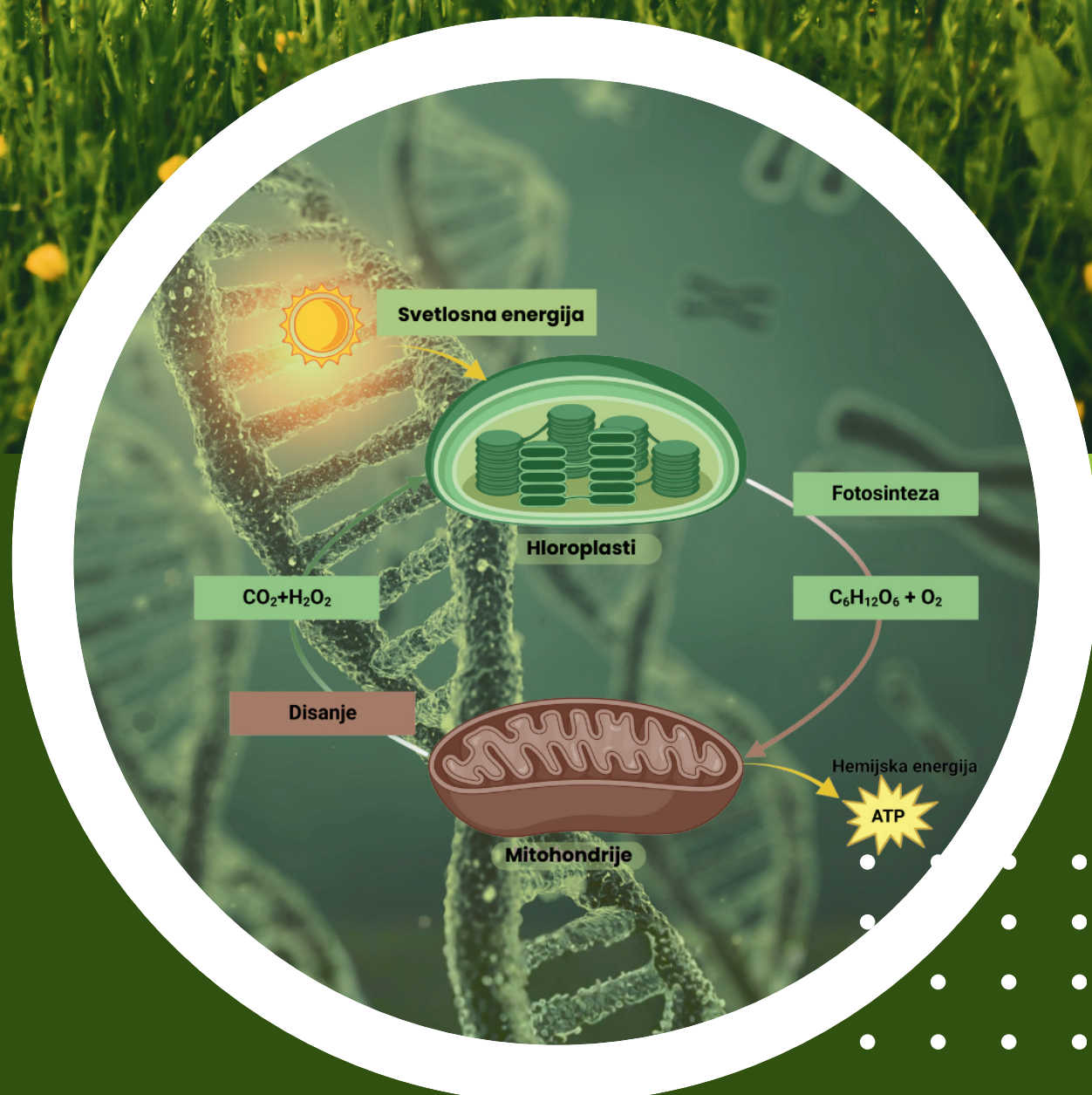


Slobodanka Pajević
Danijela Arsenov

METABOLIZAM I ENERGETIKA BILJAKA



Novi Sad
2025.



Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство – некомерцијално – без прерада¹.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.



¹ Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси creativecommons.org.rs/?page_id=74.

"Сва права задржава издавач. Забрањена је свака употреба или трансформација електронског документа осим оних који су експлицитно дозвољени Creative Commons лиценцом која је наведена на почетку публикације."

"Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative Commons licencom koja je navedena na početku publikacije."



Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za biologiju i ekologiju

METABOLIZAM I ENERGETIKA BILJAKA

Slobodanka Pajević
Danijela Arsenov

Novi Sad, 2025.

Upotreba rukopisa kao univerzitetskog udžbenika, štampanje i elektronsko izdavanje odobreni su, Odlukom Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu br. 0602-07-121/25-7 od 13.11.2025. godine i Rešenjem br. 0602-07-121/25-9 od 21.11.2025. godine.

Recenzenti:

1. dr Neda Mimica-Dukić, profesor emeritus Univerziteta u Novom Sadu
2. dr Ivana Maksimović, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
3. dr Željko Popović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

Lektura i korektura:

Dr Željko Popović

Izdavač:

Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet;

Glavni i odgovorni urednik:

dr Srđan Rončević, redovni profesor, dekan

Autori originalnih slika, šema i crteža:

Dr Slobodanka Pajević

Dr Danijela Arsenov

Ostale slike preuzete su sa licencama.

Autor naslovne strane:

Dr Milan Borišev

Prelom teksta:

Autori

Štampa:

Sajnos, Novi Sad

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

581.13:54-71(075.8)(076)

ПАЈЕВИЋ, Сlobоданка, 1961-

Metabolizam i energetika biljaka / Slobodanka Pajević, Danijela Arsenov. - Novi Sad : Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, 2025 (Novi Sad : Sajnos). - 159 str. : ilustr. ; 30 cm

Tiraž 30. - Bibliografija.

ISBN 978-86-7031-716-1

1. Арсенов, Данијела, 1988-
а) Биљке -- Метаболизам

COBISS.SR-ID 181509897

PREDGOVOR

Rezultati naučnih istraživanja biljnog metabolizma na nivou biomolekula i molekularno - genetičkih regulatornih mehanizama subćelijskog i ćelijskog nivoa, te na novou tkiva, organa i celih biljaka značajno su poslednjih decenija doprineli razumevanju kompleksnih i međusobno zavisnih fizioloških procesa tokom rasta i razvika biljaka.

Razvojem molekularne biologije/fiziologije, biohemije, biofizike, te primenom savremenih metoda istraživanja, fundamentalno izučavanje biljnog metabolizma dobija integrativni karakter, pri čemu se profilu specifične podoblasti, koje se odnose na procese fotosinteze i ćelijskog disanja sa zajedničkim imeniteljem ovih esencijalnih metaboličkih procesa, a to je promet energije, odnosno, spregnute reakcije sinteze (anabolizam) i razgradnje (katabolizam) u intraćelijskom i interćelijskom metaboličkom prostoru. Konverzija energije, od svetlosne (spoljašnje energije elektromagnetnog zračenja) do unutarćelijske hemijske (deponovane u hemijskim vezama sintetisanih organskih molekula $-CH_2O$), zatim u ATP (GTP, UTP), NAD(P)H i dr.

Sledeći osnovne teorijske pretpostavke i savremeno naučno-utemeljeno razumevanje biljnog metabolizma i uloge biljaka u brojnim, esencijalnim procesima na Zemlji, pre svega u primarnoj organskoj produkciji, udžbenik pod naslovom „Metabolizam i energetika biljaka” koncipiran je da kroz dva glavna poglavlja: 1. Fotosinteza i 2. Ćelijsko disanje (Respiracija), studentima viših godina osnovnih, masterskih i doktorskih studija biološkog i ekološkog profila, pruži najnovija saznanja iz oblasti biljnog metabolizma.

Želja autora je bila da se korišćenjem svetske literature, sa akcentom na najsavremenijim naučnim radovima (163 literaturnih referenci), pruži studentima (i istraživačima) uvid u aktuelna naučna i stručna dostignuća u okviru uže naučno-istraživačke oblasti Fiziologija biljaka, odnosno, Fiziologija i molekularna biologija biljaka.

Udžbenik „Metabolizam i energetika biljaka” namenjen je studentima biologije, molekularne biologije i ekologije kao osnovna ili dodatna literatura za grupu fizioloških predmeta na sva tri nivoa studija, pre svega, to su:

Osnovne studije:

- Bioenergetika i metabolizam biljaka (osnovni udžbenik)
- Fiziologija biljaka

Masterske studije:

- Fiziološki i molekularni osnovi stresa kod biljaka

Doktorske studije:

- Fiziološka ekologija biljaka

Udžbenik, treba da studentima omogući ostvarenje jasno definisanih ishoda učenja, a to je pre svega, razvijanje integrativnog pristupa u razumevanju metaboličkih procesa u biljkama. Sveobuhvatno stečeno znanje na nivou biljnog metabolizma studenti će moći da koriste i u aplikativnim granama biologije poput biotehnologije, poljoprivrede i šumarstva koje zahtevaju razumevanje funkcionalnih procesa u biljkama.

Nadamo se da će ovaj udžbenik biti od pomoći u savladavanju gradiva studentima različitih fakulteta na kojima se izučava Fiziologija biljaka i njoj srodni predmeti, kao što je Fiziološka ekologija biljaka, Mehanizmi ekoloških adaptacija, Fitoremedijacija, Biohemija biljaka i dr.

Izvodi iz recenzija:

1. „Rukopis ispunjava sve kriterijume udžbeničke literature. Među referencama dominiraju one novijeg datuma, što umnogome doprinosi visokoj naučnoj relevantnosti i aktuelnosti ovog dela. Rukopis je ilustrovan sa velikim brojem slika i šema. Za svaku sliku naveden je originalan izvor. Slike su pažljivo odabrane tako

da umnogome doprinose lakšem razumevanju veoma kompleksnih biohemijskih mehanizama i pojmova. S obzirom na širinu koju obuhvata i najnoviju literaturu koja je korišćena ovaj udžbenik ima značajan naučni potencijal te se preporučuje i kao dopunska literatura za studente masterskih i doktorskih studija ne samo biologije već i srodnih nauka, prvenstveno biohemije, biofizike i dr. Zbog toga toplo preporučujem da se rukopis pod nazivom „METABOLIZAM I ENERGETIKA BILJAKA“ autora Slobodanke Pajević i Danijele Arsenov prihvati za objavljivanje kao univerzitetski udžbenik.” Prof. emeritus Neda Mimica-Dukić

2. „Tekst rukopisa Metabolizam i energetika biljaka napisan je pregledno i jasno, čemu značajno doprinose i veoma dobro odabrane i pripremljene ilustracije. Pitanja i mehanizmi koji su obuhvaćeni složenim reakcijama koje čine anabolizam i katabolizam biljaka su u tekstu obrađeni sa velikom pažnjom i očiglednom namerom i veštinom da se ova nimalo laka materija približi studentima različitih nivoa studija. To je bio izazovan zadatak postavljen pred autorke, Slobodanku Pajević i Danijelu Arsenov, koji su one veoma uspešno rešile. Smatram da će predloženi rukopis biti vrlo korisna literatura ne samo u savladavanju gradiva iz predmeta koje izučavaju studenti u okviru svojih studijskih programa, nego i naučnim radnicima i stručnjacima koji se u svom radu sreću sa ovom dinamičnom oblašću biologije biljaka. Literaturni izvori su veoma pažljivo odabrani i kredibilni. Potpoglavlja u knjizi su dobro izbalansirana, a ilustracije i tabele značajno doprinose kvalitetu teksta u celini i njegovoj vrednosti kao univerzitetskog udžbenika.“ Prof. dr Ivana Maksimović, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet

3. „Predloženi rukopis univerzitetskog udžbenika pod naslovom „Metabolizam i energetika biljaka” u potpunosti ispunjava sve zahteve univerzitetsko-nastavne literature za predmete Fiziologija biljaka, Fiziologija i molekularna biologija biljaka, Bioenergetika i metabolizam biljaka. Rukopis ima vrlo visok stručni nivo koji odgovara univerzitetskom udžbeniku, a uzimajući specifičnu tematiku, neki njegovi delovi mogu se koristiti i na višim nivoima studija, kao i za profesionalce iz srodne naučno-stručne javnosti (npr. inž. zaštite bilja, hortikulture, ratarstva i povrtarstva, voćarstva i sl.). Budući da ovo delo značajno bogati naučno-stručnu literaturu iz oblasti biohemije i fiziologije biljaka, sa velikim zadovoljstvom i čašću predlažem da se „Metabolizam i energetika biljaka“, autorki prof. dr Slobodanke Pajević i dr Danijele Arsenov, više naučne saradnice, objavi kao udžbenik Univerziteta u Novom Sadu.“ Prof. dr Željko Popović, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet.

U Novom Sadu, Novembar 2025. godine

Autori:

Slobodanka Pajević i Danijela Arsenov

SADRŽAJ

1. Fotosinteza	1
1.1. Bioenergetski i globalni značaj fotosinteze	1
1.2. Svetlost i fotosinteza: fotosintetički aktivna radijacija (FAR, ili PAR); akcioni i apsorpcioni spektri	3
1.3. Struktura fotosintetičkog aparata: hloroplasti, tilakoidi, fotosintetički pigmenti	7
1.3.1. Hloroplasti	8
1.3.1.1. Stroma hloroplasta	8
1.3.1.1.1. Hloroplastni genom (plastom)	9
1.3.1.2. Tilakoidi hloroplasta	10
1.3.2. Fotosintetički pigmenti	10
1.3.2.1. Hlorofili	10
1.3.2.1.1. Biosinteza hlorofila	13
1.3.2.2. Karotenoidi	18
1.3.2.2.1. Biosinteza karotenoida	20
1.4. Molekularna organizacija tilakoida: fotosintetički aparat - fotosintetičke jedinice	21
1.4.1. Struktura fotosintetičkog aparata viših biljaka	22
1.5. Mehanizam fotosinteze	23
1.5.1. Svetlosne reakcije fotosinteze	24
1.5.1.1. Apsorpcija svetlosti	25
1.5.1.1.1. Apsorpcija svetlosti i rezonantni transport energije u antena kompleksima (LHC)	27
1.5.1.1.2. Apsorpcija svetlosti u reakcionim centrima fotosistema (RC FS)	29
1.5.1.2. Transport elektrona	30
1.5.1.2.1. Linearni transport elektrona – Z šema	30
1.5.1.2.1.1. Fotosistem II: Struktura-molekularna organizacija i transport elektrona kroz PS II	33
1.5.1.2.1.2. Citohrom b_6/f : Struktura, molekularna organizacija i transport elektrona	38
1.5.1.2.1.3. Fotosistem I (PS I): Struktura-molekularna organizacija i transport elektrona	39
1.5.1.2.1.4. Hloroplastna H^+ATP -sintaza (H^+ATP sin): struktura, molekularna organizacija i funkcija	41
1.5.1.2.2. Ciklični transport elektrona (CEF, engl. Cyclic Electron Flux): alternativni fotosintetički tok elektrona oko PS I	44
1.5.1.2.3. Fotosintetički pseudo-ciklični transport elektrona (PCEF, engl. Pseudocyclic Electron Flux, ili Mehler-ova reakcija): alternativni fotosintetički tok elektrona kroz PS I do kiseonika/Voda-Voda ciklus	46
1.5.2. Tamne reakcije fotosinteze – Calvin-Bensonov ciklus: C_3 karbonski ciklus (C_3 – fotosinteza)	47
1.5.2.1. Regulatorni mehanizmi Calvin-Bensonovog ciklusa	54
1.5.2.1.1. Oksidativni pentozno-fosfatni ciklus u hloroplastima (OPPC): sinteza pentoza za regeneraciju RuBP i NADPH u mraku	54
1.5.2.1.2. Enzimi Calvin-Bensonovog ciklusa (RPPC) i njihova katalitička aktivnost	55
1.5.2.1.2.1. Enzim ribuloza-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (Rubisco)	55

1.5.2.1.2.2. Katalitička aktivnost nekih enzima Calvin-Bensonovog ciklusa regulisana je direktno svetlošću, preko feredoksin- tioredoksin sistema (Fd/Trx sistema)	57
1.5.2.1.2.3. Svetlošću indukovano kretanje jona kroz tilakoidne membrane i promena pH strome hloroplasta utiče na katalitičku aktivnost enzima Calvin-Benson-ovog ciklusa.....	59
1.5.3. Fotorespiracija: C_2 – oksidativni fotosintetički put ugljenika/ C_2 -ciklus	60
1.5.4. Tamne reakcije fotosinteze – Calvin-Bensonov ciklus: C_4 i CAM karbonski ciklusi (C_4 i CAM fotosinteza)	63
1.5.4.1. C_4 -ciklus ugljenika (C_4 -fotosinteza)	63
1.5.4.2. CAM ciklus ugljenika (engl. Crassulacean Acid Metabolism/CAM-fotosinteza)	69
1.5.5. Sinteza primarnih produkata fotosinteze (neto-fotosintetička produkcija)	72
1.5.5.1. Sinteza skroba na svetlosti i njegovo nakupljanje u obliku nerastvorljivih granula u stromi hloroplasta	72
1.5.5.2. Razgradnja skroba noću – biohemijski put i enzimi	76
1.5.5.3. Sinteza saharoze u citoplazmi - biohemijski put i enzimi	78
1.5.5.4. Biohemijska regulacija konverzije saharoze u skrob u organima za deponovanje asimilata (u tzv. „ušću asimilata“)	80
1.5.6. Transport (translokacija) asimilata	83
1.5.6.1. Punjenje floema: snabdevanje floema asimilatima iz izvora asimilata – fotosintetičkog tkiva	85
1.5.6.2. Pražnjenje floema: odavanje asimilata iz floema u tkiva/organe za deponovanje (ušće asimilata)	86
1.5.7. Fotosinteza i prinos	88
1.5.8. Fotoinhibicija.....	91
1.6 Literatura	95
1.6.1. Elektronski izvori slika	100
2. Ćelijsko disanje (respiracija).....	103
2.1. Bioenergetski i globalni značaj ćelijskog disanja biljaka	103
2.2. Mitohondrije – semiautonomne organele: struktura i funkcija.....	104
2.2.1. Mitohondrijski genom (mitogenom):	105
2.3. Stvaranje ATP-a iz glukoze/saharoze; Standardna Gibsova slobodna energija (ΔG^0)	106
2.4. Organske materije – supstrati ćelijskog disanja	111
2.4.1. Hidroliza skroba u plastidu i eksport intermedijera – supstrata za glikolizu.....	113
2.4.2. Hidroliza proteina i eksport intermedijera – supstrata za ćelijsko disanje	114
2.4.3. Hidroliza lipida i eksport intermedijera – supstrata za ćelijsko disanje	115
2.4.3.1. Lipidni metabolizam: od rezervnih lipida do ugljenih hidrata – supstrata ćelijskog disanja	117
2.5 Glikoliza	121
2.5.1. Regulacija i energetika glikolize	125
2.6. Oksidativni pentozno-fosfatni put (OPPP) – Ciklus oksidativne razgradnje glukoze u citoplazmi i hloroplastima - direktna oksidacija glukoze.....	127

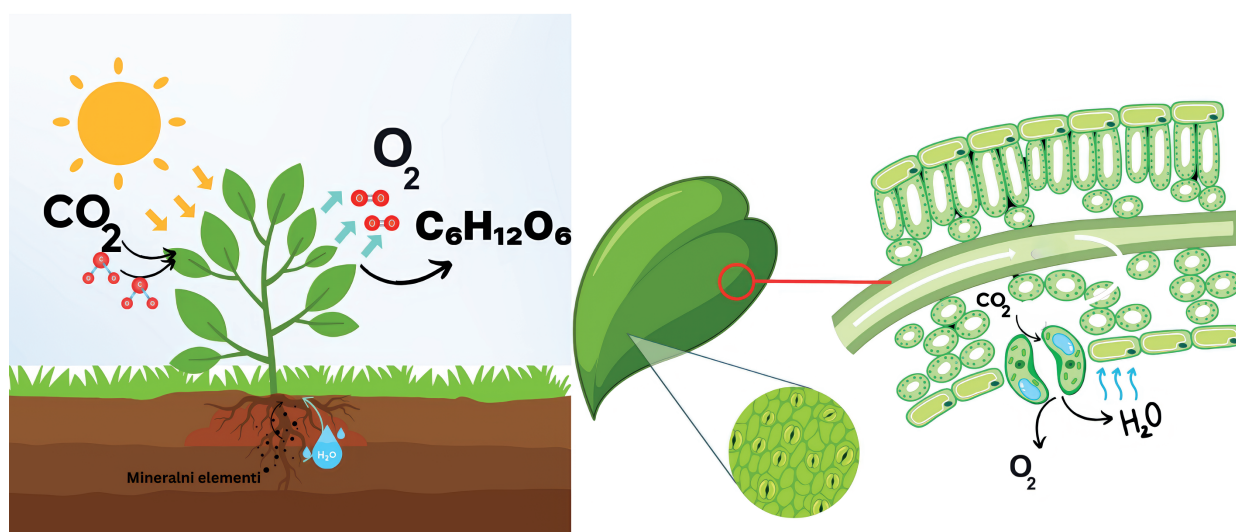
2.7. Nastanak, prevođenje i promet NADP(H), NAD(H) i FAD(H ₂) u biljnoj ćeliji.....	129
2.8. Standardni elektrohemijski (redukциони) potencijal redoks polureakcija ($\mathcal{E}^0$) i Standardna Gibsova slobodna energija (ΔG^0) u oksido-redukcionim reakcijama ćelijskog metabolizma.....	130
2.9. Formiranje Acetil-CoA u mitohondrijama	132
2.10. Ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus ili Ciklus trikarboksilne kiseline – TCA ciklus).....	133
2.10.1. Produkti Ciklusa limunske kiseline	136
2.10.2. Enzimi Ciklusa limunske kiseline	137
2.10.3. Specifičnosti Ciklusa limunske kiseline biljnih ćelija	137
2.11. Elektronski transportni lanac (ETC, engl. „electron-transport chain“)	138
2.11.1. Komponente elektronskog transportnog lanca	140
2.12. Alternativni biohemijski putevi u elektronskom transportnom lancu	145
2.13. Oksidativna fosforilacija (sinteza ATP) – spregnuta reakcija fosforilacije i transporta elektrona	147
2.14. Fermentacija (vrenje)	155
2.15. Literatura	157
2.15.1. Elektronski izvori slika	159

1. FOTOSINTEZA

1.1. Bioenergetski i globalni značaj fotosinteze

Biološki smisao: korišćenje svetlosne energije i njeno nakupljanje u vidu stabilnih organskih jedinjenja koja zatim služe kao izvor energije za metabolizam ćelija, odnosno, za sve energetske procese živog sveta planete.

Transformacija energije: svetlosna $\rightarrow$ električna $\rightarrow$ hemijska (energija makroenergetskih jedinjenja: ATP, NADPH) $\rightarrow$ hemijska energija deponovana u hemijskim vezama organskih molekula (CH_2O).



Sl. 1.1. Fotosinteza.

Fotosinteza je bez sumnje, najvažniji biološki proces koji direktno, ili indirektno obezbeđuje život na Zemlji (Sl.1.1). Naziv *Fotosinteza* (engl. photosynthesis) izveden je od grčke reči „svetlost“ (gr. φως) i reči koja se odnosi na sintezu, odnosno „sastav – sastavljanje“ (gr. σύνθεσις), što bi izvorno i opisivalo suštinu procesa: sinteza (sastavljanje u celinu) uz pomoć svetlosti.

Fotosintetički organizmi, eukarioti (više biljke, jednoćelijske i višećelijske alge) i prokarioti (najstarija grupa fotoautotrofnih organizama – Cyanobacteria – fotoautotrofne bakterije – modrozelenke bakterije/alge), kroz proces fotosinteze usvajaju energiju elektromagnetnog zračenja (svetlosnu energiju) i konvertuju je u energiju hemijskih veza visokoenergetskih jedinjenja (ATP, GTP, UTP, NADPH i dr.), odnosno, u energiju hemijskih veza između atoma u molekulima ugljenih hidrata. Prema tome, fotosinteza obezbeđuje najveći deo hemijske energije koja kruži u biosferi, odnosno obezbeđuje „hranu“ za metabolizam živih organizama (supstrat za ćelijsko disanje i druge procese). Fotosintetički organizmi su **autotrofni**, jer sami proizvode „hranu“ iz neorganskih materija (CO_2 i H_2O) i predstavljaju početak u lancima ishrane, za razliku od **heterotrofa** koji svoje metaboličke potrebe za hemijskom energijom zadovoljavaju neposrednim ili posrednim konzumiranjem fotosintata – organskih materija nastalih u fotosintezi. Pojava fotosinteze značila je prekretnicu u evoluciji života na planeti Zemlji, jer je omogućila nastanak aerobnog metabolizma. Prvi oslobođeni kiseonik (O_2) u atmosferu, pre više milijardi godina, poticao je od procesa fotosinteze, odnosno, od molekula vode koji se apsorbirivanom svetlošću cepaju na vodonik (H) i kiseonik (O_2) (fotoliza). Stoga je i energija koja se oslobađa iz fosilnih goriva (ugalj, nafta, prirodni zemni gas i dr.) poreklom od organske materije autotrofnih biljaka, koje su fotosintezom prevodile energiju sunca u organsku materiju.

Polazeći od iznetih činjenica u vezi sa procesom fotosinteze, hemijska jednačina koja opisuje ovaj proces je:

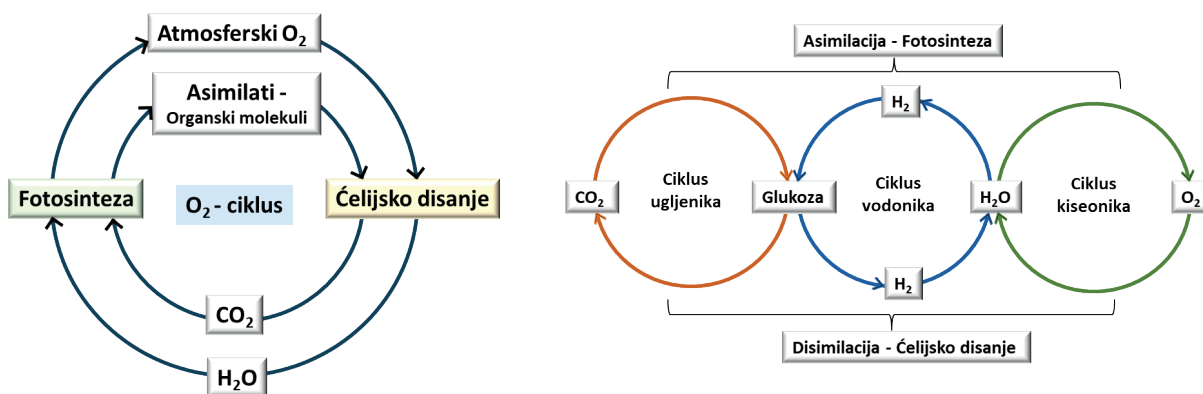


Gornja jednačina je tačna, ali je istovremeno i suviše pojednostavljena, pošto glukoza nije jedini ugljeni hidrat koji nastaje u procesu fotosinteze, te je stoga tačnije:



Iz opšte jednačine fotosinteze je vidljivo da je to *redoks proces* pošto se CO_2 (osnovni supstrat) redukuje do $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Sunčeva elektromagnetna energija je prevedena u hemijsku i deponovana u C—H—O veze u novonastalim molekulima šećera (fotosintata, asimilata). U procesu ćelijskog disanja ove veze se cepaju a oslobođena hemijska energija (u ATP, NADH i dr.) biće iskorišćena u ćelijskom metabolizmu za održavanje života organizama (biljaka, životinja, čoveka).

Fotosinteza je omogućila kruženje C i O u prirodi i pojavu aerobnog metabolizma (aerobne ćelijske respiracije – disanja).



Sl. 1.2. Kruženje ugljenika, vodonika i kiseonika: uloga fotosinteze (asimilacija) i disanja (disimilacija).

Kruženje ugljenika, vodonika i kiseonika se velikim delom ostvaruje kroz kruženje CO_2 i H_2O u procesu fotosinteze i disanja (**Sl. 1.2**).

Da je fotosinteza esencijalni proces za pojavu i opstanak života pokazuju i brojne kalkulacije o ogromnoj količini ugljenika koji se iz atmosfere (preko CO_2) procesom fotosinteze ugrađuje u organsku materiju. Prema jednoj od njih, 2×10^{11} tona ugljenika se godišnje fiksira u organsku materiju, što je ekvivalentno 3×10^{18} KJ hemijske energije (deponovane u fotosintatima). Fotoliza vode u fotosintezi je proces kojim se O_2 oslobađa u atmosferu. Prema nekim kalkulacijama, pri usvajanju svake tone C oslobađa se 2.7 tona O_2 .

Neka od najnovijih istraživanja pokazuju da fotosintetička asimilacija i primarna organska produkcija fitoplanktona u jezerima, morima/okeanima može biti izuzetno visoka i zavisno od ekoloških činilaca, te biološ-

ke vrste, odnosno faze razvića, može da iznosi od nekoliko desetina, do čak 900 g C po m² vodene površine za jedan dan. Akvatične vaskularne biljke (vodene makrofite) mogu da imaju neto fotosintetičku asimilaciju i do 50 mg CO₂ po m² za samo jedan čas. Šumski ekosistemi imaju izuzetno važnu ulogu u uspostavljanju i očuvanju povoljnih ekoloških karakteristika cele planete, jer su drvenaste biljne vrste izuzetno veliki potrošači CO₂, te producenti O₂ i organske materije. Neto fotosintetička aktivnost drvenastih biljnih vrsta (hrast, topola, vrba, bukva i dr.) prema brojnim istraživanjima iznosi i do 25–30 μmol CO₂ po m² lisne površine u sekundi. Kada se ove vrednosti prevedu na ukupnu godišnju fotosintetičku asimilaciju ugljenika, zaključuje se da je vegetacija, zbog fotosinteze, neophodna za održavanje svih oblika života na Zemlji. Ako bi fotosinteza prestala, uskoro bi na Zemlji bilo malo hrane (ili druge organske materije), većina organizama bi nestala, a u Zemljinoj atmosferi nestalo bi gasovitog kiseonika.

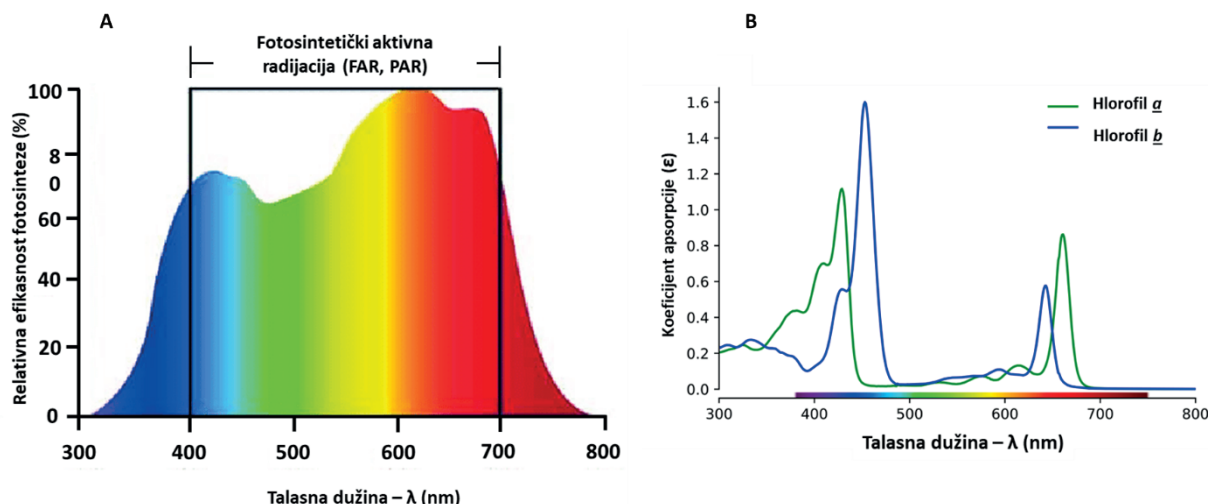
Kruženje ugljenika i kiseonika kroz proces fotosinteze bitno utiče na ublažavanje štetnih posledica globalnih klimatskih promena, najčešće manifestovanih kroz učestalu pojavu suše i rasta prosečne temperature na Zemlji. Povećanje koncentracije atmosferskog CO₂, koji zadržava infracrveno (toplo) zračenje, dovodi do „efekta staklene bašte“ i globalnog zagrevanja, ali fotosintetički organizmi povećanjem fotosinteze sa porastom CO₂, do izvesnog stepena, značajno doprinose smanjenju ovog štetnog efekta.

1.2. Svetlost i fotosinteza: fotosintetički aktivna radijacija (FAR, ili PAR); akcioni i apsorpcioni spektri

Iako je fotosinteza dominantan proces na Zemlji i shodno tome, apsorpcija svetlosti ima esencijalni značaj za sintezu organske materije, može se reći da je ukupna iskorišćenost svetlosne energije u fotosintetičke svrhe veoma mala: od 0,1 do 2%, uzimajući u obzir različite literaturne izvore. Zbog toga, povećanje procenta iskorišćenosti spektra elektromagnetnog zračenja značilo bi veću efikasnost fotosinteze i veće stvaranje organske materije, što je u fokusu velikog broja istraživanja zbog biotehnološke primene. Tako npr. produkcija organske materije zelenih algi može porasti i za 60%, ako se u laboratorijskim uslovima poveća efikasnost iskorištavanja svetlosne energije za nekoliko procenata.

Koju svetlost koriste (apsorbuju) fotosintetički organizmi za fotosintezu?

Svetlost koja se apsorbuje u fotosintetičke svrhe pripada vidljivom delu elektromagnetnog spektra u intervalu talasnih dužina od 360–720 nm i predstavlja **fotosintetički aktivnu radijaciju (FAR, PAR – engl. Photosynthetic Active Radiation) (Sl. 1.3)**. U ovom intervalu talasnih dužina maksimalno se apsorbuje elektromagnetno zračenje od strane hlorofila i karotenoida (70–90%) koji potom koriste energiju fotona za njeno prevođenje u hemijsku energiju ATP i NADPH svetlosnim reakcijama fotosinteze. U intervalu talasnih dužina koje pripadaju FAR, reflektuje 5–12% i propušta 5–8% energije fotona.



Sl. 1.3. Fotosintetički aktivna radijacija (FAR, PAR), i spektar apsorpcije fotosintetičkih pigmenata hlorofila u intervalu talasnih dužina, $\lambda \approx 360\text{--}720\text{ nm}$. Akcioni spektar (A): Intenzitet/ efikasnost fotosinteze u zavisnosti od talasne dužine (λ) – energije apsorbovanih fotona. Apsorpcioni spektar (B): apsorpcija od strane fotosintetičkih pigmenata hlorofila u zavisnosti od talasne dužine (λ) elektromagnetnog zračenja. Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 100.

Za razumevanje opšteg koncepta fotosinteze, neophodno je definisati neke osnovne zakonitosti u vezi sa prirodom elektromagnetnog zračenja, te njegovog uticaja (apsorpcija, refleksija, transmisija) na molekule fotosintetičkih pigmenata i fotohemijske reakcije.

Svetlost:

Svetlost je elektromagnetno zračenje širokog opsega talasnih dužina, ali se u užem smislu najčešće definiše kao deo spektra elektromagnetnog zračenja koju detektuje ljudsko oko, to je tzv. vidljiva svetlost (VIS, engl. visible). U širem smislu pojam svetlosti se odnosi i na deo elektromagnetnog zračenja van vidljivog opsega u koji ulaze i delovi ultraljubičastog spektra (UV, engl. ultraviolet), kao i infracrveni deo zračenja (IR, engl. Infrared) u bliskom delu opsega talasnih dužina (λ) do 2500 nm (**Sl. 1.4**).

Priroda elektromagnetnog zračenja je talasno-čestična (talasno-korpuskularna): električni i magnetni talasi se rasprostiru u sinusoidnoj formi kroz prostor pod međusobnim uglom od 90° , upravo na pravac prostiranja, ali u diskretnim „paketima” energije – kvantima. Kvant predstavlja nedeljivu, najmanju količinu energije koja se javlja u elementarnim procesima. Foton je kvant elektromagnetnog zračenja i nosilac je elektromagnetne sile (Lorenove sile) koja deluje među naelektrisanim česticama unutar elektromagnetnog polja. Foton u mirovanju nema masu i naelektrisanje. Predstavlja jednu „meru/paket” energije, tzv. kvant, a istovremeno je svoja antičestica (antičestica ima istu masu kao i čestica, ali ima suprotno naelektrisanje).

Kvant je količina energije koju nosi jedan foton. Energija kvanta, kvantirana energija ili specifični „paket” energije, definisan je talasnom dužinom, što proističe iz Plankovog zakona (nem. Planck):

$$\Delta E = h \nu = h \cdot c / \lambda$$

ΔE – kvantirana energija elektromagnetnog zračenja ili energija jednog fotona [J]

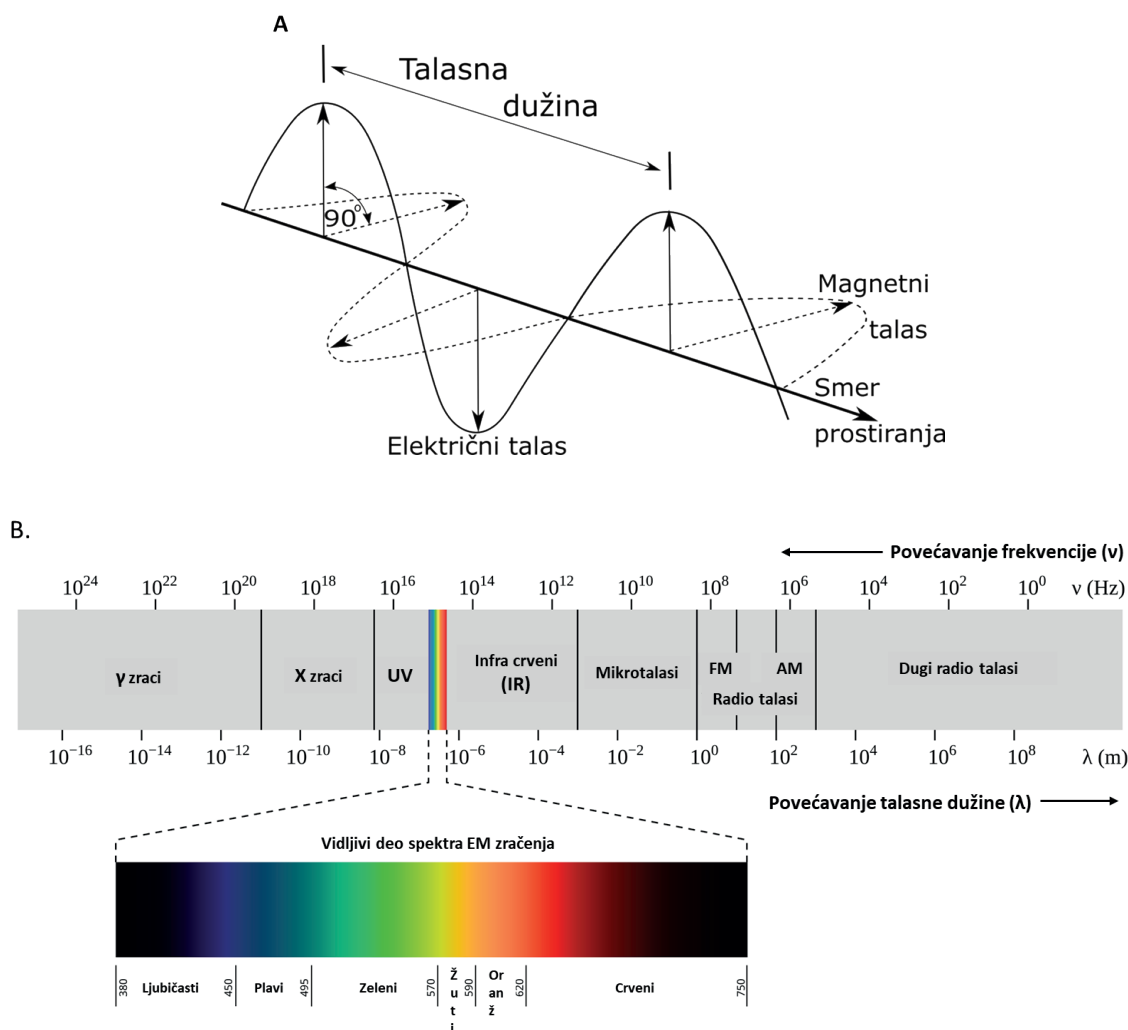
h – Plankova konstanta = $6,626176 \cdot 10^{-34}$ [J s]

ν – frekvencija [s^{-1}]

c – brzina svetlosti = 300 000 km/s

λ – talasna dužina [cm]

$\bar{\nu} = 1/\lambda$ – talasni broj [cm^{-1}]



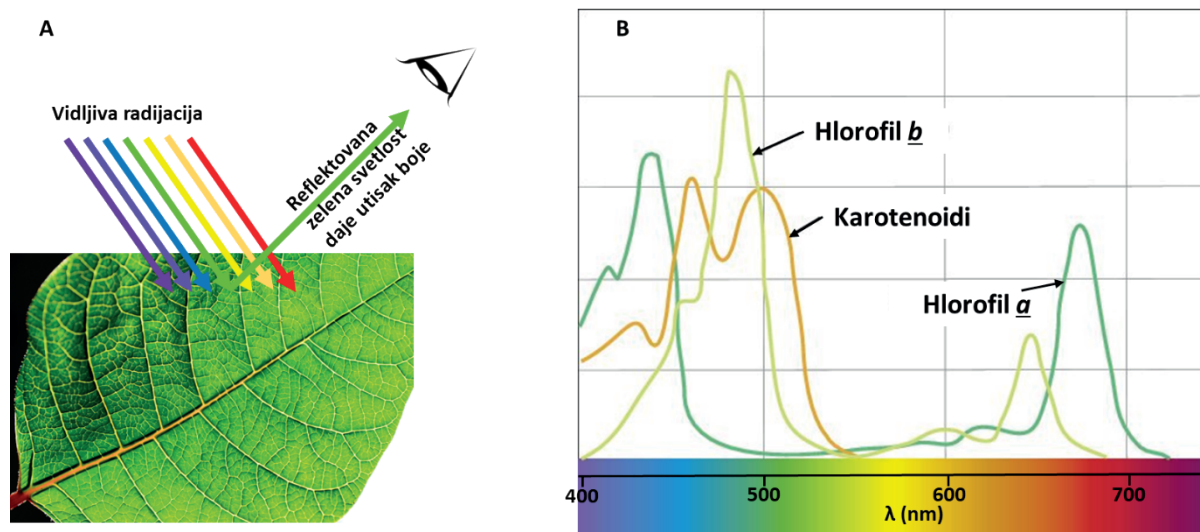
Sl. 1.4. Elektromagnetni talas (A) i spektar elektromagnetnog zračenja (B)
B – Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 100.

Prema Plankovom zakonu, energija fotona zavisi od frekvencije i obrnuto je proporcionalna njegovoj talasnoj dužini: foton ima veću energiju ukoliko je talasna dužina elektromagnetnog talasa manja.

Talasna dužina (λ) svetlosti određuje njenu boju: λ „crvenih fotona“ je oko 700 nm i oni imaju manju energiju u odnosu na „plave fotone“ čija je λ oko 450 nm. Manji broj fotona kraćih talasnih dužina (većih energija), može da ima istu ukupnu energiju kao veći broj fotona većih talasnih dužina (manjih energija) što je veoma značajno za efikasnost iskorišćavanja svetlosti u fotosintetičke svrhe i iniciranje fotohemijskih reakcija svetle faze fotosinteze.

Svetlost i fotosinteza:

Svetlost koja pada na fotosintetički aktivno mesto (organ, ćeliju, hloroplast ili pigment) je kao kiša fotona različite talasne dužine, odnosno, energije. U zavisnosti od prirode supstance izložene svetlosti (molekula, atoma, molekulskih agregata...), kao i osobina svetlosti (intenziteta i kvaliteta, što se odnosi na broj i zastupljenost fotona različitih energija, odnosno λ), ona može da se u većoj ili manjoj meri apsorbuje, propušta ili reflektuje. Hlorofili se vide kao zeleni zato što u najvećoj meri apsorbuju svetlost u crvenom i plavom delu spektra, te zbog toga u reflektovanoj svetlosti koja dolazi do očiju posmatrača dominiraju fotoni koji pripadaju zelenom delu spektra, talasnih dužina, $\lambda \approx 550$ nm (**Sl. 1.5A**).



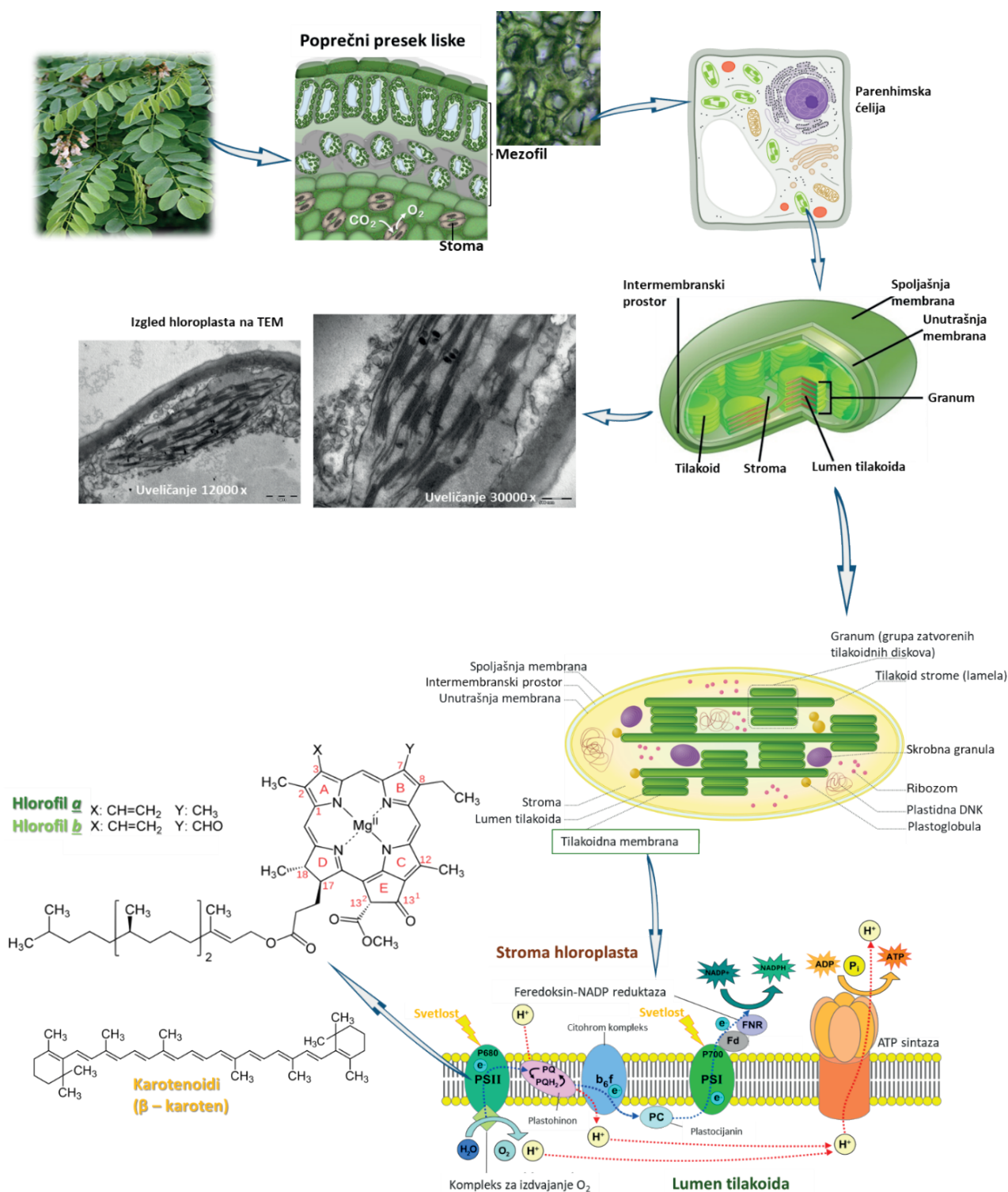
Sl. 1.5. Poreklo boje u oku posmatrača (A); Apsorpcioni spektri pigmenata viših biljaka, Hlorofila *a*, Hlorofila *b* i karotenoida (B). Adaptirano prema: Elektronski izvori slaka, str. 100.

Različiti fotosintetički pigmenti imaju specifične spektre apsorpcije zbog svog različitog molekulskog sastava i shodno tome, različitih „energetskih zahteva“ za apsorpciju fotona koja će dovesti do njihove ekscitacije i otpočinjanja fotosinteze (**Sl. 1.5B**).

Različite nijanse zelene boje biljnih organa posledica su različitog kvantitativnog odnosa fotosintetičkih pigmenata: plavo-zelenog hlorofila *a*, žuto-zelenog hlorofila *b* i žuto-narandžasto-crvenih karotenoida. Hlorofil *a* apsorbuje svetlost u tamno-plavom i crvenom delu spektra, Hlorofil *b* apsorbuje svetlo-plavu i narandžasto-crvenu svetlost, dok karotenoidi apsorbuju u ljubičasto-plavom i većem delu plavo-zelene svetlosti, te stoga FAR obuhvata spektar bele vidljive svetlosti, talasnih dužina između 400 i 700 nm, sa dominantno izražena dva pika apsorpcije, u plavom i crvenom delu (**Sl. 1.5**).

1.3. Struktura fotosintetičkog aparata: hloroplasti, tilakoidi, fotosintetički pigmenti

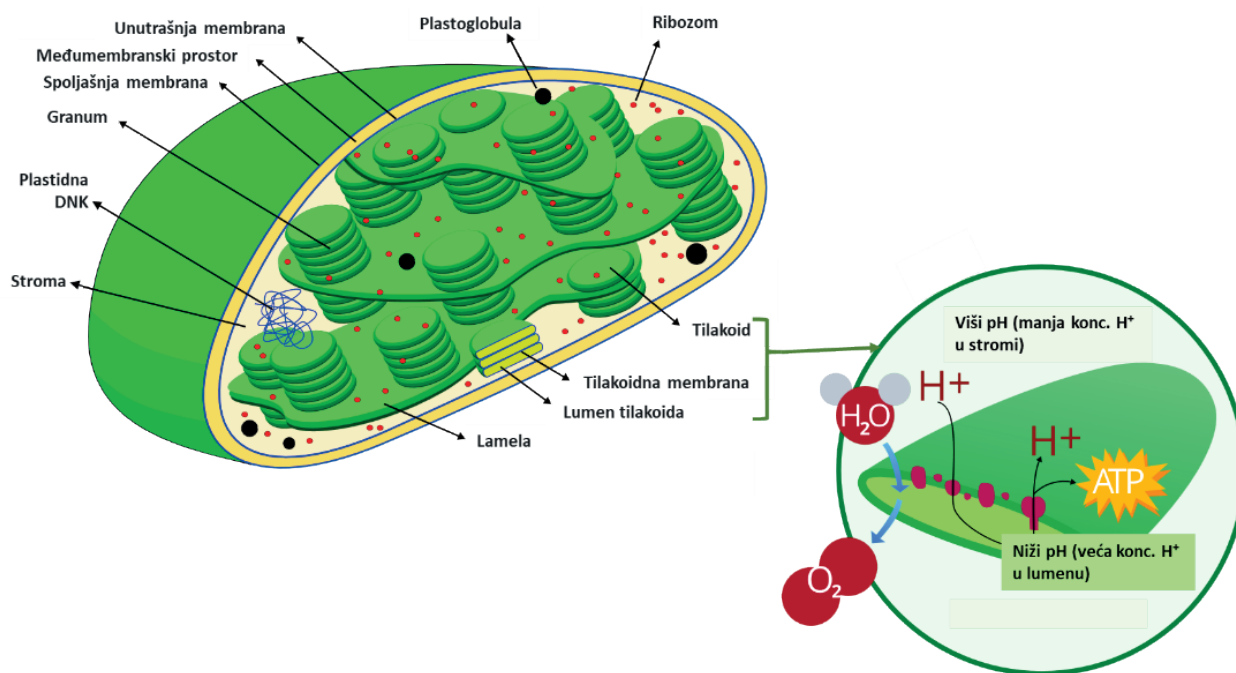
Proces fotosinteze se kod fotosintetičkih eukariotskih organizama odvija u specijalizovanim ćelijskim organelama – hloroplastima (Sl. 1.6).



Sl. 1.6. Struktura i molekularna organizacija fotosintetičkog aparata: od lista do molekula pigmenta. Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 100.

1.3.1. Hloroplasti

Hloroplasti su organele u kojima se odvijaju i smenjuju sve fotosintetičke reakcije. Njihov broj i veličina u parenhimskim ćelijama zavise od biljne vrste, starosti, ekoloških uslova i dr., ali se uopšteno može reći da ih u ćeliji ima od svega nekoliko, do čak 100, a veličina varira od 1 do 10 μm . Strukturna kompartmentalnost hloroplasta omogućuje sinhroni tok veoma različitih reakcija u kompleksnom procesu fotosinteze (**Sl. 1.7**).



Sl. 1.7. Šematski prikaz strukture hloroplasta: dvostruka spoljašnja membrana i složeni unutrašnji (stromalni) membranski (tilakoidni) sistem je diferenciran u dva granum/stroma kompartmenta: tilakoidi grana (granum – jednina, grana-množina) i lamele - tilakoidi strome (stroma lamellae). Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 100.

Hloroplast je strukturno organizovan u dva glavna odeljka: stroma (unutrašnjost koja je odvojena od citoplazme dvostrukom membranom) i složeni membranski sistem koji je opet, diferenciran u dva pododeljka. Membrane hloroplasta se nazivaju još i tilakoidi, a oni su organizovani u „pakete“ naslaganih tilakoida – diskova. Diskovi imaju zatvoren unutrašnji prostor – lumen tilakoida. Granum (množina, grana) čini grupa tilakoidnih diskova koji zatvaraju unutrašnji prostor – lumen tilakoida. Hloroplasti mogu imati od 10 do 100 grana. Grana su povezani tilakoidima strome (intergranalni tilakoidi, ili stroma-lamellae). Grana tilakoidi i tilakoidi strome mogu se razlikovati po različitom sastavu proteina.

1.3.1.1. Stroma hloroplasta

Stroma hloroplasta je zapravo složeni rastvor – fluidni unutrašnji prostor u koji su uronjeni tilakoidi, hloroplastna DNK, ribozomi, (lipidne) plastoglobule, kao i brojni rastvoreni enzimi koji obezbeđuju specifičan metabolizam u samim hloroplastima počev od transkripcije DNK i sinteze specifičnih proteina- enzima. Rastvoreni enzimi u stromi hloroplasta katališu procese karboksilacije i sinteze organske materije u Kalvinovom ciklusu, te se zbog toga u stromi hloroplasta često mogu videti nastali primarni asimilati (fotosintati), u formi skrobnih zrna (**Sl. 1.8**).



Sl. 1.8. Skrobne granule u stromi hloroplasta na snimku TEM (transmisijna elektronska mikroskopija). Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 100.

1.3.1.1.1. Hloroplastni genom (plastom)

Pored jedarnog (nuklearnog) genoma, biljne ćelije poseduju još dva, plastidni i mitohondrijski genom, o čemu će kasnije biti više reči (Poglavlje Disanje: 2.7.1 Mitohondrijski genom (mitogenom)). Evolutivno poreklo ova dva genoma može se objasniti endosimbiotskom teorijom. Osnovni postulat endosimbiotske teorije je da oba citoplazmatična genoma predstavljaju evolutivne ostatke slobodnoživećih prokariota. Prema ovoj teoriji hloroplasti su nastali od fotosintetičkih cijanobakterija koje je „progutala“ primitivna eukariotska ćelija. Tokom evolutivnog vremena većina cijanobakterijskih gena je „prebačena“ u jedarni genom ćelije domaćina, dok je genom hloroplasta zadržao specifičnu skupinu gena, kao i ribosome i RNK. Samim tim, semi-autonomna priroda hloroplasta im omogućava da direktno reguju na signale iz spoljašnje sredine, kao što je svetlost, te imaju mogućnost prilagođavanja sinteze proteina potrebnih za fotosintezu. U prilog ovoj teoriji govori nekoliko činjenica, kao što je postojanje dvostruke membrane u ovim organelama, drugo, hloroplastni i mitohondrijski genom pokazuju sličnosti u sekvencama sa prokariotskim genomima. Genomi organela, kao i genomi prokariota, nisu zatvoreni u jedarnu membranu i nazivaju se nukleoidi.

Hloroplastni genom je uglavnom veličine oko 120–160 kbp (kilobaznih parova) i predstavlja najmanji genom u biljkama, s obzirom da je manji u odnosu na jedarni i mitohondrijski genom. Sadrži gene koji kodiraju proteine neophodne za proces fotosinteze (fotosistem I, fotosistem II, citohrom b6f kompleks, ATP-sintaza), kao i gene uključene u sintezu plastida. Pored toga, hloroplastni genom sadrži i nekodirajuće sekvence koje učestvuju u regulaciji genske ekspresije. Takođe, hloroplastni genom sadrži veliki broj visoko konzerviranih sekvenci, što uz malu veličinu predstavlja idealan model za evolutivna, i komparativna genomička istraživanja, i omogućava njegovu široku upotrebu u filogenetičkim studijama.

Dugo se smatralo da su hloroplastni i mitohondrijski genom cirkularnog (kružnog) oblika, što ukazuje na sličnost sa plazmidima bakterija. Međutim, nedavne studije su pokazale da je većina DNK u ovim organelama lineranog i razgranatog oblika. Za razliku od jedarnih hromozoma koji su iste veličine kroz generacije, veličina hromozoma u plastidima i mitohondrijama može varirati. Bez obzira na to, svaki hromozom sadrži barem jednu kopiju genoma. Pored toga, plastidi mogu da sadrže različit broj kopija hloroplastne DNK, što zavisi od tipa i stepena diferencijacije ćelija. Hloroplasti mezofilnih ćelija u brzorastućim listovima sadrže po 20 do 40 kopija genoma hloroplasta, a obično ima oko 200 hloroplasta po ćeliji mezofila. Nasuprot tome, amiloplasti u krtolama krompira, ili hromoplasti u plodu paradajza sadrže svega nekoliko kopija genoma.

Još jedna specifičnost plastida i mitohondrija je njihovo nasleđivanje koje odstupa od Mendelovih pravila, s obzirom da ove organele imaju najčešće uniparentalno poreklo, nasleđuju se od jednog roditelja. Tako, među

golosemenicama četinari uobičajeno nasleđuju svoje plastide od oca, dok većina angiospermi (skrivenosemenica) nasleđuje plastide od majke, mada postoje i vrste gde se plastidi nasleđuju biparentalno, ili od oca. Druga odlika organelnog nasleđivanja ogleda se u tome da ove organele mogu da ispolje vegetativnu segregaciju. To znači da vegetativna ćelija u procesu mitoze može dati ćerku ćeliju koja se genetički razlikuje od majke ćelije, što može da rezultira nastankom fenotipski različitih jedinki. Na primer, na ovaj način mogu nastati varijeteti biljaka (biljka sa šarenim listova) koje se dosta koriste u hortikulturi, a predstavljaju rezultat promena u hloroplastnom genomu, a takve promene mogu nastati i mutacijama jedarnih gena.

1.3.1.2. Tilakoidi hloroplasta

Fotosintetička transformacija i prenos energije se (u biljkama i algama), dešavaju u spljoštenim vezikulama tilakoidima koji se formiraju uporedo sa diferencijacijom hloroplasta iz proplastida. Tilakoidne membrane imaju viši udeo proteina (proteinskih kompleksa) u odnosu na lipide, koji može dostići i do 80% u regionima grana eukariotskih hloroplasta. Složeni tilakoidni sistem nastaje nagomilavanjem vezikula, primarno stvorenih invaginacijama unutrašnje membrane hloroplasta. Stoga, najveći deo građivnog materijala za izgradnju tilakoida, uglavnom proteina i lipida (galaktolipida), potiče od unutrašnje membrane hloroplasta, a brojni enzimi koordinišu sintezu proteina, lipida, pigmenata i prenosioca elektrona koji predstavljaju strukturne komponente tilakoida. Kao što je već rečeno i ilustrovano na **Sl. 1.6. i 1.7.** tilakoidna mreža u hloroplastima viših biljaka je diferencirana u dva morfološki različita pododeljka, to su: cilindrični paketići naslaganih diskova koji se na mikroskopu vide kao zrna, pa otuda i naziv „granum“ (zrno) i tilakoidi koji se provlače kroz stromu hloroplasta povezujući naslagane diskove – tilakoidi strome (lamelle strome) (**Sl. 1.7**). Fotosintetički pigmenti su u kompleksima sa proteinima „uronjeni“ u lipidni dvosloj tilakoidnih membrana i njihov su sastavni deo.

1.3.2. Fotosintetički pigmenti

Fotosinteza počinje apsorpcijom svetlosti od strane fotosintetičkih pigmenata. Istraživanja različitih pigmenata, njihove uloge i strukture u metabolizmu biljaka, sežu još u XIX vek. Nemački naučnik Rihard Vilšteter (nem. Richard Willstätter) je još 1915. godine dobio Nobelovu nagradu za dokazivanje aktivne uloge hlorofila u biljkama, dok je Hans Fiišer (nem. Hans Fischer), takođe iz Nemačke, dobio Nobelovu nagradu 1930. godine za otkriće strukture hema i molekula hlorofila.

U višim biljkama postoje dve grupe fotosintetičkih pigmenata specifičnog hemijskog sastava i specifičnog spektra apsorpcije, to su **hlorofili** i **karotenoidi**. Pigmentno-proteinski kompleksi, specifičnog sastava, predstavljaju strukturne i funkcionalne komponente tilakoida, raspoređeni su na tačno određen način i imaju jasno definisanu ulogu u procesu fotosinteze u okviru fotosistema I i II (fotosistem I – PS I i fotosistem II – PS II) (**Sl. 1.9**).

1.3.2.1. Hlorofili

Hlorofil [od starogrčkog: $\chi\lambda\omega\rho\acute{o}\varsigma$ (chloros)=zeleno i $\phi\acute{\upsilon}\lambda\lambda\omicron\nu$ (phillon)=list] je pigment koji biljkama (i drugim fotosintetičkim organizmima) daje zelenu boju zbog specifičnog spektra apsorpcije/refleksije svetlosti, što je posledica hemijske strukture samog molekula (**Sl. 1.9**). Do sada je identifikovano više prirodnih hlorofila, a svi spadaju u grupu metalo-tetrapirola, kod kojih su četiri pirolova prstena povezana metinskim mostovima ($-\text{CH}=\text{}$), formirajući na taj način polarnu porfirinsku strukturu (prsten). Skelet svakog pirolnog prstena sastoji se od 5 atoma, 4 ugljenika i jednog azota. Porfirinski prsten kao helatni kompleks (ligand), vezuje se za atom magnezijuma (Mg) preko četiri atoma azota (N) iz pirolovih prstenova koordinaciono-kovalentnom (helatnom) vezom, gde oba elektrona iz kovalentne veze dolaze iz atoma azota. Ovakav stabilan koordinacioni kompleks omogućava hlorofilu da apsorbuje svetlost za proces fotosinteze.

Više biljke sadrže:

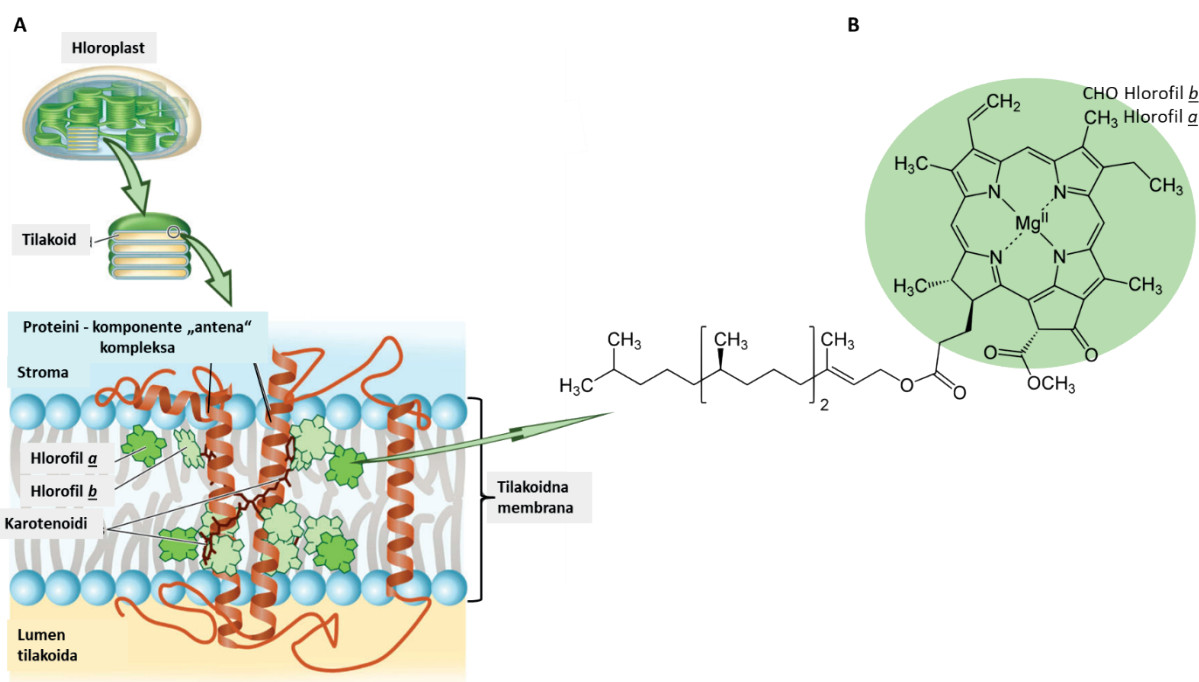
Hlorofil a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$); mol masa = 893,51

Hlorofil b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$); mol masa = 907,47

Hlorofil a i b – se razlikuju po supstituentu na trećem C-atomu II pirolovog prstena (C7, B prstena):

Hlorofil a: R= —CH₃ (metil grupa)

Hlorofil b: R= —CHO (aldehidna grupa)

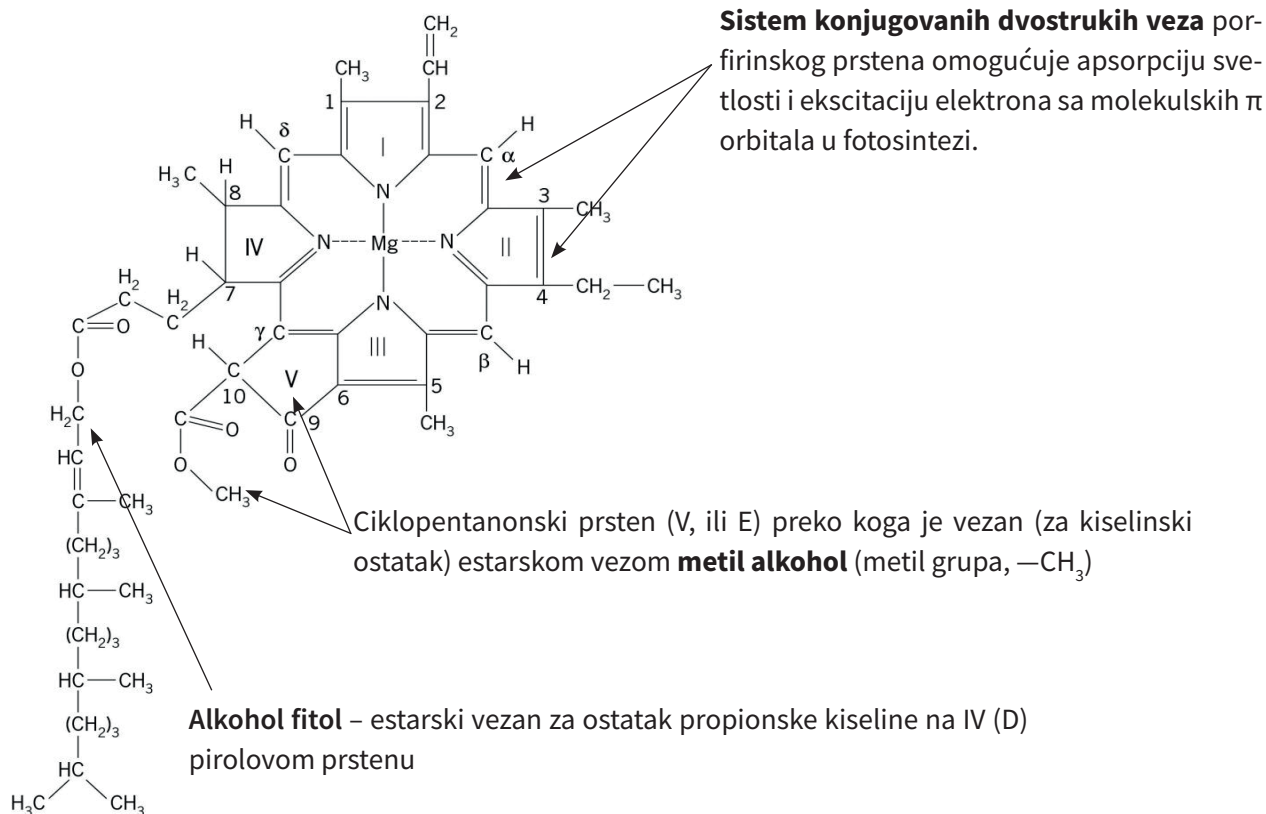


Sl. 1.9. Organizacija fotosistema: (A) Molekularna struktura pigmentno-proteinskog kompleksa za prikupljanje svetlosti („antena“-kompleksa) u tilakoidnoj membrani: intermembranski proteini (polipeptidi) koji vezuju molekule pigmenta (hlorofila a i b, kao i karotenoide) sastavni su delovi fotosistema sa centralno postavljenim reakcionim centrom – molekulom hlorofila a; (B) Hlorofili koji sakupljaju svetlost u „antena“-kompleksu, prenose energiju EM zračenja na molekule hlorofila a u reakcionom centru.

Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 100.

Spoljašnjim atomima ugljenika pirolnih prstenova dati su brojevi od 1 do 8 i oni vezuju različite grupe: atomi ugljenika 1, 3, 5 i 8 vezuju metil grupe (—CH₃). Atom ugljenika 2 poseduje vinil grupu (—CH=CH₂), dok atom ugljenika 4 ima etil grupu (—CH₂—CH₃). Atom ugljenika 6 je vezan za metinsku grupu pomoću petog izocikličnog prstena koji se zove ciklopentanon.

Hemijska svojstva i biohemijsku funkciju molekula hlorofila bitno određuje estarski vezan alkohol fitol za ostatak propionske kiseline na 7 C atomu porfirinskog prstena (**Sl. 1.10**). Ovo daje specifičan izgled molekulu hlorofila koji liči na punoglavca, pa se često govori o „porfirinskoj glavi“ i „fitolnom repu“. Fitolni rep je nepolarni (nerastvorljivi) dugi lanac atoma ugljenika i vodonika sa formulom C₂₀H₃₉OH, a preko njega se fiksira molekul hlorofila u lipidni deo tilakoidne membrane. Hlorofil bez magnezijumskog (Mg) jezgra je bezbojan i naziva se feofitin sa značajnom ulogom primarnog akceptora elektrona u PS II.



Sl. 1.10. Struktura molekula hlorofila *a* ($\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$).

Hlorofil **a** (Hl **a**; Chl **a**)

Hlorofil **a** je primarni pigment za fotosintezu viših biljaka, deo je *reakcionih centara oba fotosistema* i nalazi se u svim kompleksima za „prikupljanje“ svetlosti („antena“ kompleks, ili LHC, engl. light harvesting complex).

Od molekula hlorofila **a počinje primarni fotohemijski akt:** nakon apsorpcije kvanta svetlosti u oba fotosistema, pobuđeni elektroni hlorofila **a** se prenose na primarne akceptore i dalje idu kroz membranu tilakoida. Prema tome, *fotosinteza počinje od hlorofila **a***, jer samo ovaj molekul funkcioniše kao primarni donor elektrona u lancu transporta elektrona. U čistom stanju je plavkasto (tamno)-zelen, ima empirijsku formulu $\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$ i molekulsku masu $893,51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Bakteriohlorofil **a** ima empirijsku formulu od $\text{C}_{55}\text{H}_{74}\text{O}_6\text{N}_4\text{Mg}$ i molekulsku masu $911 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Hlorofil **b** (Hl **b**; Chl **b**)

Hlorofil **b** je uz ostale fotosintetičke pigmente neophodan za „prikupljanje“ elektromagnetnog zračenja za fotosintezu viših biljaka i nalazi se u „antena“ (LHC) kompleksima oba fotosistema; *nikada nije reakcioni centar*. U čistom stanju je žućkasto (maslinasto)-zelen, ima empirijsku formulu $\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{O}_6\text{N}_4\text{Mg}$ i molekulsku masu od $907,47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Stehiometrija i esterifikujući alkoholi oba pigmenta su isti, a razlika u molekularnoj masi je posledica razlike u supstituentima na trećem C-atomu II pirolovog prstena: Hlorofil **a**: $\text{R} = -\text{CH}_3$ (metil grupa); Hlorofil **b**: $\text{R} = -\text{CHO}$ (aldehidna grupa) (**Sl. 1.9.**). Ova razlika ima za posledicu i razliku u boji, odnosno, u spektrima apsorpcije hlorofila **a** i hlorofila **b**.

Kvantitativni odnos hlorofila **a** i hlorofila **b** u pigmentno-proteinskim kompleksima oba fotosistema viših biljaka generalno iznosi $\text{Chl } \mathbf{a} : \text{Chl } \mathbf{b} = 3 : 1$, ali je specifičan u zavisnosti od biljne vrste (genotipa) i veoma va-

rijabilan u zavisnosti od ekoloških uslova, odnosno adaptacija tokom vegetacionog perioda. Biljke koje su adaptirane na uslove senke imaju povećan sadržaj hlorofila **b** čime se apsorpcija fotona pomera prema talasnim dužinama koje su specifične za uslove senke (prema dužim talasima plavog dela spektra, kao i kraćim – crvenim talasnim dužinama).

Hlorofil **c** (Hl **c**; Chl **c**)

Ova vrsta hlorofila nađena je u silikatnim (Diatomea), vatrenim (Dinoflagellata) i mrkim (Phaeophyta) algama. Plavo-zelene je boje i ima ulogu u fotosintezi kao „antena“ (LHC) pigment koji prenosi kvant apsorbovane svetlosne energije na reakcione centre fotosistema (molekule Hl **a**). Molekulska formula mu je $C_{35}H_{30}O_5N_4Mg$, a molekulska masa $610,95 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Hlorofil **d** (Hl **d**; Chl **d**)

Otkriven je polovinom 20-og veka, a danas se zna da je prisutan u crvenim algama (Rhodophyta), kao i u modrozelenim bakterijama (Cyanobacteria), gde ima nezamenljivu ulogu kao deo „antena“ (LHC) kompleksa u prikupljanju svetlosti za ekscitaciju reakcionih centara. Osim u plavom delu spektra, apsorbuje i u infracrvenom delu spektra. Molekulska formula mu je $C_{54}H_{70}O_6N_4Mg$, a molekulska masa $895,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Pored navedenih glavnih i najzastupljenijih tipova hlorofila, novija istraživanja dovela su do otkrića retke forme hlorofila, definisane kao Hlorofil **e** (Hl **e**; Chl **e**), konstatovane, za sada samo u nekim žuto-zelenim algama (Xanthophyta), kao što su Tribonema i Vaucheria. Hlorofil **f** (Hl **f**; Chl **f**) je pronađen u modrozelenim bakterijama (Cyanobacteria), maksimalno apsorbuje daleko crveno zračenje (najveće talasne dužine u odnosu na poznate hlorofile). Pretpostavlja se da nema aktivnu ulogu u transportu elektrona, već je pomoćni (dodatni, aksesorni) pigment fotosistema I (komponenta LHC PS II).

Talasne dužine apsorpcionih maksimuma ($\lambda_{\max}$, nm) i zastupljenost hlorofila u različitim vrstama, prikazani su u Tabeli 1.1.

Tabela. 1.1. Najčešće zastupljeni hlorofili, talasne dužine apsorpcionih maksimuma ($\lambda_{\max}$, nm) i zastupljenost u različitim vrstama

Pigmenti	$\approx \lambda_{\max}$ (nm)	Prisutni u fotosintetičkom aparatu:
Hlorofil <i>a</i>	420, 660	Više biljke, alge i modrozelenne bakterije/alge (Cyanobacteria)
Hlorofil <i>b</i>	435, 643	Više biljke i zelene alge (Chlorophyta)
Hlorofil <i>c</i>	450, 625	Silikatne (Diatomea), Vatrene (Dinoflagellata) i mrke (Phaeophyta) alge
Hlorofil <i>d</i>	450, 710	Modrozelenne bakterije (Cyanobacteria) i crvene alge (Rhodophyta)

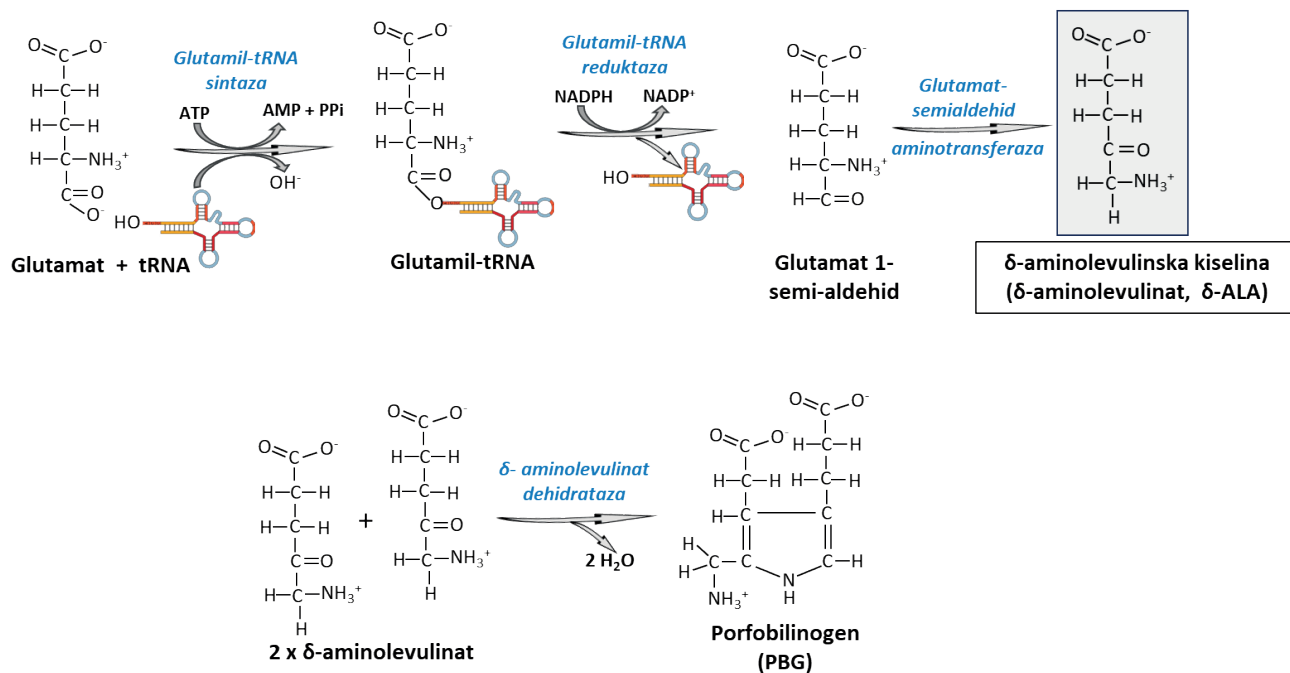
1.3.2.1.1. Biosinteza hlorofila

Hlorofil se sintetiše u stromi hloroplasta preko niza enzimski katalisanih reakcija i uz stvaranje brojnih intermedijera. Biosinteza kompleksnog molekula hlorofila se prema nastalom produktu, može podeliti na sintezu porfirinskog prstena (hem strukture) i sintezu alkohola fitola (izoprenoidnog lanca).

Biosinteza pirolonih subjedinica u tetrapirolnoj (porfirinskoj) strukturi molekula hlorofila:

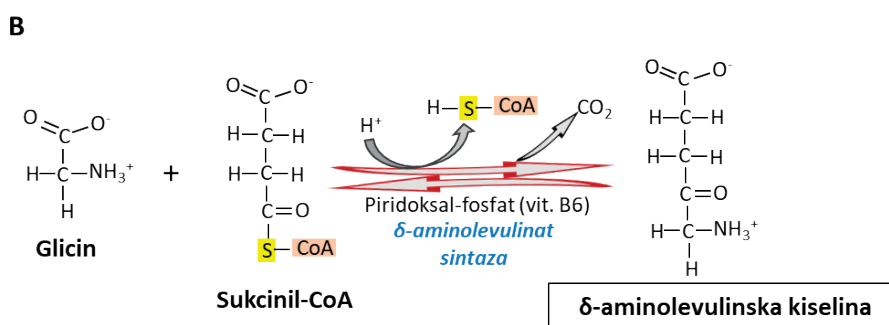
U **prvoj fazi** formira se glavni prekursor u sintezi pirolonih prstenova, a to je **δ -aminolevulinska kiselina** (ili **5-aminolevulinsku kiselinu**) (5-ALA, engl. aminolevulinic acid). U ovoj fazi se *glutaminska kiselina* (amino-kiselina) kao *primarni prekursor* kovalentno vezuje za transportnu RNK (tRNK, ili tRNA), gradeći jedinje-

nje **glutamil-tRNK**. Uloga tRNK u ovoj metaboličkoj reakciji je nezavisna od sinteze proteina. Dva molekula ALA u procesu kondenzacije formiraju **porfobilinogen (PBG)**, koji potom formira piroleve prstenove (**Sl. 1.11A**).



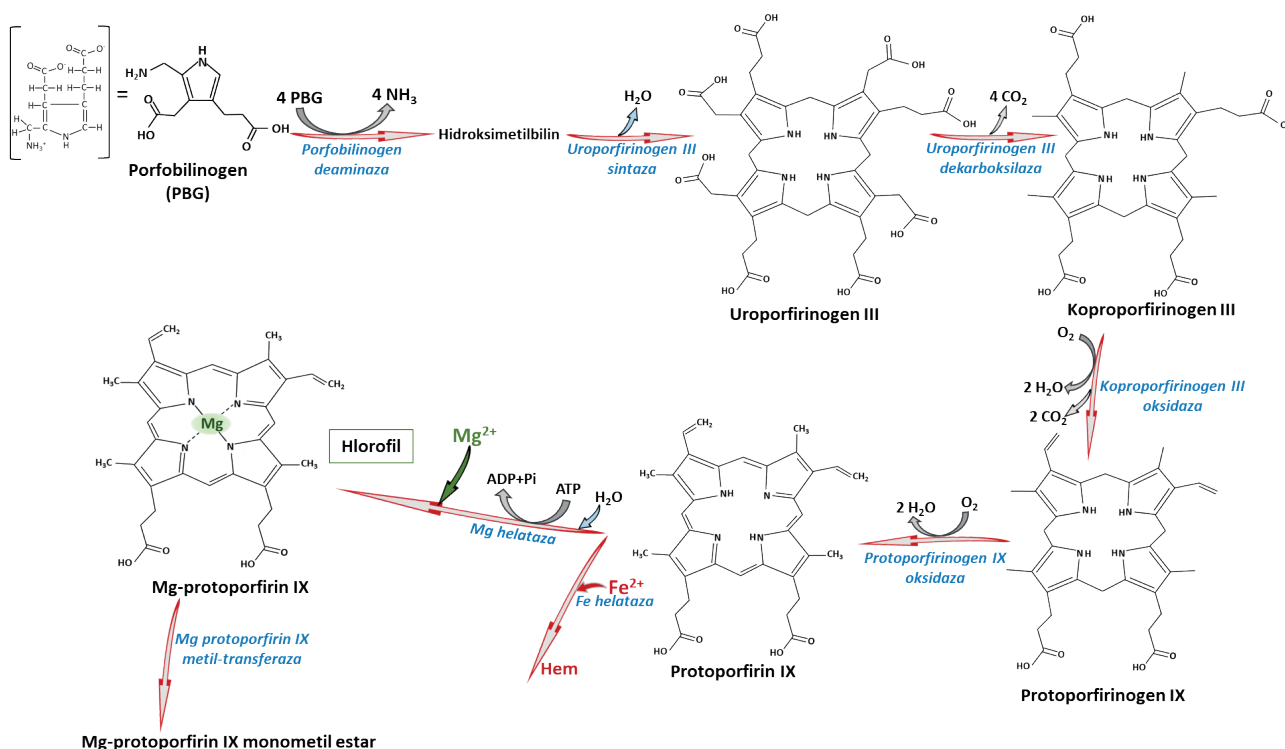
Sl. 1.11A. Prva faza sinteze hlorofila u stromi hloroplasta: od amino-kiseline glutamata do porfobilinogena (PBG).

Ovo nije isključivi put sinteze **δ -ALA** kao glavnog prekursora u sintezi pirola, odnosno, porfirinskog jezgra, već ona može nastati i alternativno, od sukcinil-CoA, intermedijera iz Krebsovog ciklusa, koji sa amino-kiselinom glicinom formira nestabilno jedinjenje δ -amino β -ketoadipinsku kiselinu, čijom dekarboksilacijom nastaje δ -ALA. Ovu reakciju katališe enzim δ -amino-levulinat sintaza sa piridoksal-fosfatom (vitaminom B₆) kao koenzimom koji je neophodan za odvijanje procesa transaminacije i dekarboksilacije (**Sl. 1.11B**).



Sl. 1.11B. Alternativni put sinteze glavnog prekursora δ -ALA iz amino-kiseline glicina i Sukcinil CoA.

U **drugoj fazi** sinteze porfirinskog prstena, četiri molekula porfobilinogena (PBG) kondenzacijom, formiraju porfirinsku strukturu preko brojnih intermedijera: hidroksimetilbilin, uroporfirinogen III, koproporfirinogen III, protoporfirinogen IX. Sve reakcije su enzimski kontrolisane, a ova faza se završava formiranjem **protoporfirina IX (PP IX)** (**Sl. 1.12**).



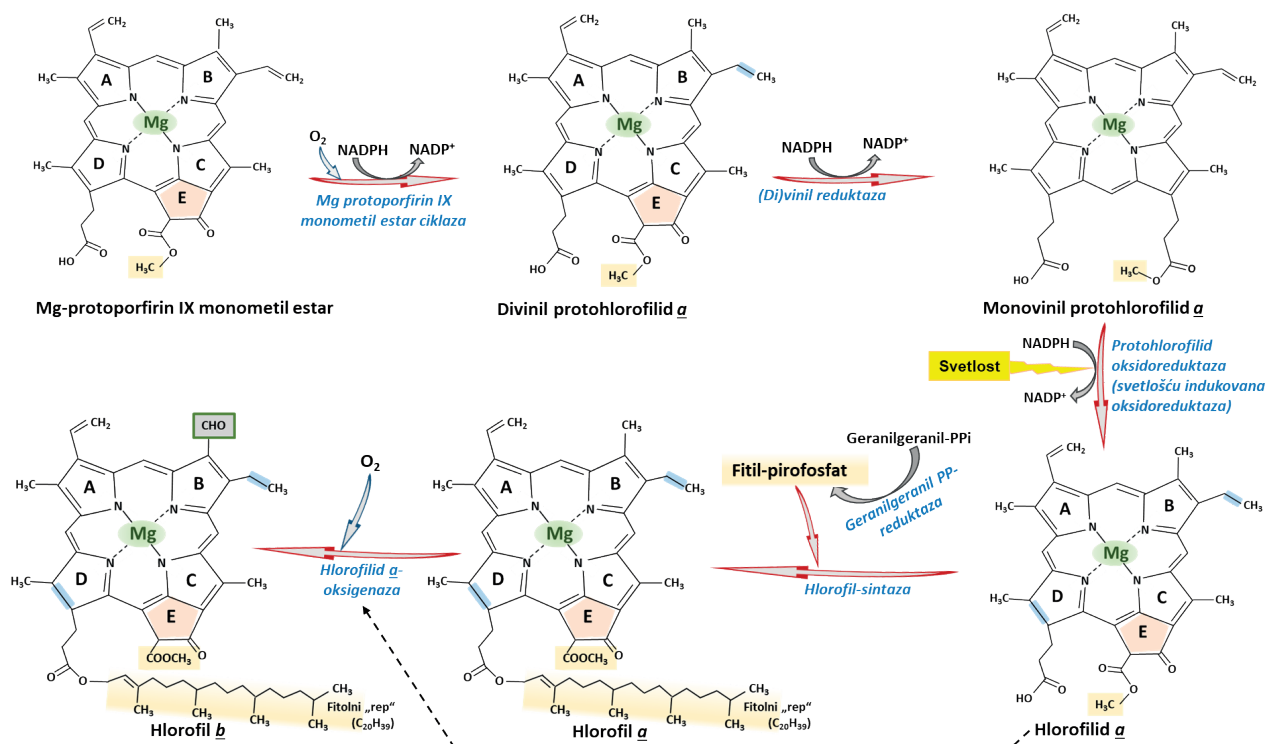
Sl. 1.12. Druga faza: od porfobilinogena do protoporfirina IX i početak treće faze sinteze hlorofila: formiranje Mg-protoporfirina.

Protoporfirin IX (PP IX) je veoma značajan intermedijer i zajednički prekursor za sintezu dve grupe molekula esencijalnih u metabolizmu, a to su: hlorofil (Mg-porfirin) i hem (Fe-porfirin).

U **trećoj fazi** sinteze hlorofila enzim *magnezijum-helataza* katališe vezivanje magnezijuma (Mg^{2+}) helatnom (koordinaciono-kovalentnom) vezom u molekul protoporfirina IX, pri čemu nastaje **Mg-protoporfirin**, potom aktivnošću enzima *Mg protoporfirin IX metil-transferaze* nastaje **Mg-protoporfirin monometil estar**, zatim, katalitičkom aktivnošću enzima *ciklaze*, nastaje **divinil-protohlorofilid α** , nakon čega, redukcijom preko NADPH, učešćem *vinil-reduktaze*, nastaje **monovinil-protohlorofilid α** i na kraju, redukcijom preko NADPH i katalitičkim dejstvom *protohlorofilid-oksidoreduktaze* koja se aktivira svetlošću, nastaje **hlorofilid α** (Sl. 1.13).

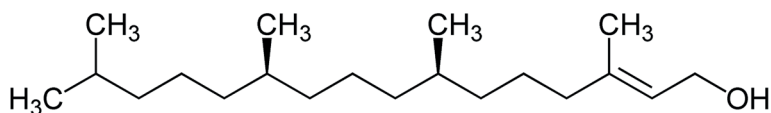
Sistem porfirinskog prstena se formira kada se esterifikovani propionski bočni lanac cikliše na glavni porfirinski prsten da bi se formirao divinil-protohlorofilid α , a zatim monovinil-protohlorofilid α . Redukciju na IV (ili D) prstenu protohlorofilida koja dovodi do konačne sinteze hlorofilida α , katališe enzim *protohlorofilid-oksidoreduktaza* (EC 1.3.1.33), a za ovu reakciju neophodna je svetlost. Kod fotosintetičkih bakterija, cijanobakterija, zelenih algi i golosemenica (lat. Gymnospermae), ova reakcija trans-redukcije na D-prstenu hlorofilida je nezavisna od svetlosti, a katalisana je enzimom *protohlorofilid-(ATP-zavisnom) oksidoreduktazom* (EC 1.3.7.7).

U **završnoj (četvrtoj) fazi sinteze hlorofila** esterifikacijom hlorofilida α sa izoprenilnim alkoholom **fitolom** formira se molekul **hlorofila α** . Fitolni „rep“ hlorofila (ostatak nakon esterifikacije: $\text{C}_{20}\text{H}_{39}$) je hidrofobne (lipofilne) prirode, te zbog toga učvršćuje molekul hlorofila u lipidni dvosloj tilakoida. Prema hemijskoj strukturi, to je diterpenoid, tačnije: aciklični mononezasićeni *diterpenski alkohol*, dugog ugljovodoničnog lanca ($\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$) koji se sintetiše u hloroplastima iz glavnog prekursora, **geranil-pirofosfata (Geranil-PP)**, odnosno, **geranilgeranil-pirofosfata** pomoću enzima i enzimskih kompleksa lociranih u tilakoidnim membranama (Sl. 1.13).



Sl. 1.13. Treća faza sinteze hlorofila: od Mg-protoporfirina IX do hlorofilida a i završna faza: od hlorofilida a do hlorofila a / hlorofila b.

Fitol je produkt metabolizma fotosintetičkih organizama i stoga je jedan od najzastupljenijih acikličnih di-terpena u prirodi (**Sl. 1.14**).



Sl. 1.14. Fitol-aciklični mononezasićeni diterpenski alkohol (C₂₀H₄₀O).

Terpeni se sintetišu polimerizacijom aktivnog (fosforilisanog) izoprena (izoprenoidnog fosfata), **izopentenil-pirofosfata (IPP, ili izopentenil-difosfata)**, odnosno, njegovog izomera, **dimetilalil-pirofosfata (DMAPP, ili dimetilalil-difosfata)** koji sadrže 5 C atoma (C₅H₈O₇P₂):

Monoterpeni 10 C (2x C₅): prursor je geranilpirofosfat, GPP

Seskviterpeni 15 C (3x C₅): prursor je farnezilpirofosfat, FPP

Diterpeni 20 C (4x C₅): geranilpirofosfat, GGPP

Sesterterpeni 25 C (5x C₅): geranifarnezilpirofosfat, GGPP

Triterpeni 30 C (6x C₅): skvalen (farnezil-farnezil)

Tetraterpeni 40 C (8x C₅)

Politerpeni > 40 C

Kao što je napred naglašeno, izoprenoidi nastaju od dva prekursora: izopentenil-pirofosfata (IPP) i njegovog izomera, dimetilalil-pirofosfata (DMAPP). Postoje dva metabolička puta sinteze IPP, odnosno DMAPP, to su:

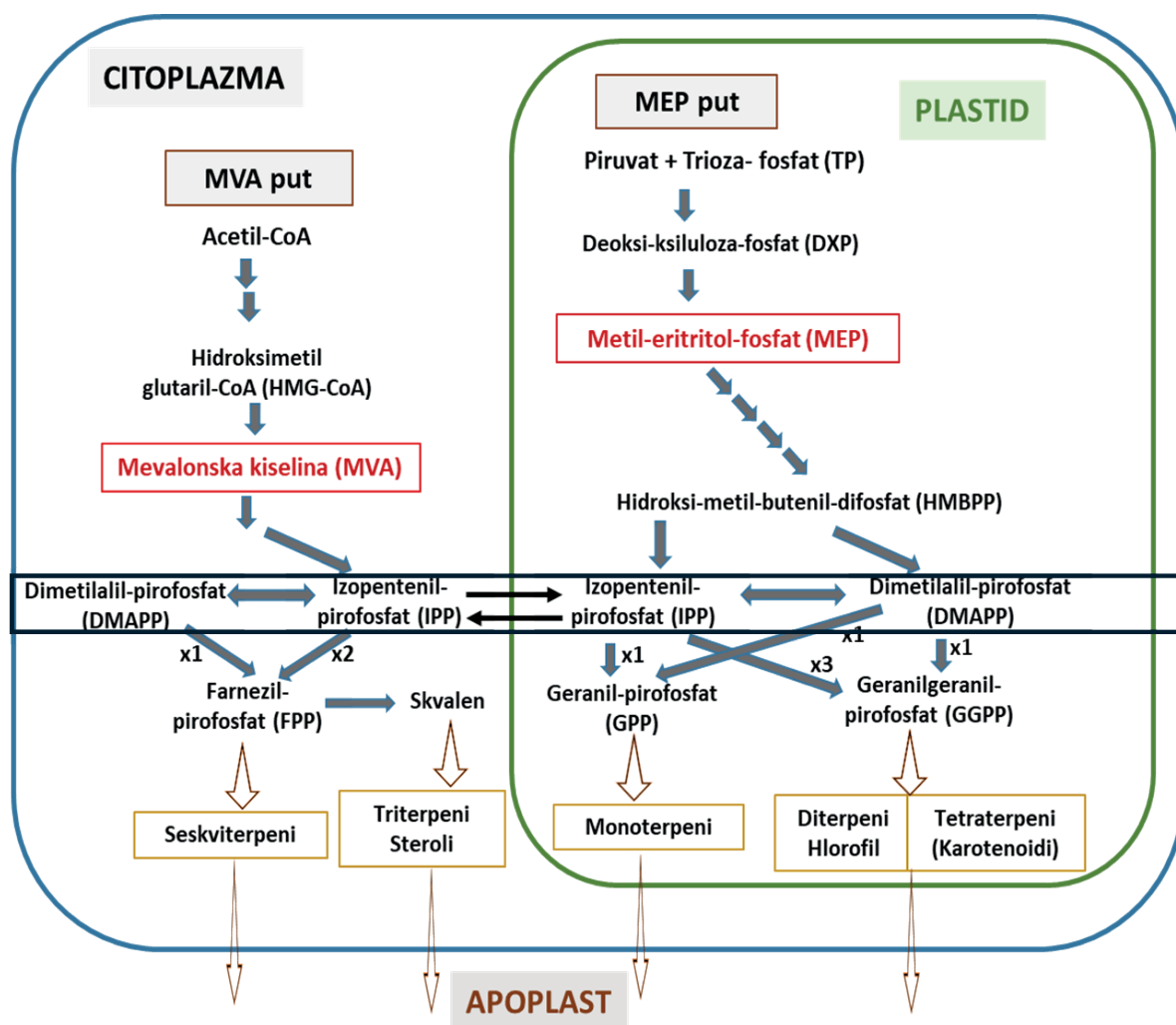
- MVA put sinteze (preko mevalonske kiseline), u citoplazmi, za koji se sve do kraja 90-ih godina XX veka smatralo da je jedini put, i
- MEP put sinteze (preko metil-eritritol fosfata), u hloroplastima, u novije vreme posebno istraživan i definisan (**Sl. 1.15**).

- MVA put sinteze IPP i DMAPP u citoplazmi:

Izopentenil pirofosfat (IPP) se formira u citoplazmi ćelije iz glavnog prekursora, acetil-CoA; tri molekula preko intermedijera, hidroksimetil-glutaril CoA (HMG-CoA), formiraju mevalonsku kiselinu (MVA), sa 6 C atoma, koja dekarboksilacijom prelazi u jedinjenje sa 5 C atoma, IPP, odnosno DMAPP (**Sl. 1.15**). Enzim HMG-CoA reduktaza je ključni regulatorni enzim u sintezi IPP preko MVA puta. Izomerizacijom IPP formira se dimetilalil-pirofosfat (DMAPP), a kasnijim dodavanjem IPP jedinica, formiraju se jedinjenja/ intermedijeri – terpeni, sa različitim brojem C atoma.

- MEP put sinteze IPP i DMAPP u hloroplastima:

Ovaj put počinje kondenzacijom piruvata (pirogroždane kiseline) i glicerinaldehid fosfata (trioza-fosfata), pri čemu nastaje deoksi-ksiluloza fosfat (DXP). DXP se redukciono izomerizuje enzimom *DXP redukto-isomerasom* (DXR, ili IspC) do **metil-eritritol fosfata (MEP)**, po čemu je ovaj metabolički put i dobio naziv. U seriji reakcija koje su katalisane brojnim enzimima formira se hidroksi-metil-butenil pirofosfat (HMBPP), a u krajnjim reakcijama reduktivne dehidratacije i formiranja IPP/DMAPP, učesće imaju enzimi koji sadrže gvožđe i sumpor (**Sl. 1.15**).



Sl. 1.15. Kompartmentalnost sinteze izoprenoida i glavnih prekursora fitola (terpena): MVA put u citoplazmi i MEP put u hloroplastu.

Fitol, diterpenoid (diterpenski alkohol) je derivat **geranilgerani(o)l-pirofosfata (GGPP)** sa 20 C atoma, koji

je nastao kondenzacijom 3 molekula IPP (3x C_5) i 1 molekula DMAPP (1x C_5), nastalih u MEP (MVA) biohemij-skom putu. Važan enzim je *geranilgeranil-pirofosfat sintaza*. Konverzija GGPP u fitol, odnosno njegovu fosforilisanu, metabolički aktivnu formu, **fitil-pirofosfat** (PPP) je katalisana i koordinisana enzimom *geranilgeranil-reduktazom* (GGR) i teče uporedo sa sintezom porfirinskog prstena. Najvažniji enzim koji katališe esterifikaciju i formiranje prvog intermedijera, **geranilgeranil-hlorofilida a** je enzim *hlorofil-sintaza* (engl. *Chl-syn*). Konačna reakcija u formiranju hlorofila a je hidrogenacija (redukcija) geranilgeranil-hlorofilida a enzimom *geranilgeranil-reduktazom* (GGR) (**Sl. 1.13**).

U zelenim listovima (u hloroplastima), GGPP se prvo pretvara u fitil-pirofosfat (PPP) i potom, esterifikuje sa hlorofilidom a da bi se formirao hlorofil a . U etioplastima (na početku ozelenjavanja), GGPP se prvo esterifikuje sa hlorofilidom a , a proizvod geranilgeranil-hlorofilid a se potom sukcesivno hidrogenizuje sa NADPH (katalisano *geranilgeranil-reduktazom*) da bi se na kraju formirao hlorofil a . Ovakav sled reakcija je posledica nedostatka NADPH i/ili niske aktivnosti GGR u etioliranim biljnim organima na početku ozelenjavanja.

Geranilgeranil-pirofosfat (C_{20}) je važan intermedijer ne samo u sintezi hlorofila, već i u putevima biosinteze vitamina E (tokoferol), vitamina K (filohinona), karotenoida, biljnih hormona (giberelina) i dr.

Hlorofil b se formira od hlorofilida a oksigenacijom sa molekularnim kiseonikom uz katalitičku ulogu enzima *hlorofilid a oksigenaze*, čime se metil grupa hlorofilida a (na II (B) pirolovom prstenu) pretvara u aldehidnu grupu. Ova reakcija oksigenacije teče u dva koraka, a nastali hlorofilid b se zatim vezuje sa fitolnim bočnim lancem pomoću enzima *hlorofil sintaze* čime se formira hlorofil b (**Sl. 1.13**).

Kvantitativni odnos Hl a /Hl b regulisan je reverzibilnom konverzijom: hlorofilid a - Hlorofil b - hlorofil(id) a , što predstavlja tzv. „hlorofilni ciklus“.

Za sintezu hlorofila neophodni su makro- i mikronutrijenti, azot, fosfor, kalijum, magnezijum, sumpor, gvožđe, bakar, mangan, cink i dr., dakle, svi elementi koji su konstituenti molekula hlorofila, ili obezbeđuju rad brojnih enzima. Poremećaji u sintezi hlorofila, manifestuju se hlorozom (odsustvom boje) listova.

1.3.2.2. Karotenoidi

Karotenoidi predstavljaju veliku klasu, od preko 1000 *fotosintetičkih pigmenata*, žuto-narandžasto-crvene boje, koje sintetišu biljke, alge i fotosintetičke bakterije. Osim fotosintetičkih organizama i neke gljive i ne-fotosintetičke bakterije sintetišu karotenoide. U biljkama su prisutni kao **karoteni** i njihovi oksidovani derivati, **ksantofili**. Karotenoidi imaju esencijalnu ulogu u procesu fotosinteze, gde kao komponente „antena“ pigmentno-proteinskih kompleksa oba fotosistema (LHC I i LHC II) obezbeđuju „sakupljanje“ svetlosne eks-citacione energije i njen prenos do reakcionih centara (hlorofila a u PS I i PS II). Njihova boja ukazuje na to da oni ne reflektuju zeleni deo spektra kao hlorofili, već apsorbuju ljubičasto-plavi i veći deo zelene svetlosti (λ_{max} = 400–500 nm). Zbog ovakvog spektra apsorpcije, karotenoidi značajno povećavaju efikasnost iskorišćavanja elektromagnetnog zračenja u fotosintetičke svrhe (Tabela 1.2.).

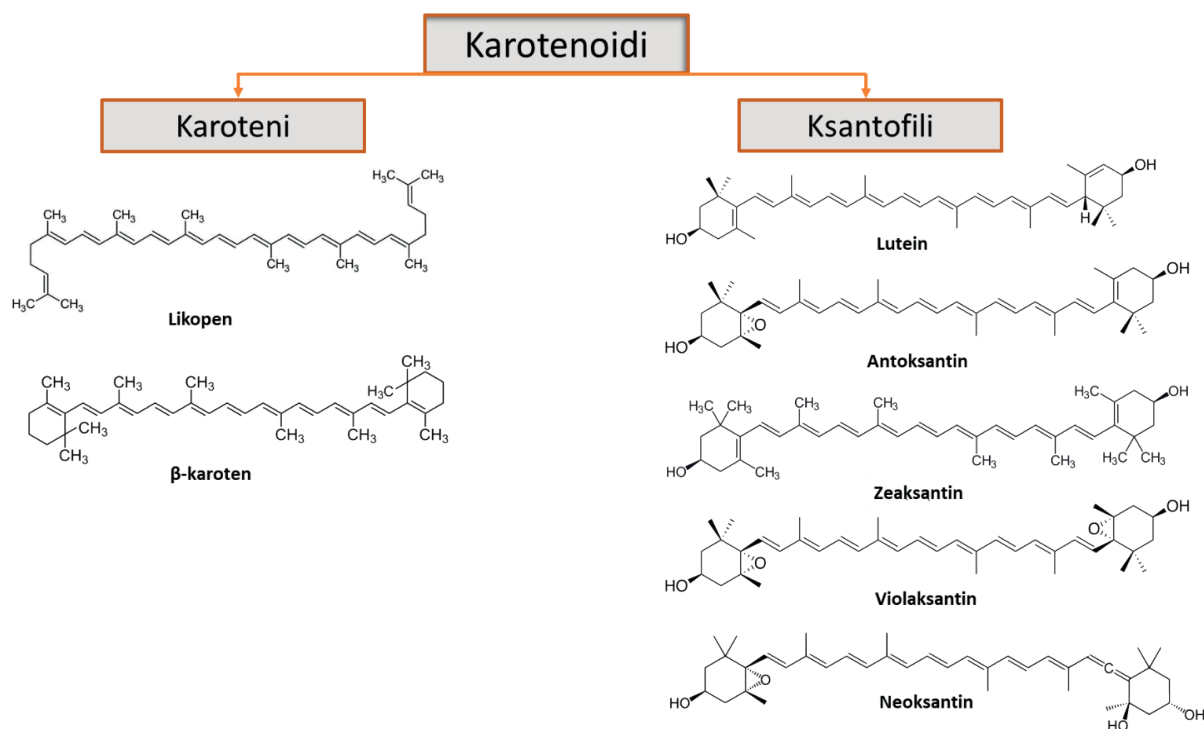
Tabela. 1.2. Najčešće zastupljeni karotenoidi, talasne dužine apsorpcionih maksimuma (λ_{max} , nm) i zastupljenost u različitim vrstama.

Pigmenti	$\approx \lambda_{max}$ (nm)	Prisutni u fotosintetičkom aparatu:
β -karoten ($C_{40}H_{56}$)	466–497	Više biljke, većina algi i neke modrozelenne bakterije (Cyanobacteria)
α -karoten	454–485	Više biljke i neke alge
Lutein	440–464–500	Više biljke, zelene (Chlorophyta) i crvene (Rhodophyta) alge, modrozelenne bakterije (Cyanobacteria)
Violaksantin	417–442–472	Više biljke, neke alge i modrozelenne bakterije (Cyanobacteria)
Zeaksantin	450–475–513	Više biljke, neke alge i modrozelenne bakterije (Cyanobacteria)
Fukoksantin	450–540	Silikatne (Diatomea) i mrke (Phaeophyta) alge
Fikoeritrin	490–565	Crvene alge (Rhodophyta) i neke modrozelenne bakterije (Cyanobacteria)

Druga, jednako važna uloga karotenoida je zaštita fotosintetičkog aparata od njegove oksidativne destrukcije izazvane prevelikim svetlosnim intenzitetima i proizvodnjom reaktivnih kiseoničnih molekula (slobodnih radikala, ROS). Stoga su karotenoidi snažni antioksidanti sa fotoprotektnom ulogom.

U voću i povrću koje se najčešće koristi u ljudskoj ishrani nalazi se preko 50 vrsta karotenoida koji imaju izuzetno važnu nutritivnu i zaštitnu (antioksidantnu) ulogu u organizmima konzumenata: α - i β -karoten imaju ulogu provitamina A: metabolički se u ljudskom organizmu prevode u vitamin A (retinol).

Boja karotenoida i izražena antioksidativna, odnosno, reduktivna svojstva proističu iz njihove strukture: to su izoprenoidi sa osnovnim skeletom koji je sačinjen od osam izoprenskih jedinica (C5), što rezultira u molekularnoj konfiguraciji nerazgranatog ugljovodoničnog lanca C40 koji sadrži od 9 do 11 dvostrukih nezasićenih kovalentnih veza. Ove veze daju snažan reduktivni potencijal karotenoidima i sposobnost efikasnog transporta elektrona kroz molekul, kao i transport apsorbovane ekscitirajuće energije na reakcione centre. **Karoteni** su sačinjeni samo od ugljenika i vodonika, sa ugljovodoničnim kosturom $C_{40}H_{56}$, dok **ksantofili** u svojoj strukturi imaju jedan ili više molekula kiseonika koji se nalaze u hidroksilnim, karboksilnim, keto, ili epoksi grupama. Ugljovodonični karotenoidni lanac može da ima na krajevima, jedan, ili dva prstena, ili pak, da se završava bez prstena, te stoga postoje *aciklični*, *monociklični* i *biciklični* karotenoidi. Na Sl. 1.16. prikazana je hemijska struktura najzastupljenijih karotenoida.

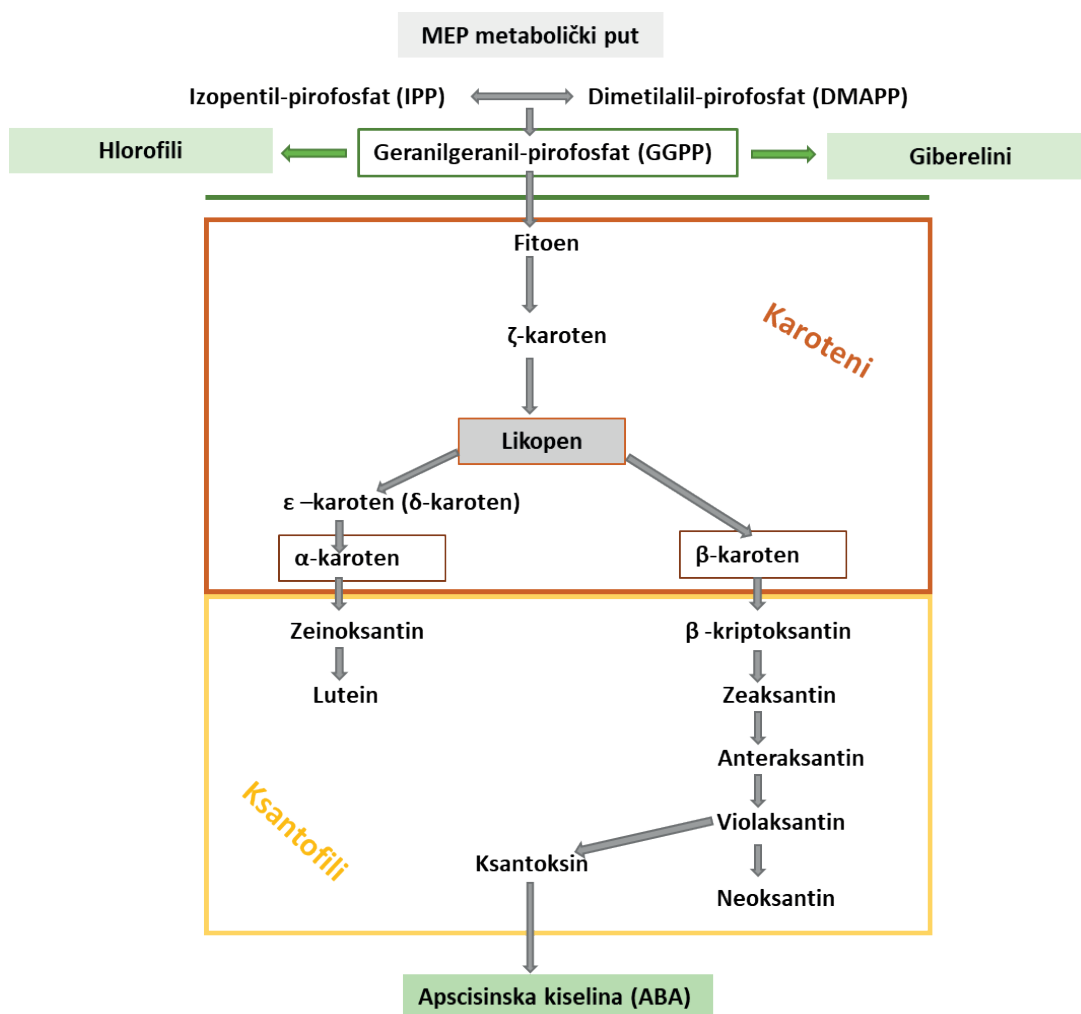


Sl. 1.16. Podela i hemijska struktura najzastupljenijih karotenoida.

1.3.2.2.1. Biosinteza karotenoida

Kao što je rečeno, karotenoidi po strukturnoj, odnosno, molekularnoj organizaciji spadaju u grupu izoprenoida – tetraterpena i stoga predstavljaju derivate izoprenoidnog biosintetičkog puta koji može da se dešava u citoplazmi preko glavnog intermedijera *mevalonske kiseline* (*MEV put*), ili u plastidima preko *metile-ritritol-fosfata* (*MEP put*). Ovo je zajednički metabolički put biosinteze hlorofila, karotenoida, giberelinske kiseline i abscisinske kiseline. Prva specifična reakcija u biosintezi karotenoida je kondenzacija dva molekula geranilgeranil-pirofosfata (GGPP) u **fitoen** (15-cis-fitoen, $C_{40}H_{64}$) uz katalitičku aktivnost enzima *fitoen-sintaze* (PSY) (**Sl. 1.17**). Nastali fitoen se preko nekoliko reakcija desaturacije katalisanih enzimima *desaturazama* i intermedijera **ζ-karotena** preobraća u **likopen** ($C_{40}H_{56}$). Enzimi desaturaze uvode četiri dvostruke veze u molekul fitoena uz aktivnost enzima *karotenoid-izomeraze* kojima se preobraćaju cis- u trans- molekulske forme.

Nakon reakcija *desaturacije*, u biosintetičkom putu sinteze karotenoida, dolazi do *ciklizacije* nastalog *likopena*, što predstavlja kritičnu tačku grananja karotenoida, različitih u odnosu na krajnje grupe (**Sl. 1.17**).



Sl. 1.17. Biosinteza karotenoida – MEP (metileritritol-fosfatni) put.

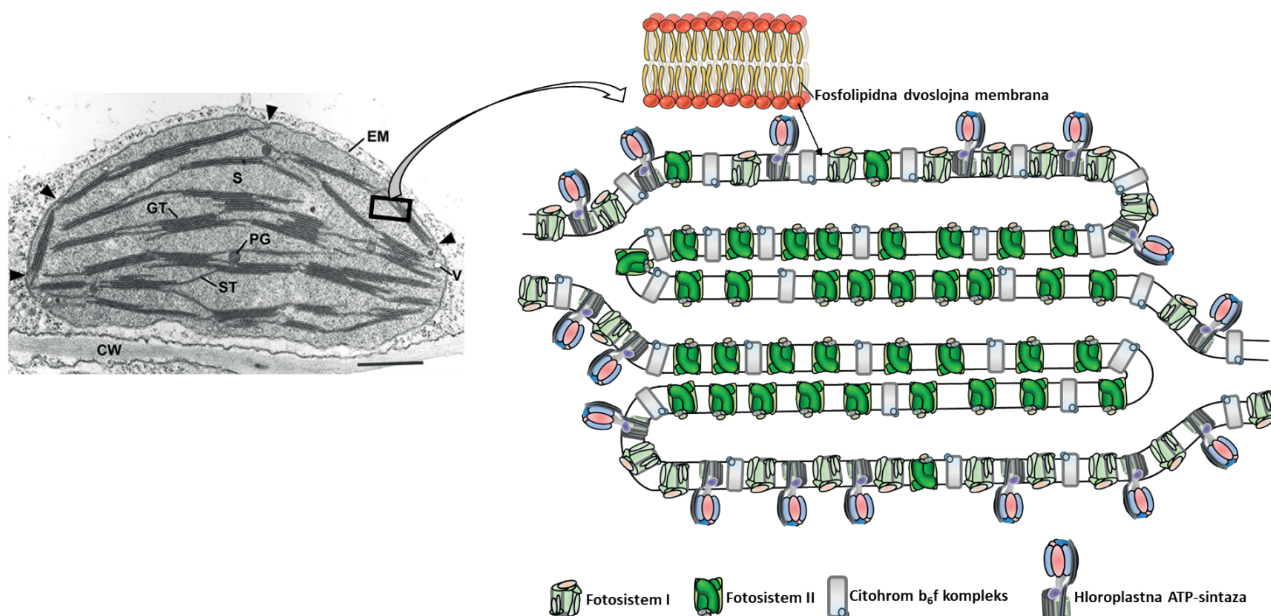
Specifična ciklizacija dovodi do sinteze različitih vrsta karotenoida u zavisnosti od prirode terminalnog prstena, a započinje formiranjem dve glavne grane: α-grana (sa ε-prstenom) i β-grana (sa β-prstenom). Ovo grananje u biosintezi je katalisano specifičnim enzimima koji pripadaju familiji *ciklaza* (*likopen ε-ciklaza*, odnosno, *likopen β-ciklaza*). Tako, α-karoten prelazi u **lutein** uzastopnim hidroksilacijama katalisanim enzimima *hidroksilazama*. Lutein je najrasprostranjeniji ksantofil u biljkama, nije provitamin A, ali ima izuzetna hranljiva i antioksidativna svojstva u ishrani. Važan je strukturni stabilizator „antena“ pigmentno-proteinskih kompleksa, omogućuje transport ekscitacione energije kroz fotosisteme i zaštitu fotosistema od fotodestrukcije. U drugoj grani biosinteze, hidroksilacija β-karotena dovodi preko nekoliko intermedijera do sinteze **zeaksantina**, koji potom, uz katalitičko dejstvo enzima *zeaksantin-epoksidaza* prelazi u **anteraksantin** i potom u **violaksantin**, važan intermedijer i u sintezi ABA.

1.4. Molekularna organizacija tilakoida: fotosintetički aparat – fotosintetičke jedinice

Kao što je ranije objašnjeno, tilakoidne membrane u hloroplastima viših biljaka organizovane su u dva strukturno-funkcionalna odeljka: *lamelle grana* (*grana region*), odeljak koji čine grupe membranskih diskova (pečnika od 300 do 600 nm), paralelno naslaganih, koji zatvaraju unutrašnji prostor – lumen tilakoida. Grana tilakoidni regioni su povezani pojedinačnim tilakoidima koji se prostiru kroz stromu hloroplasta – *lamelle strome*.

U procesu fotosinteze, konverzija svetlosne energije u elektrohemijski potencijal koji će rezultirati sintezom ATP i NADPH, zahteva dva fotosistema koji funkcionišu sinhrono i koji su kod viših biljaka integrisani u tilakoidne membrane hloroplasta. Morfo-anatomska svojstva hloroplasta i tilakoida već su objašnjeni u odeljku 1.3., a ovde će akcenat biti na strukturno-funkcionalnoj i molekulskoj organizaciji tilakoida, koje određuju njihovu ulogu u fotosintezi.

Tilakoidi hloroplasta viših biljaka su specifične biomembrane sačinjene od dva sloja molekula lipida (dvosloj, bilejer). U lipidni matriks su uronjeni specifični pigmentno-proteinski kompleksi i kofaktori (**Sl. 1.18**).



Sl. 1.18. Tilakoidne membrane hloroplasta u svojoj osnovnoj strukturi imaju lipidni dvosloj sa četiri multiproteinska kompleksa: fotosistem I (PSI), fotosistem II (PSII), citohrom b_6f kompleks i enzim ATP-sintaza (CF_0CF_1 kompleks; Hloroplastna H^+ ATP-sintaza). Adaptirano prema Staehelin i Paolillo (2020). Elektronski izvori slika, str. 101.

1.4.1. Struktura fotosintetičkog aparata viših biljaka

Strukturno-funkcionalne komponente tilakoida su osim lipidnog dvosloja i **četiri glavna proteinska kompleksa** koji obezbeđuju funkcionisanje „mašinerije“ za proces fotosinteze, a to su:

- Fotosistem I (FS I ili engl. PS I),
- Fotosistem II (FS II ili engl. PS II),
- Citohrom b_6f kompleks (Cit b_6f ili engl. Cyt b_6f)
- ATP sintaza (ATPsin ili engl. ATPsyn).

U lipidni matriks tilakoidnih membrana uronjeni su još *plastohinon* (PH ili PQ) i *plactocijanin* (PC), koji predstavljaju nisko-molekularne (pokretne) prenosiocce elektrona između fotosistema.

Lipidi tilakoida su sredina u kojoj se dešavaju transport elektrona i fotohemijske reakcije u svetlosnoj fazi fotosinteze. Lipidni matriks tilakoida sprečava slobodnu difuziju jona kroz membranu i na taj način omogućava raslojavanje naelektrisanja između stromalne strane tilakoida i prostora u lumenu tilakoida, te stvaranje elektrohemijske potencijalne razlike između dve strane membrane i generisanje membranskog potencijala, što je od esencijalnog značaja za funkcionisanje ATP sintaze. Specifični lipidi tilakoida pripadaju dvema klasama *galaktolipida* (monogalaktosil-diacil-glicerol (MGDG) i digalaktosil-diacil-glicerol (DGDG)), jednoj kla-

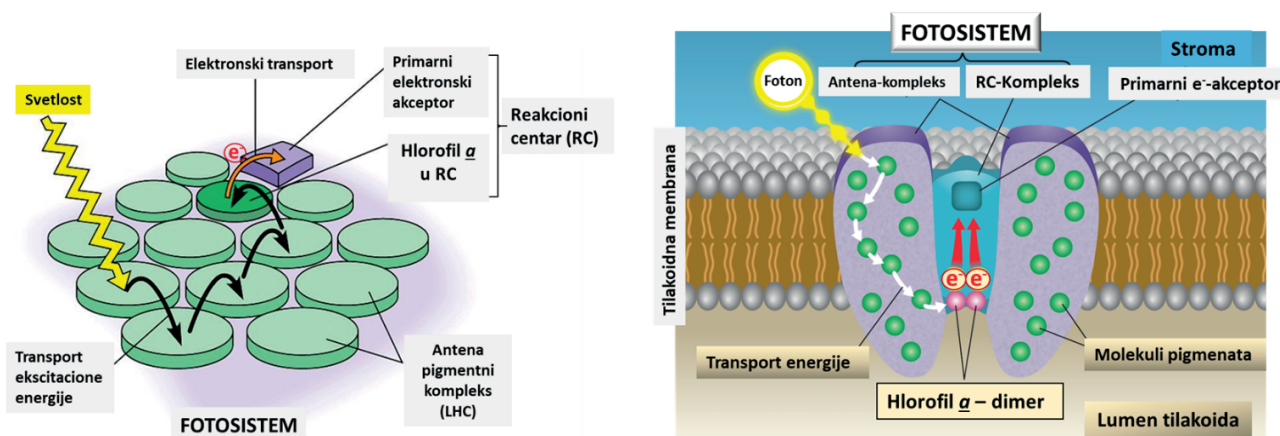
si *sulfolipida* (sulfohinovosil-diacil-glicerol (SHDG / SQDG)) i jednoj klasi *fosfolipida* (fosfatidil-glicerol (FG / PG)).

Molekuli fotosintetičkih pigmenata ne funkcionišu u procesu fotosinteze pojedinačno, već u grupama, **pigmentno-proteinskim kompleksima** koji se nazivaju **Fotosintetičke jedinice – Fotosistemi (FS, ili PS)**.

Fotosintetičku jedinicu – fotosistem čini:

- **Reakcioni centar (RC)** predstavlja fotohemijski aktivne molekule **hlorofila *a*** od kojih kreće proces fotosinteze (primarni fotohemijski akt). Molekuli hlorofila *a* u RC su stoga, *primarni donori elektrona*, koji nakog inicijalnog pobuđivanja fotonima, predaju ekscitirane elektrone *primarnom elektronskom akceptoru* koji je deo elektron-transportnog lanca;
- **Kofaktori elektron-transportnog lanca** smešteni u proteinima reakcionog centra. Funkcionišu u elektronskom transportu po sistemu akceptor-donor, čime je ostvaren transport duž gradijenta elektro-hemijskog potencijala;
- **„Antena“ kompleks ili LHC** (engl. Light Harvesting Complex) je grupa fotosintetičkih pigmenata, hlorofila (*a* i *b*) i karotenoida, organizovanih u pigmentno-proteinske komplekse sa ulogom u prikupljanju svetlosne energije za ekscitaciju hlorofila *a* u reakcionim centrima fotosistema (**Sl. 1.19**). Ovi pigmenti se ne menjaju hemijski, nego prenose energiju induktivnom rezonancom, dok se hlorofil *a* u reakcionom centru nakon predaje elektrona primarnom akceptoru, oksiduje (hemijski promeni).

Postoje dva fotosistema (FS I i FS II) koji su na tačno određen način raspoređeni u tilakoidima. Opšta strukturno-funkcionalna organizacija fotosistema prikazana je na **Sl. 1.19**.



Sl. 1.19. Opšta šema fotosistema (FS, PS).
Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 101.

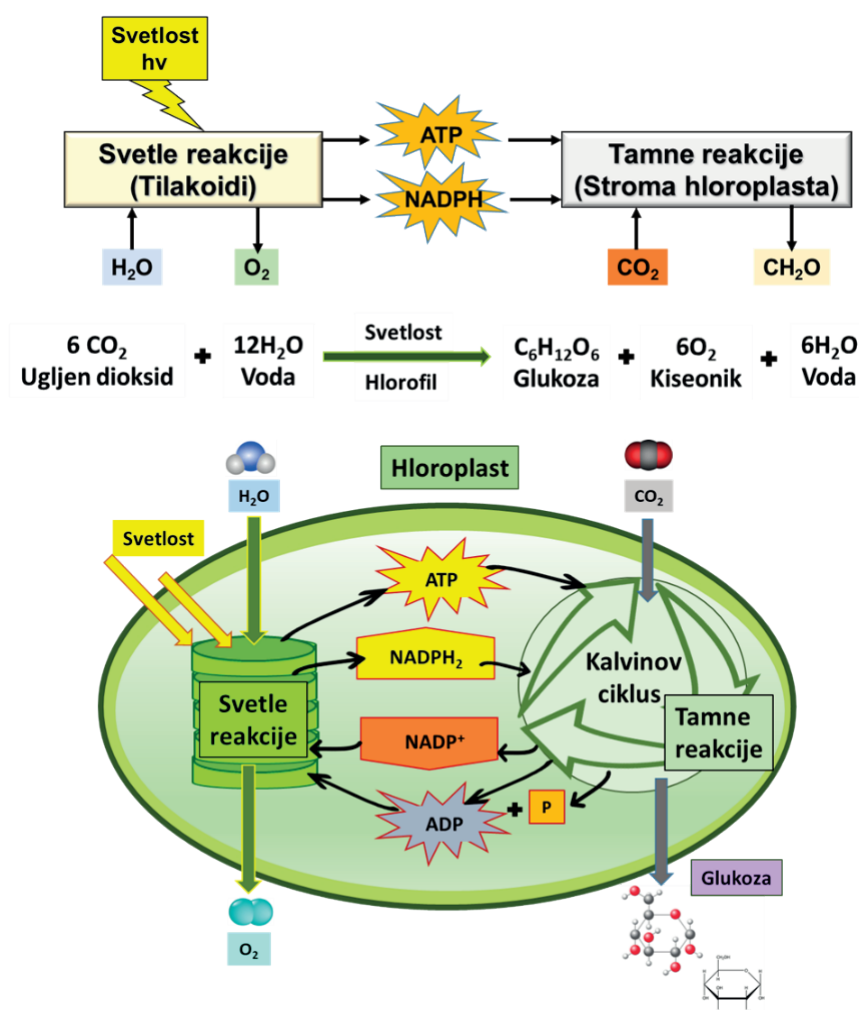
O strukturi i molekularnoj organizaciji fotosintetičkih jedinica biće više reči kada se bude govorilo o mehanizmu fotosinteze i funkciji svake komponente u transportu elektrona (svetlim reakcijama).

1.5. Mehanizam fotosinteze

Kompleksni proces fotosinteze kojim se svetlosna energija nakon apsorpcije od strane fotosintetičkih pigmenata preobraća u hemijsku energiju deponovanu u makroenergetska jedinjenja i organsku materiju (šećer – glukozu), sastoji se od dve faze, svetlosne i tamne, odnosno, čine je dve grupe reakcija koje teku isto-

vremeno (sinhrono) na svetlosti, to su:

- **Svetlosne (svetle / reakcije zavisne od svetlosti)** – dešavaju se u tilakoidima hloroplasta i koriste energiju sunčeve svetlosti za nastanak makroenergetskih jedinjenja ATP i NADPH, koji omogućavaju (energizuju) pokretanje i sinhroni tok tamnih reakcija. Produkt svetlosnih reakcija je i O_2 koji nastaje fotolizom H_2O ;
- **Tamne (reakcije nezavisne od svetlosti)** – nazivaju se i Kalvinov ciklus (po Melvinu Kalvinu koji ga je otkrio), dešavaju se u stromi hloroplasta i za njih nije potrebna neposredna apsorpcija svetlosti kao za svetlosne, ali je potrebna energija ATP i NADPH nastalih u svetlosnim reakcijama. Istovremeno, za aktivaciju nekoliko enzima tamne faze fotosinteze, potrebna je svetlost. Produkt ovih reakcija je organska materija (šećer). Opšti mehanizam fotosinteze i jednačina glavnih ulaznih i izlaznih parametara su predstavljeni na **Sl. 1.20**.



Sl. 1.20. Mehanizam fotosinteze i opšta hemijska jednačina procesa.

1.5.1. Svetlosne reakcije fotosinteze

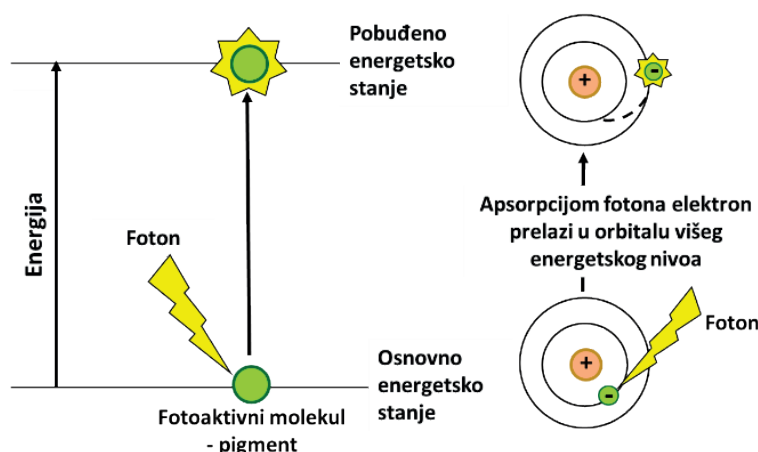
Apsorpcijom fotona od strane hlorofila a u RC pokreću se fotosintetičke reakcije zavisne od svetlosti, to su:

- apsorpcija svetlosti,

- transport elektrona,
- sinteza ATP i NADPH (fotofosforilacija) i
- aktivacija enzima koji katališu reakcije Kalvinovog ciklusa.

1.5.1.1. Apsorpcija svetlosti

Kada molekul pigmenta (hromofora) apsorbira foton (tačno određene talasne dužine – energije), prelazi iz stabilnog u pobuđeno (*ekscitirano*) stanje (**Sl. 1.21**).

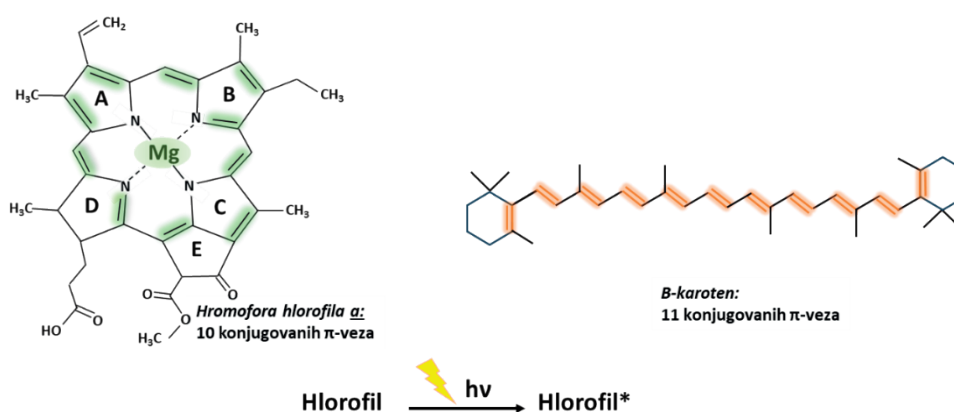


Sl. 1.21. Pobuđeno stanje se na subatomsom nivou dešava kada atom primljenu energiju fotona iskoristi za prelazak elektrona u energetski višu elektronsku orbitalu, udaljeniju od jezgra atoma. U pobuđenom singletnom stanju, elektron je u istoj spin orijentaciji kao što je bio u osnovnom stanju, dok pobuđeno tripletno stanje znači da ekscitirani elektron ima istu orijentaciju spina (paralelno) sa drugim nesparenim elektronom u orbitali.

Šta se dešava kada fotosintetički pigment (hromofora) apsorbira foton?

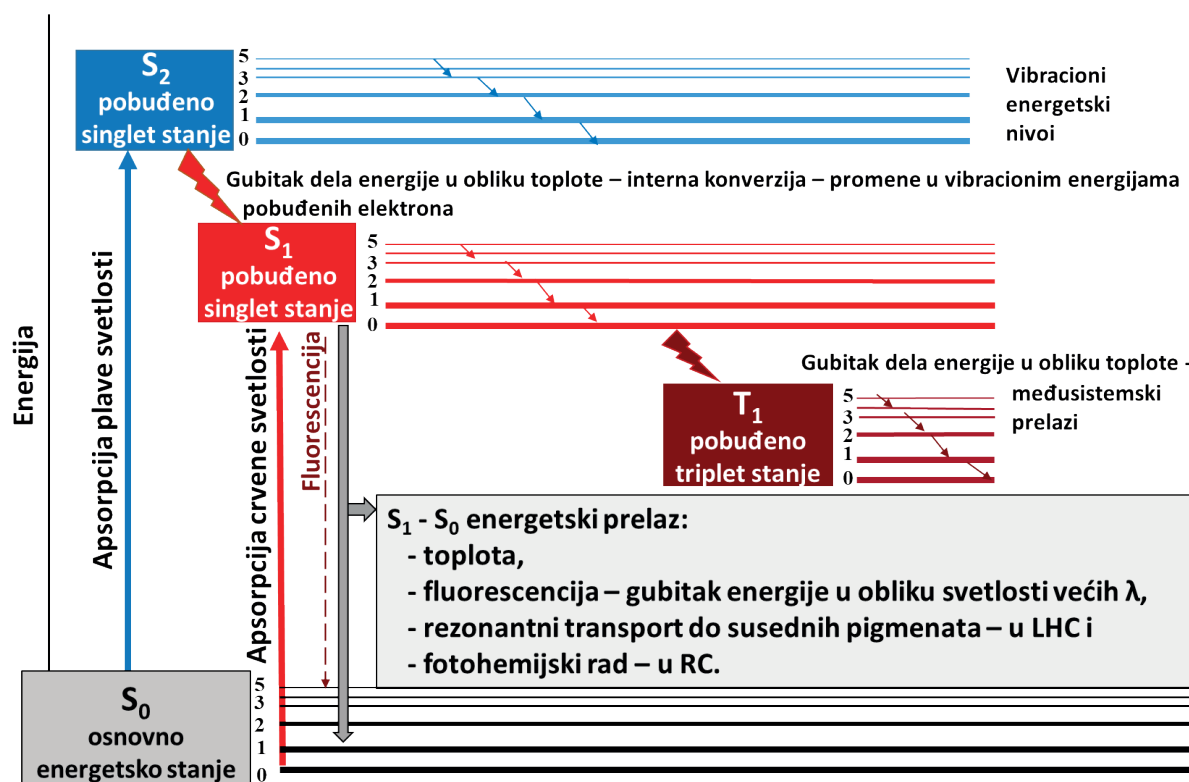
Hlorofil je stabilan molekul koji ima hromoforu u obliku (porfirinskog) prstena oko kojeg elektroni mogu slobodno da migriraju. Pošto se elektroni slobodno kreću, prsten ima potencijal da lako primi ili izgubi elektrone, a samim tim i potencijal da preda pobuđene (energizovane) elektrone susednim molekulima. Ovo je osnovni proces kojim hlorofil apsorbira ("hvata") energiju sunčeve svetlosti, tako da apsorpcijom svetlosti molekul hlorofila prelazi u pobuđeno (ekscitirano) stanje (hlorofil*) (**Sl. 1.22**).

Samo fotoni određene talasne dužine imaju energiju koja zadovoljava energetske prelaze u hromofori molekula pigmenta, što je proces „sve ili ništa“, odnosno, energija se apsorbira samo u diskretnim (tačno određenim, odvojenim) kvantima, što dovodi do diskretnih pobuđenih stanja i svojstva da svaki optički aktivan molekul ima specifičan spektar apsorpcije. Energija potrebna za pobuđivanje hromofora zavisi od strukture hromofora i broja konjugovanih dvostrukih veza. Konjugovane dvostruke π -veze predstavljaju alternativnu organizaciju jednostrukih i dvostrukih veza, dislocirane su, što znači da dele π -elektrone koji su na taj način distribuirani preko celog konjugovanog sistema (hromofore). Ovim se povećava apsorpciona površina po jedinici kvadrata molekula hromofore (**Sl. 1.22**).



Sl. 1.22. Konjugovane dvostruke veze (alternativna organizacija jednostrukih i dvostrukih veza) u hromofori (porfirinskom prstenu) molekula hlorofila *a* i u molekulu β -karotena.

Različiti pigmenti apsorbiraju različite talasne dužine, jer zbog specifične molekulske strukture imaju tačno određene „energetske praznine“ između elektronskih orbitala. Nakon apsorpcije fotona ($h\nu$), π -elektroni konjugovanog sistema dvostrukih veza podižu se na višu orbitalu i dolaze na prvo pobuđeno singlet stanje (S_1). Pošto je pravilo da veći broj konjugovanih dvostrukih veza u hromofori, znači manju energiju koja je potrebna za ekscitaciju π -elektrona u prvo singletno stanje (S_1), energija „crvenih fotona“ većih λ i manje energije energetski zadovoljava ove prelaze. Iz spektra apsorpcije fotosintetičkih pigmenata (FAR), vidljivo je da hlorofili viših biljaka apsorbiraju i fotone plavog dela spektra, kraćih λ i veće energije, što omogućava ekscitacije π -elektrona do drugog pobuđenog singlet stanja (S_2) (Sl. 1.23).



Sl. 1.23. Energetski/elektronski prelazi fotoaktivnih molekula (interna konverzija i intersistemski prelazi) tumače se Jablonski dijagramom.

Za fotosintezu su energetske pogodni fotoni koji pripadaju plavom i crvenom spektru vidljive svetlosti: apsorpcija plavih fotona veće energije dovodi do ekscitacije π -elektrona konjugovanih dvostrukih veza hlorofila i njihovog prelaska u drugo singlet pobuđeno stanje (S_2), dok apsorbirani crveni fotoni energetske zadovoljavaju ekscitaciju π -elektrona do prvog singlet pobuđenog stanja (S_1). Energetske promene: S_2 - S_1 - S_0 mogu da se odvijaju postepeno preko različitih (pod)nivoa vibracije i energije rotacije, čime se razlika energije u potpunosti pretvara u toplotu. Rasipanje energije preko toplote snižava energetske nivo π -elektrona sa S_1 do prvog tripletnog stanja (T_1), koje ne može biti ostvareno direktno ekscitacijom sa nivoa S_0 .

Na **Sl. 1.23.** se vidi da su fotoni crvene svetlosti, iako manje energije, jednako funkcionalni u procesu fotosinteze kao plavi fotoni, jer se prilikom povratka na prethodni nivo ekscitiranog molekula hlorofila prelazom π -elektrona sa S_2 na S_1 , energija gubi kao toplota (i/ili fluorescencija), ne iskorišćava se za proces fotosinteze, dok se pri energetskim prelazima S_1 u S_0 , apsorbirana energija oslobađa na četiri načina, to su:

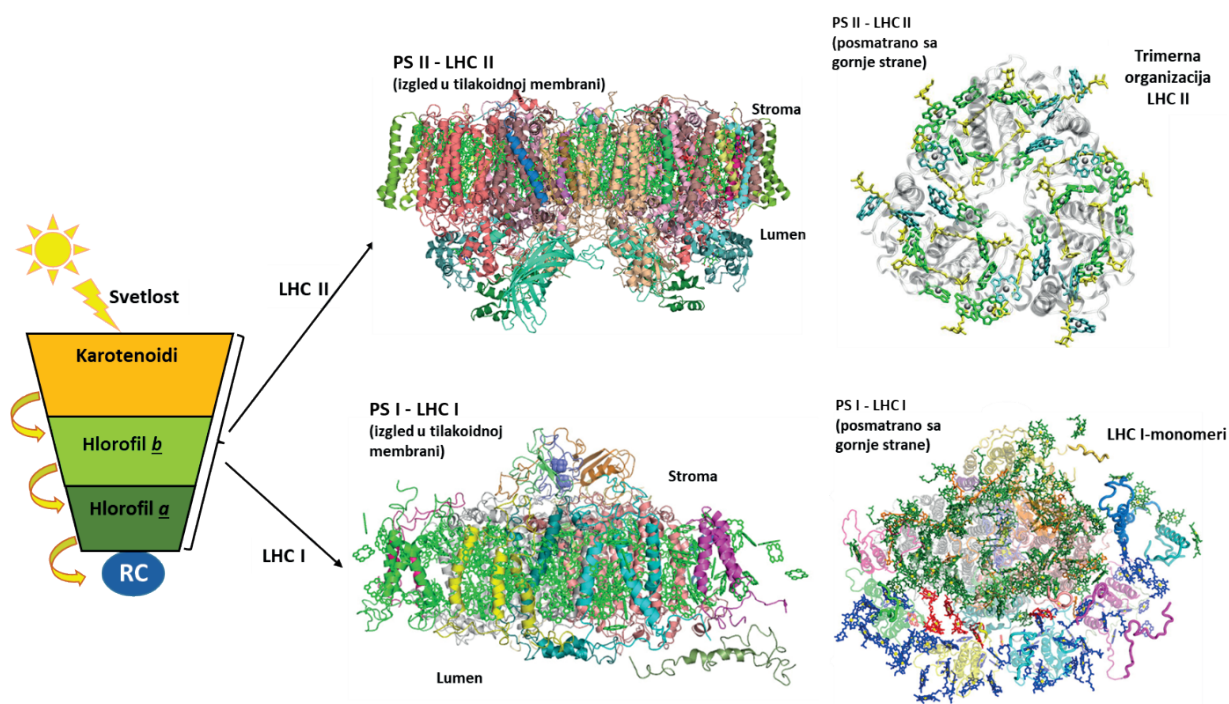
- toplota,
- fluorescencija (foton veće talasne dužine i manje energije od apsorbirane, dešava se kada elektron prelazi na niži energetske nivo, ne u osnovno stanje),
- rezonantni transport do susednog molekula pigmenta (u antenskim pigmentnim kompleksima (LHC) - kada elektron prelazi na niži energetske nivo) što je značajno za proces fotosinteze i
- fotohemijski (fotosintetički) rad u molekulu hlorofila a u RC – kada ekscitirani π -elektron postaje elektronski donator (reduktant) odgovarajućem akceptoru (Feofitin u FS II i A_0 u PS I); ekscitirani elektron se ne vraća u osnovno stanje istog molekula, već prelazi na drugi molekul (akceptor) čime se pokreće niz oksido-redukcionih reakcija, što je značajno za proces fotosinteze.

Treba napomenuti da je apsorpcija porfirinskog prstena (tetrapirola) izmenjena različitim supstituentima, te otuda postoje razlike u apsorpcionim spektrima, o čemu je bilo govora ranije (videti poglavlje u vezi sa prirodom svetlosti i fotosintetički aktivnom radijacijom FAR).

1.5.1.1.1. Apsorpcija svetlosti i rezonantni transport energije u antena kompleksima (LHC)

Efikasna fotosinteza je moguća samo kada se energija fotona različitih talasnih dužina apsorbira od strane antenskih kompleksa (LHC).

„Antena“ pigmentno-proteinski kompleksi fotosistema I (LHC I) i fotosistema II (LHC II) su transmembranski hromoproteini od esencijalnog značaja za izbalansiran i efikasan elektronski transport tokom svetlih reakcija fotosinteze, a koji su vezani preko posebnih pigmentno proteinskih kompleksa za reakcione centre (RC PS I – P_{700} i RC PS II – P_{680}). Kompleks LHC I je integralni deo fotosintetičke jedinice PS I, dok LHC II čine fotosintetički pigmenti koji nisu u celosti integralni deo PS II, već su sa specifičnim proteinima ugrađeni u odvojene komplekse (superkomplekse) trimerne molekulske organizacije (**Sl. 1.24**).



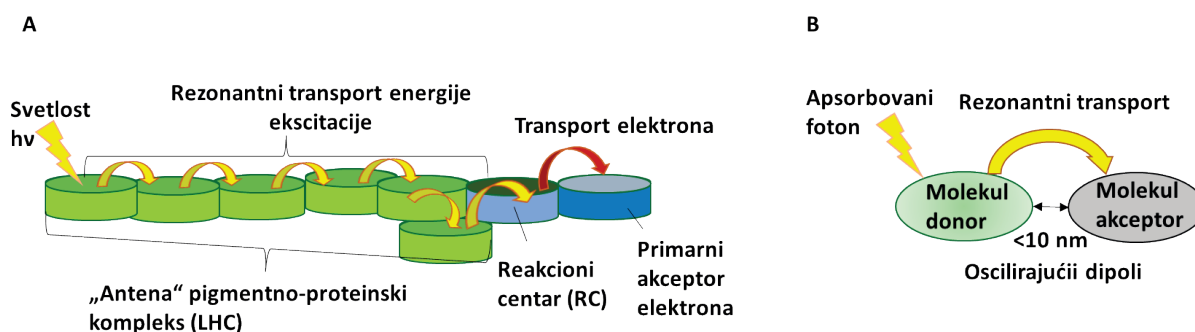
Sl. 1.24. Molekularna organizacija PS II-LHC II and PS I-LHC I super kompleksa kod biljaka: izgled sa gornje strane i izgled u tilakoidnoj membrani. LHC II membranska organizacija proteina i pigmenata karakteristična je po dominantno trimernoj strukturi, dok LHC I pretežno sadrži pigmente i proteine organizovane u monomerne strukture. Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 101.

Za razliku od reakcionih centara (RC), čiji je sastav sličan, čak i kod genetički različitih fotosintetičkih organizama, sastav antena-kompleksa, varira u zavisnosti od vrste fotosistema (LHCI / LHCII), ali i od intenziteta i kvaliteta svetlosti kojoj su biljke izložene i adaptacija u cilju zaštite fotosintetičkog aparata. I pored ove varijabilnosti, može se kao pravilo navesti da u strukturi fotosintetičke jedinice, na jedan reakcioni centar, dolazi nekoliko stotina molekula hlorofila (200–300), dok broj molekula karotenoida i njihov kvalitativni sastav zavisi od intenziteta i kvaliteta svetlosti, činioca koji određuju biosintetičke puteve karotenoida i njihove transformacije, a u cilju što bolje zaštite od fotodestrukcije. Proteini se u antenskim kompleksima viših biljaka nazivaju i hlorofil a/b antena-proteini.

Mehanizam kojim se pobudna (ekscitaciona) energija („eksciton“) prenosi u antenskim kompleksima (LHC) od molekula koji prihvata foton na sledeći pigmentni molekul i dalje u sistemu donor-akceptor do konačnog akceptora, RC, naziva se **rezonancija**. U ovom *rezonantnom energetskom transferu* (engl. fluorescence resonance energy transfer – FRET), dolazi do prenosa apsorbirane svetlosne energije bez pobuđivanja elektrona i njihovog transporta, nema zračenja, već dolazi do rezonantne interakcije između hromofora (fluorofora: molekula pigmenata u hromo-proteinima LHC), nema prevođenja ekscitona u toplotnu energiju (ili vrlo malo, što predstavlja gubitak), niti kinetičkih sudara između molekula donora i akceptorskih molekula. Za apsorpciju svetlosti od strane LHC, frekvencije oscilacija hemijskih veza pigmentnih molekula moraju biti jednake frekvenciji upadnog svetlosnog zračenja, a hemijske veze imaju svojstva električnog dipola. To znači da se emisijski spektar molekula donora (pigmenta – hromofore – fluorofore) mora podudarati (preklapati) sa delom ekscitacionog spektra molekula akceptora da bi se ostvario uspešan fluorescentni rezonantni transport energije.

Efikasnost rezonantnog prenosa zavisi od rastojanja između hromofora ($\leq 10\text{nm}$), pošto su u pitanju dipol-dipol interakcije „dugog dometa“: **pobuđeni molekul pigmenta (hromofora) ponaša se kao oscilira-**

jući dipol koji može razmeniti energiju sa drugim dipolom iste, ili slične rezonantne frekvencije, tako da dolazi do pojave tzv. povezanih (kuplovanih) oscilacija (promenjenih frekvencija oscilacija molekulskih veza) i daljeg prenosa energije do konačnog akceptora (hlorofila *a* u RC). FRET u LHC je od velikog značaja za efikasnost fotosinteze jer se na taj način proširuje opseg talasnih dužina apsorbovanih fotona za fotosintetičke svrhe (**Sl. 1.25**).



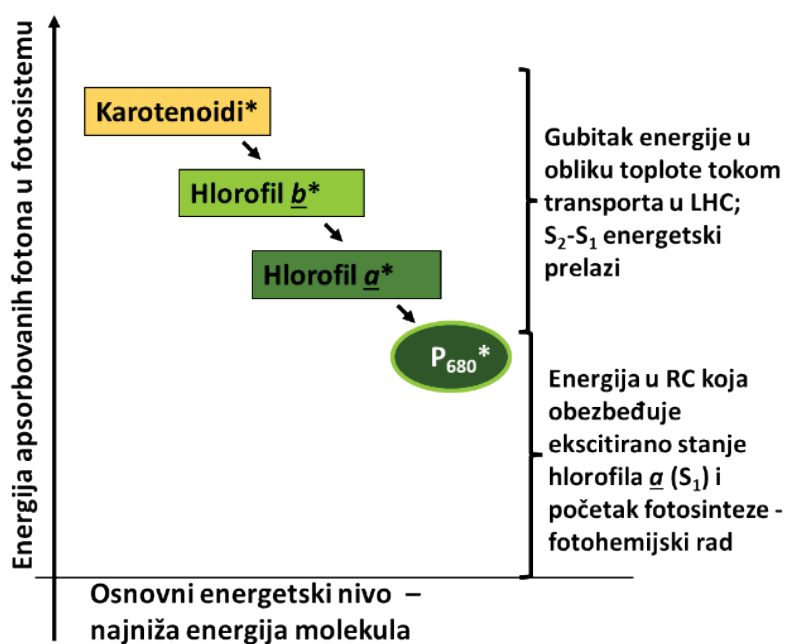
Sl. 1.25. Transport energije kroz fotosistem:

- A. U LHC: Rezonantni transport energije ekscitacije (fluorescence resonance energy transfer – FRET). Molekul donora (fotosintetički pigment) nakon apsorpcije fotona prenosi energiju ekscitacije (eksciton) bez zračenja i bez transporta elektrona do najbližeg akceptora. Distanca između molekula mora biti manja od 10 nm, kako bi rezonancija (oscilirajućeg) molekula akceptora imala ulogu energije ekscitacije sledećeg molekula akceptora;
- B. U reakcionom centru (RC): Transport elektrona nakon apsorpcije fotona.

Kako antenski sistemi LHC I i LHC II mogu da menjaju energetska stanja tokom prenosa energije do RC, moguće je „funktionalno pomeranje“ dela LHC II do PS I i formiranje PSI-LHCI-LHCII čime se povećava efikasnost fotosinteze (elektronski transport kroz PS I) u uslovima velikih svetlosnih intenziteta uz istovremeno bolju zaštitu od fotodestrukcije. Aktivnost i veća efikasnost je preko formiranja super-kompleksa PS I – LHC I – LHC II koordinisana redukcijom hinona i formiranjem plastohinona (PQH₂), aktivacijom enzima kinaze i fosforilacijom proteina u LHC II. Fosforilisani LHC II funkcioniše kao periferni antenna kompleks PS I, zajedno sa LHC I.

1.5.1.1.2. Apsorpcija svetlosti u reakcionim centrima fotosistema (RC FS)

Da bi pobudio fotosintetički reakcioni centar, foton definisane energije mora da reaguje sa molekulom hlorofila *a* u reakcionom centru (RC). Molekuli hlorofila *a* u oba reakciona centra ekscitiraju se neposredno apsorpcijom fotona (u manjoj meri) i apsorpcijom energije fotona koja dolazi rezonantnim putem preko antena kompleksa (**Sl. 1.26**).



Sl. 1.26. Kada jedan od mnogih pigmenata PS apsorbira svetlost, energija se prenosi unutar sistema od pigmenta do pigmenta dok ne dođe do RC, gde ekscitacija π -elektrona hlorofila a u prvo singlet stanje pokreće transport elektrona i fotohemijski rad. Na slici je prikazan transport energije ekscitacije do RC FS II (P_{680}), isto važi za RC FS I (P_{700}).

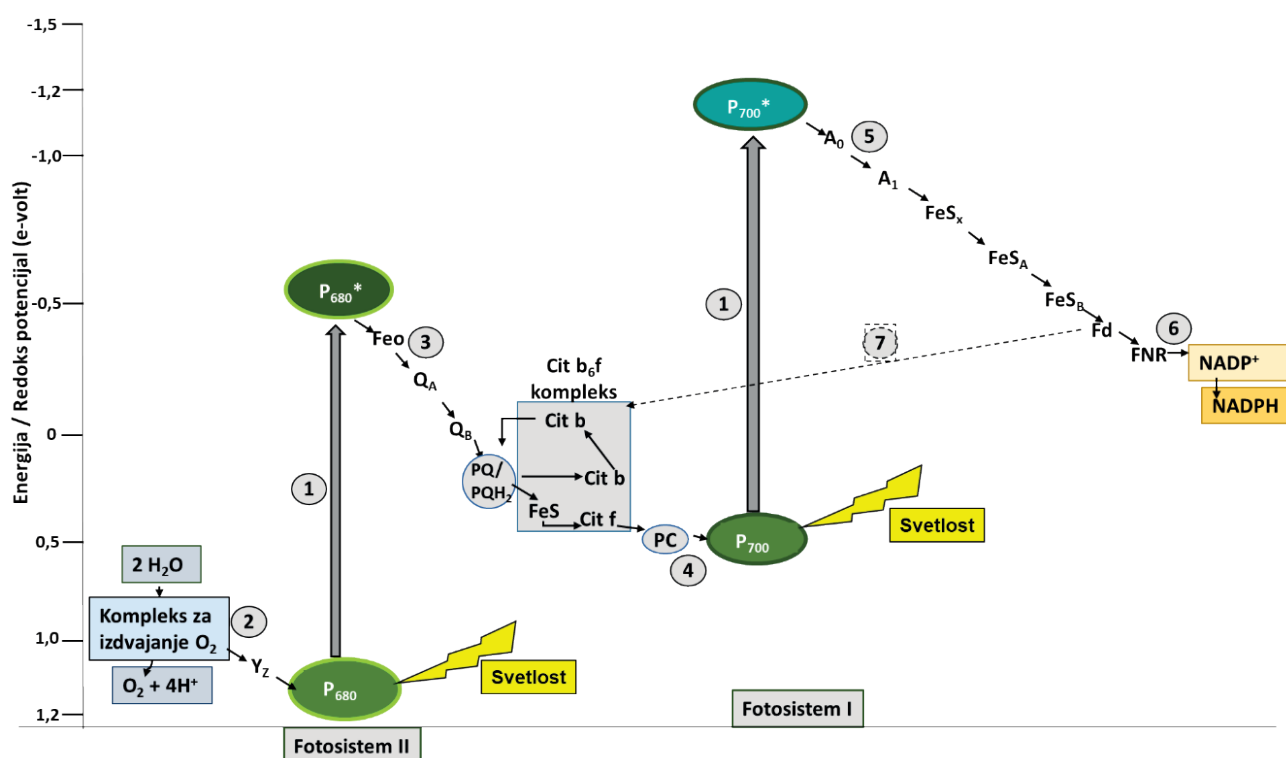
1.5.1.2. Transport elektrona

Proces fotosinteze čini niz oksido-redukcionih hemijskih reakcija u kojima se elektroni pomeraju sa jedinjenja koje se oksiduje na jedinjenje koje se primanjem elektrona redukuje. Kako je već naglašeno, fotosintetički transport elektrona dešava se u membranama tilakoida, ostvaren preko dva fotohemijska kompleksa (PS I i PS II) koji funkcionišu u serijama shodno (redoks) potencijalu svake komponente, kroz dve svetlosne reakcije (**Sl. 1.27**).

Poreklo koncepta dve svetlosne reakcije vezano je za rezultate istraživanja fotosinteze sredinom XX veka, a eksperimentalno otkriće učešća dva pigmentna sistema koji funkcionišu po tzv. „Z-šemi“ (engl. zig-zag) pripisuje se istraživaču Robertu Emersonu (engl. Robert Emerson), 1957. godine. Linearni fotosintetički transport elektrona po Z-šemi definisan od strane naučnika Robina Hila (eng. Robin Hill) i Fai Bendala (engl. Fai Bendall) 1960. godine, kao i nezavisno od njih Luis Dajsen (engl. Louis-a Duysens), 1961. godine je i danas naučno opšteprihvaćen. Od tada su se mnogi naučnici bavili istraživanjima u vezi sa svetlosnom fazom fotosinteze i transportom elektrona, što je dovelo do niza značajnih otkrića u domenu molekularne organizacije fotosintetičkih jedinica i njihove specifične uloge u konverziji svetlosne energije u električnu (tok elektrona kroz membranu tilakoida) i potom u hemijsku energiju makroenergetskih jedinjenja ATP i NADPH. Nemački naučnici Johan Dajsenhofen, Robert Huber i Mihel Harmut (nem. Johann Deisenhofer, Robert Huber i Hartmut Michel) su definisali 3D-strukturu fotosintetičkih reakcionih centara (u fotosintetičkim bakterijama), za šta su 1988. godine dobili Nobelovu nagradu za hemiju.

1.5.1.2.1. Linearni transport elektrona – Z šema

Fotosintetički transport elektrona nasuprot elektrohemijskom (termodinamičkom) gradijentu kroz tilakoidne membrane hloroplasta je proces indukovani (energizovan) apsorpcijom fotona od strane hlorofila a u reakcionim centrima fotosistema (RC FS I – P_{700} i RC FS II – P_{680}) (**Sl. 1.26**; **Sl. 1.27**). Istovremeno generisanje hemiosmotskog – protonskog gradijenta (između lumena tilakoida i strome hloroplasta) omogućava prevođenje svetlosne energije u hemijsku energiju ATP i NADPH.



Sl. 1.27. „Z“ - šema transporta elektrona u svetlosnoj (svetloj) fazi fotosinteze. Redoks-prenosioci elektrona su pozicionirani prema energiji, odnosno, prema njihovom srednjem redoks potencijalu (pri pH 7)

- ① Apsorpcija fotona od strane P_{680} dovodi do njegove ekscitacije -- prelaska π -elektrona na viši energetski nivo (P_{680}^*) – ovaj prelazak elektrona se dešava nasuprot termodinamičkom gradijentu (redoks potencijalu): od $\approx +1,2$ eV do $\approx -0,6$ eV; apsorpcija fotona od strane P_{700} dovodi do njegove ekscitacije P_{700}^* – nasuprot termodinamičkom gradijentu (redoks potencijalu): od $\approx +0,4$ eV do $\approx -1,2$ eV;

[Elektron nosi negativno naelektrisanje te stoga spontano prelazi na akceptora koji je pozitivniji, to je prelaz duž gradijenta redoks potencijala; kada elektron uz dodatak energije prelazi na negativniju poziciju, to je prelaz nasuprot termodinamičkom gradijentu, odnosno, nasuprot gradijenta redoks potencijala]

P_{680}^* i P_{700}^* predaju elektrone primarnim akceptorima: Feo (Feofitin) u FS II i A_0 u FS I, a sami ostaju oksidovani (imaju manjak elektrona);

② P_{680} koji je oksidovan svetlošću i izgubio elektrone (katjon P_{680}^+), ponovo se redukuje (stabilize svoje naelektrisanje) primanjem elektrona (poreklom od H_2O) sa proteinskog kompleksa za oslobađanje O_2 i glavnog medijatora, amino-kiseline tirozina (Y_z);

③ Elektroni se kreću duž gradijenta redoks potencijala (od negativnijeg ka pozitivnijem) preko prenosioaca: Q_A (Hinon A), Q_B (Hinon B ili Plastohinon – PQ), Plastohinol (Q_BH_2/PQH_2);

④ Citohrom b_6f kompleks (Cit b_6f) prenosi elektrone do rastvorljivog proteina, plastocijanina (PC), koji re-redukuje oksidovani P_{700} (katjon P_{700}^+) nakon apsorpcije fotona i predaje elektrona primarnom akceptoru A_0 u FS I;

⑤ Elektroni se kreću duž gradijenta redoks potencijala (od negativnijeg ka pozitivnijem) od primarnog akceptora A_0 (hlorofil), preko prenosioaca: A_1 (hinon), serije Fe-S proteina (FeS_x , FeS_y , FeS_z) vezanih u lipidni dvosloj tilakoida do rastvorljivog proteina, feredoksina (Fd);

⑥ Rastvorljivi flavoprotein-enzim feredoksin-NADP⁺reduktaza (FNR) redukuje NADP⁺ do NADPH, neophodnog za redukciju CO_2 u Calvinovom ciklusu i sintezu šećera (Tamna faza fotosinteze);

⑦ Ciklični transport elektrona uključuje samo PS I sa prenosiocima (A_0 , A_1 , FeS_x , FeS_y , FeS_z , Fd), PQ i Cit b_6f kompleks.

Fundamentalni regulatorni proces svetlosne faze fotosinteze je transport eksitiranih π -elektrona (prvog singlet stanja) iz specijalnih molekula hlorofila a (u reakcionim centrima dva fotosistema – P_{680} i P_{700}) kroz dve vektorski spregnute reakcije koje uključuju niz prenosilaca elektrona i protona ugrađenih u tilakoidne membrane. Na taj način, svetlosna energija ulazi u živi sistem, preobraća se i obezbeđuje hemijski rad (energiju koja se prenosi hemijskim reakcijama i sadržana je u konačnim produktima: ATP i NADPH).

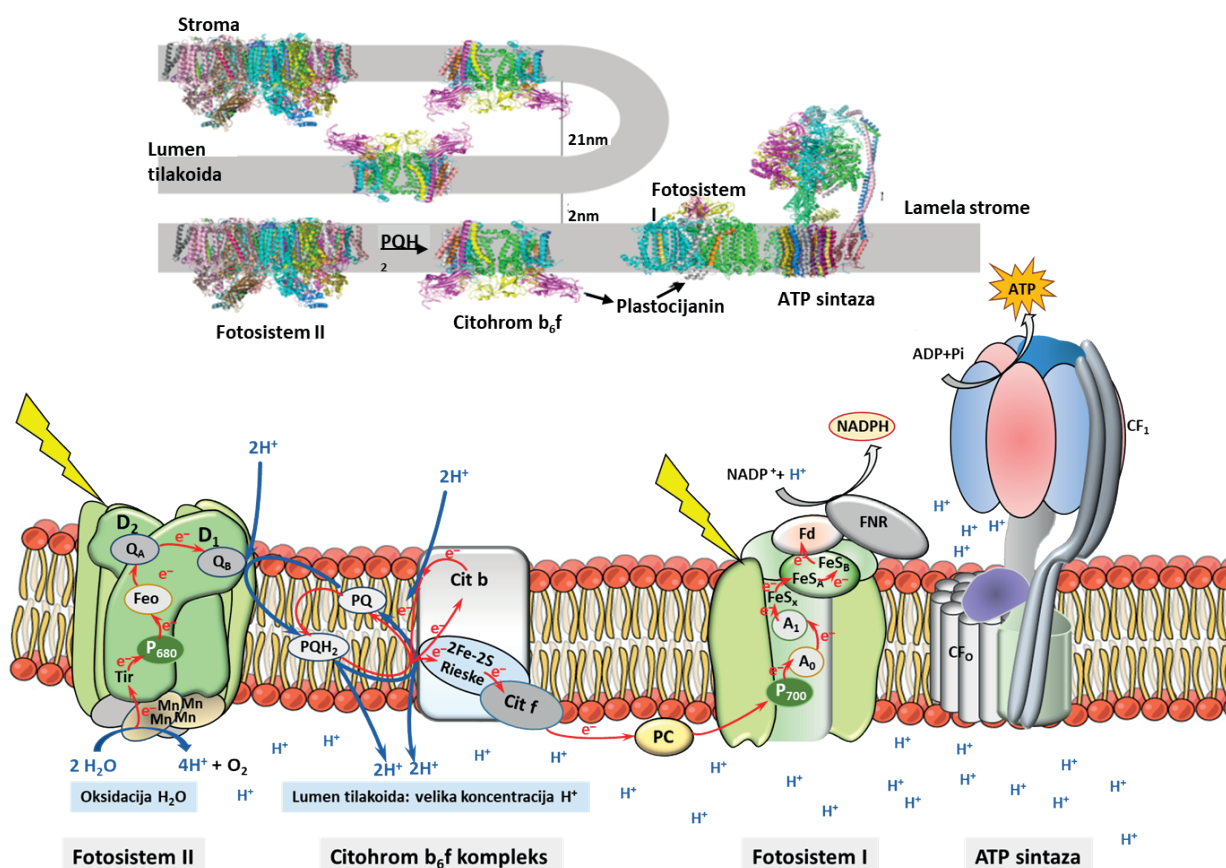
Membranski kompleksi funkcionišu kao enzimi (protonske i elektronske pumpe) i imaju specifičan položaj u tilakoidnoj membrani u zavisnosti od svog elektrohemijskog, odnosno, redoks potencijala, koji se izražava u elektron-voltima (eV). Redoks potencijal pojedinačnih komponenata određuje njihovu ulogu (poziciju) u elektronskom transportu: oksidativnu (primaju elektron od donora, istovremeno ga oksiduju, a sami se redukuju), odnosno redukcionu (predaju elektron akceptoru, istovremeno ga redukuju, a sami se oksiduju). Zbog toga se kretanje elektrona odvija duž gradijenta elektrohemijskog (redukcionog) potencijala, od FS II, preko Cyt b_6f kompleksa do FS I, što je *linarni transport elektrona (po Z-šemi)* i predstavlja najvažniji put iskorišćavanja svetlosne energije za hemijski rad. Četiri integralna membranska proteinska kompleksa neophodna za iskorišćavanje svetlosne energije za linearni transport elektrona u svetlosnoj fazi fotosinteze, su (poređani prema elektrohemijskom potencijalu):

- **Fotosistem II (PS II), sa enzimskim kompleksom za oksidaciju H_2O :** P_{680} , Feofitin (Feo, ili engl. Pheo), Hion A (Q_A), Hion B (Q_B , ili Plastohinon (PQ)) (EC 1.10.3.9),
- **Citohrom b_6f kompleks (Cyt b_6f)** = enzim Plastohinol-plastocijanin reduktaza (EC 1.10.9.1),
- **Fotosistem I (PS I), sa enzimskim kompleksom za sintezu NADPH:** P_{700} , A_0 , A_1 , serija Fe-S proteina (FeS_x , FeS_A , FeS_B), feredoksin (Fd) (EC 1.97.1.12) i
- ATP sintetaza (CF_0CF_1)

Uz ova glavna četiri membranska kompleksa, za funkcionisanje svetlosne faze fotosinteze, neophodni su i pokretni prenosiooci elektrona i protona: Plastohinol (Q_BH_2 , ili PQH_2) i Plastocijanin (PC) (**Tabela 1.3.; Sl. 1.28**).

Tabela. 1.3. Neke od najznačajnijih razlika između PS I i PS II

	PS I	PS II
Dominantni položaj:	Tilakoidi strome	Tilakoidi grana – prema lumenu
U reakcionom centru je:	P_{700} ($A_{max} = 700$ nm)	P_{680} ($A_{max} = 680$ nm)
Struktura RC:	Hlorofil a – dva molekula (dimer)	Hlorofil a – klaster od četiri molekula
Prenosioci elektrona –kofaktori u RC:	A_0 , A_1 , F_x , F_A i F_B	Feofitin, Hion $_A$, Hion $_B$, Plastohinon
Terminalni akceptor elektrona:	Feredoksin (Fd)	Citohrom b_6f
Glavni proteini RC:	PsaA i PsaB	D1 i D2; CP43 i CP47
Transport elektrona:	Neciklični i Ciklični	Neciklični
Antena kompleks:	LHC I (bogatiji hlorofilom a)	LHC II (bogatiji hlorofilom b)
Fotoliza H_2O / Oslobođanje O_2	Ne dešava se	Dešava se



Sl. 1.28. Transport elektrona i protona kroz tilakoidne membrane je vektorski (Z-šema) i ostvaren je aktivnošću četiri (glavna) proteinska kompleksa: Fotosistem II (sa enzimskim kompleksom za oksidaciju H_2O), Citohrom b_6f , Fotosistem I (sa enzimskim kompleksom za sintezu NADPH) i ATP sintaza. Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 101.

Objašnjenje slike: Nakon što fotoni pobuđuju specijalizovane molekule hlorofila a (reakcione centre oba fotosistema, P_{680} i P_{700}), njihovi elektroni se izbacuju van molekula i generišu elektronski transport preko niza prenosioca od vode do NADP $^+$, prema jednačini:



Za nastanak jednog molekula O_2 , potrebno je ukupno, 4 elektrona iz 2 molekula H_2O za redukciju 2 molekula NADP $^+$ i nastanak 2 molekula NADPH. Ovaj proces zahteva kumulativno dejstvo 8 fotona (4 apsorbovana fotona od strane svakog fotosistema).

U strukturi fotosintetičkog aparata, osim dve fotosintetičke jedinice (PS I i PS II), za odvijanje svetlosne faze fotosinteze, neophodni su i Citohrom b_6f kompleks (Cit b_6f / engl. Cyt b_6f) i ATP sintaza (ATPsin / engl. ATPsyn).

Linearni transport elektrona (Z-šema) biće detaljnije objašnjen kroz strukturno-molekulsku organizaciju i funkciju svakog od četiri gore navedena integralna membranska proteinska kompleksa.

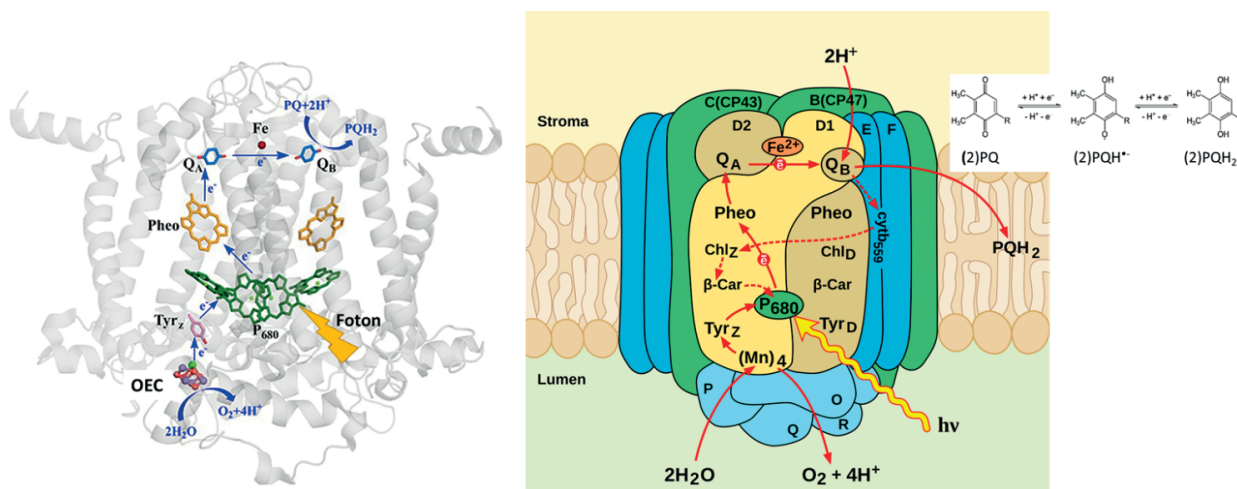
1.5.1.2.1.1. Fotosistem II: Struktura-molekularna organizacija i transport elektrona kroz PS II

Fotosistem II je integralni membranski proteinski kompleks koji sadrži oko 25 proteinskih subjedinica sa pigmentima i kofaktorima neophodnim za odvijanje inicijalnih reakcija fotosinteze i oslobađanje kiseonika. Proteini PS II se sintetišu ekspresijom gena hloroplastnog i jedarnog genoma. Dominantno je PS II lociran u tilakoidima grana – prema lumenu tilakoida, a u njemu se nalaze reakcioni centar (RC) sa fotohemijjski ak-

tivnim molekulima hlorofila a i kofaktorima elektron-transportnog sistema (**Sl. 1.29**). Osnovne komponente strukturno-molekulske organizacije PS II su:

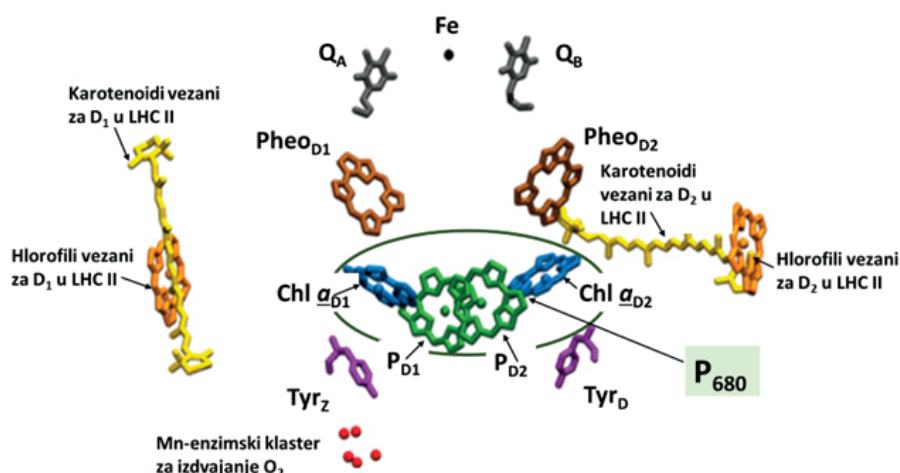
- Reakcioni centar fotosistema II (RC PS II) i
- „Antena“ sistem za prikupljanje energije ekscitacije (LHC II).

Reakcioni centar PS II (RC PS II) čine dve glavne polipeptidne (proteinske) subjedinice, D1 i D2 sa subjedinicama CP 43 i CP 47 koje ih okružuju i za koje je vezan je *hlorofilni centar* označen kao P_{680} ($A_{\max} \lambda=680\text{nm}$). Reakcioni centar P_{680} ima funkciju primarnog elektronskog donora u transportu elektrona kroz membranu jer nakon apsorpcije fotona predaje svoje pobuđene elektrona primarnom elektronskom akceptoru (feofitinu – Pheo), koji je po hemijskom sastavu molekul hlorofila a , gde je Mg^{2+} u centru porfirinskog prstena zamenjen sa 2H^+ (**Sl. 1.29**).



Sl. 1.29. Struktura i molekulska organizacija RC PS II: P_{680} (4 molekula hlorofila- P_{D1} , P_{D2} , Chl_{D1} i Chl_{D2}), tirozin (Tyr_z , Tyr_D), feofitin (Pheo_{D1} , Pheo_{D2}), hinon A (Q_A), hinon B (Q_B), plastohinon (PQ); Transport elektrona u PS II; Redukcija plastohinona (PQ) preko plastosemihinona ($\text{PQH}^{\bullet-}$) do plastohinola (PQH_2) u PS II: nakon fotoaktivacije PS II, PQ prvo gubi jedan e^- i jedan proton (H^+), postaje plastosemihinon ($\text{PQH}^{\bullet-}$), a zatim nakon još jednog koraka u redukciji, postaje dvostruko redukovan ($+2e^-$) jon, uzima dva protona iz strome hloroplasta (poreklom od H_2O) i postaje plastohinol (PQH_2). Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 101.

Hlorofilni centar P_{680} je glavni deo RC PS II lociran u proteinskim subjedinicama D1 i D2. Čini ga klaster od četiri molekula hlorofila a labavo povezanih van der Valsovim (hol. Van der Waals) vezama. Iako se u literaturi može naći da hlorofilni deo RC PS II predstavlja „specijalni par hlorofila a “, novija istraživanja upućuju na to da je P_{680} komponovan od četiri molekula hlorofila a (najčešće označenih kao: P_{D1} , P_{D2} , Chl_{D1} i Chl_{D2}) simetrično vezanih za D1 i D2, a koji *jedinstveno funkcionišu, kao da je u pitanju jedan molekul* (**Sl. 1.30**).



Sl. 1.30. RC PS II: P₆₈₀ je hlorofilni centar koga čini klaster od četiri molekula hlorofila *a* (PD1, PD2, ChlD1 i ChlD2) labavo povezanih van der Valsovim vezama. Adaptirano prema Hoang H. Nguyen i sar. (2023) Elektronski izvori slika, str. 101.

U RC PS II ulaze osim P₆₈₀ i:

- **Gvožđe-hinonski kompleks** koji sadrži **Hinon A (Q_A)** vezan za D₂ protein, i **Hinon B (Q_B, ili Plastohinon – PQ)** vezan za D₁ protein. Hinoni su međusobno odvojeni ne-hemski vezanim gvožđem za aminokiselinske ostatke proteina, preko koga je omogućen transport elektrona od Q_A do Q_B. Ovaj kompleks je odgovoran za transport elektrona od Feofitina do Q_B (PQ) i redukciju Q_B (PQ) koji prenosi elektrone na sledeći u nizu elektron-transportni kompleks (Citohrom b₆f kompleks),
- **Dve proteinske subjedinice CP 43 i CP 47** (CP, engl. Chlorophyll Protein) okružuju D1 i D2 i čine osnovne proteine za vezivanje antena pigmenata (LHC II) i
- **Citohrom b-559 (Cyt-b559)** je deo PS II, nije neposredno uključen u elektron-transportni lanac, već je njegova uloga, uz karotenoide (β-karoten) u zaštiti PS II od foto-indukovane destrukcije (**Sl. 1.28**).

Transport elektrona (oksidoredukcione reakcije) u PS II:

Prva reakcija u prevodenju apsorbirane svetlosne energije u energiju pobuđenih elektrona hlorofila *a* (P₆₈₀), je njihov transfer i prihvatanje od strane primarnog akceptora, Feofitina (Pheo), što predstavlja **primarni fotohemijski rad (akt)**. Na taj način se **energija fotona ugradila u živi sistem i konvertovala u elektro-hemijski potencijal, odnosno, redoks-energiju**.

Generalno posmatrano: PS II katališe fotolizu/oksidaciju H₂O, proizvodeći O₂, oslobađajući elektrone u fotosintetički-elektronski transport (PET, engl. Photosynthetic Electron Transport) i „pumpajući“ H⁺ u lumen tilakoida. Stoga reakcije na nivou PS II obezbeđuju H⁺ za sintezu NADPH i doprinose stvaranju potencijalne razlike (napona) između lumena tilakoida i strome hloroplasta, što je neophodno za sintezu ATP-a.

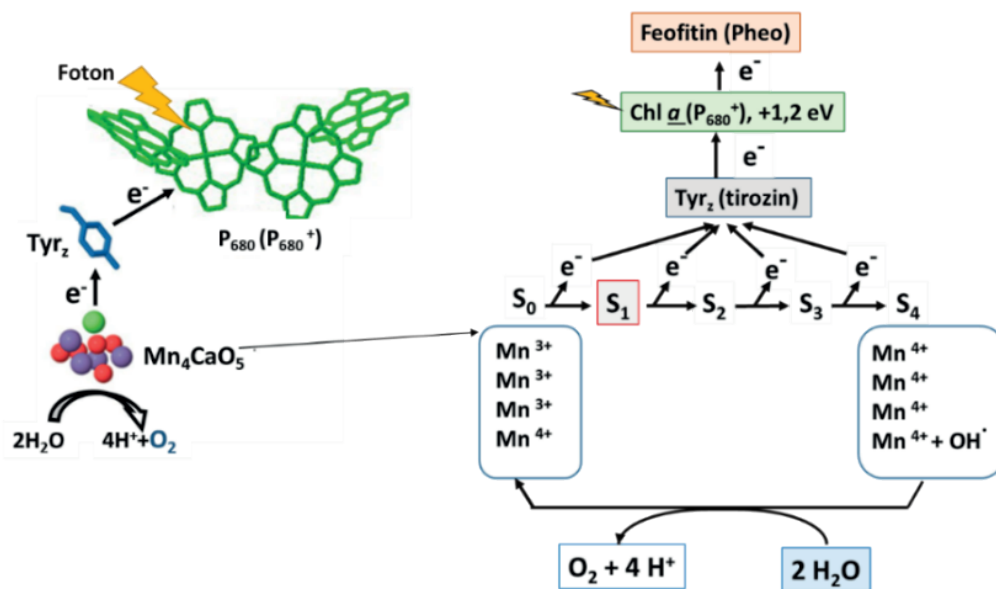
Redukovani produkt reakcija u fotosistemu II je plastohinol (Q_BH₂, ili PQH₂).

Gubitak elektrona iz P₆₈₀ nakon apsorpcije fotona rezultira stvaranjem katjonskog radikala P₆₈₀^{•+} (P₆₈₀⁺⁺). Pobuđeni elektron, poreklom od P₆₈₀ se brzo prenosi sa feofitina na čvrsto vezani hinon A (Q_A), a zatim na hinon B (Q_B) koji je labavo vezan za D1 protein i naziva se još i plastohinon (PQ). Ovaj prenos elektrona je potpomognut prisustvom ne-hemski vezanog gvožđa koje se nalazi između njih (**Sl. 1.28; Sl. 1.29**). Kada se Q_B potpuno redukuje (protonizuje) u plastohinol (Q_BH₂ ili PQH₂), difunduje sa mesta vezivanja za D1 u lipidni matiks tilakoidne membrane i postaje pokretni prenosilac elektrona od PSII do Cyt b₆f.

Oksidacija vode i nastanak kiseonika se dešavaju na nivou PS II proteinskog kompleksa za izdvajanje O_2 (OEC, engl. Oxygen Evolving Complex) u procesu FOTOAKTIVACIJE.

Nakon apsorpcije fotona ($\lambda=680\text{nm}$) nastaje pobuđeni P_{680}^* (četiri pobuđena elektrona u grupi (klasteru) od četiri hlorofila a). Stoga, P_{680}^* funkcioniše kao donor elektrona, jer predaje elektrone primarnom akceptoru, feofitinu (Pheo), a sam se oksiduje u katjon P_{680}^+ (katjonski radikal P_{680}^{++}) koji tako postaje snažan oksidant visokog pozitivnog potencijala (približno $+1,2\text{ eV}$ ($+1,12\text{ eV}$; $+1,17$), neophodnog za privlačenje elektrona iz molekula H_2O . Prema najnovijim istraživanjima, smatra se da se zasićenje P_{680}^{++} elektronima iz vode dešava na jednom hlorofilu a iz hlorofilnog klastera, a to je P_{D1} i da se procesi prenosa elektrona dešavaju najvećim delom na D1- strani proteina (Sl. 1.29; Sl. 1.30).

Tok elektrona od H_2O do P_{680}^{++} ostvaren je preko *enzimskog kompleksa za oksidaciju H_2O (WOC, engl. Water-oxidizing complex), koji se još naziva i kompleks za izdvajanje O_2 (OEC, engl. Oxygen-evolving complex).* Ovaj kompleks je sastavni deo PS II, koji izdvajajući sukcesivno elektrone i protone iz H_2O prolazi kroz četiri oksidujuća stanja. Akumulacija četiri oksidujuća potencijala obezbeđuje fotolizu (oksidaciju) vode i izdvajanje O_2 . Kompleks za izdvajanje O_2 predstavlja metalo-enzim sa klasterom od četiri jona Mn (Mn_4) i Ca^{2+} , empirijske formule Mn_4CaO_5 (u energetskom/redoks stanju S_1). Mangan je ključni deo kompleksa koji vezuje molekule H_2O i prenosi elektrone iz molekula H_2O menjajući svoja oksidaciona stanja: Mn^{2+} , Mn^{3+} i Mn^{4+} (Mn^{5+}). Kalcijum je isključivo prisutan u jonskom obliku Ca^{2+} , tako da nema ulogu u prenosu elektrona. Smatra se takođe, da i joni Cl^- imaju određenu ulogu u kompleksu. Ova grupa metalnih jona povezana je (koordinisana) sa proteinskim subjedinicama D1 i CP43 u PS II, a za protok elektrona od H_2O do P_{680}^+ , najvažnija je veza Mn-jona sa redoks-aktivnim tirozinom (Tyr_z , hemijski: 4-hidroksifenilalanin), koja ulazi u sastav polipeptidnog lanca D1-proteina (Sl. 1.31).

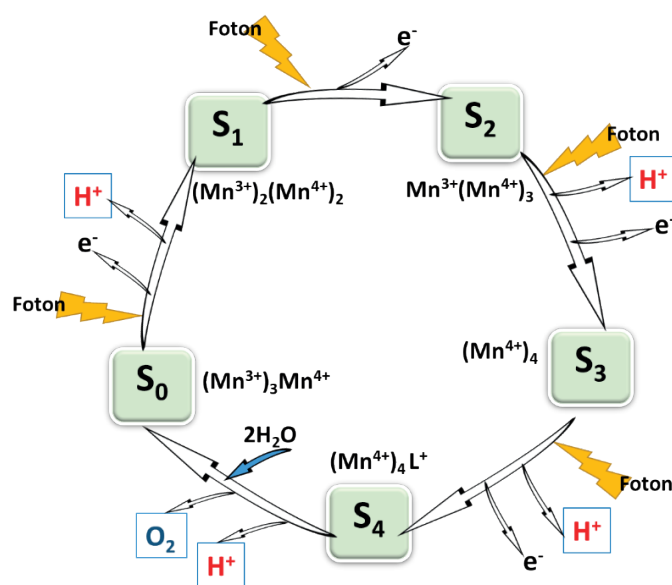


Sl. 1.31. Kompleks za oksidaciju H_2O tj. fotosintetičko izdvajanje O_2 (WOC, engl. water-oxidizing complex), OEC, (engl. Oxygen -Evolving Complex), Transport elektrona od vode, preko Mn_4CaO_5 klastera i redoks-aktivne amino-kiseline tirozina (Tyr_z) do P_{680}^+ (P_{680}^{++}).

Kompleks za izdvajanje O_2 se oksiduje u seriji oksidacionih reakcija u isto vreme kada se dešava apsorpcija fotona od strane P_{680} i njegova ekscitacija. Četiri fotona neophodna su za njegovu ekscitaciju i otpuštanje elektrona u elektron-transportni lanac. Redukcija nastalog P_{680}^+ nakon ekscitacije dešava se elektronima poreklom od H_2O , prema jednačini: $2H_2O \longrightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$, stoga je **nastali O_2 u procesu fotosinteze, poreklom od H_2O .**

Molekularni mehanizam za oksidaciju H_2O , tj. fotosintetičko izdvajanje O_2 , zahteva *deponovanje oksidacionog potencijala u kompleksu za izdvajanje O_2* , što je rezultat sukcesivnog prenošenja četiri elektrona iz vode, preko Mn_4 -klastera i tirozina do P_{680}^+ . Redoks-aktivni tirozin (Tyr_z 161- tirozinski amino-kiselinski ostatak D1 polipeptida), je neposredni donor elektrona za P_{680}^+ . Iako mehanizam oksidacije vode nije u potpunosti razjašnjen, njegove glavne karakteristike su otkrivene.

Prema modelu koji je 1970. godine predložio *Besel Kok* (videti referencu, Kok i sar., 1970.), kompleks za oksidaciju vode može postojati u pet energetskih (oksidacionih/ redoks) stanja: od S_0 do S_4 , pri čemu je S_0 najmanje, dok je S_4 najviše oksidovano stanje kompleksa (**Sl. 1.32**). Fotoni koje apsorbira P_{680} pomeraju sistem za izdvajanje O_2 kroz četiri stepena, od stanja S_0 do S_4 .



Sl. 1.32. Kompleks za oksidaciju H_2O /fotosintetičko izdvajanje O_2 ; Kokov ciklus: deponovanje oksidacionog potencijala je rezultat sukcesivnog prenošenja četiri elektrona iz vode, preko Mn_4 -jonskog klastera i tirozina (Tyr_z) do P_{680}^+ i stvaranja četiri oksidaciona stanja (od S_0 do S_4).

Prelaz kompleksa za izdvajanje O_2 iz energetskog stanja S_0 u stanje S_1 izazvano je oksidacijom Mn^{2+} u Mn^{3+} i gubitkom jednog elektrona koji redukuje P_{680}^+ . Prelaz kompleksa iz stanja S_1 u S_2 ostvaren je još jednom redoks reakcijom: Mn^{3+} se oksiduje u Mn^{4+} , a izgubljeni elektron takođe ide u P_{680}^+ . Prelaz kompleksa iz redoks-stanja S_2 u S_3 odvija se preko još jedne redoks reakcije, ali se elektron prenosi preko tirozinskog radikla (Tyr_z^+) koji je prethodno predao svoj elektron na P_{680}^+ . Između stanja S_3 i S_4 dolazi do disocijacije nastalog liganda u kompleksu (sa nepoznatom bazom) i konačno, prelaz kompleksa iz stanja S_4 u stanje S_0 ostvaren je razmenom liganda i oslobađanjem O_2 . Energetsko stanje S_4 je nestabilno i da bi se kompleks vratio u najniže energetsko stanje, S_0 , vezuju se novi molekuli H_2O , čime započinje novi ciklus.

Kiseonični mostovi u Mn_4 -klasteru kompleksa potiču od molekula vode vezanih za metalne jone. Neposredna blizina dva atoma kiseonika supstrata je neophodna za formiranje O-O veze kod prelaza S_3 u S_4 i potom, u S_0 redoks stanje. Mora se istaći da dinamika promene oksidacionih stanja (valenci) Mn-jona (i Tyr_z^+) nije u potpunosti razjašnjena, posebno kada je u pitanju S_4 oksidaciono stanje kompleksa, ali se prema rezultatima najvećeg broja eksperimentalnih istraživanja predstavlja kao na **Sl. 1.31** i **Sl. 1.32**.

Ceo ovaj proces se dešava brzinom svetlosti, svetlošću je koordinisan i naziva se **fotoaktivacija**. Konačni rezultat je da nastaje molekulski kiseonik (O_2) i joni vodonika (H^+), te su otuda sinonimi za ovaj proces i: fotoliza H_2O , oksidacija H_2O ili fotosintetičko oslobađanje O_2 . Joni H^+ odlaze u lumen tilakoida i doprinose generi-

sanju trans-membranskog (tilakoidnog) potencijala. Da podsetimo, lumen tilakoida je pozitivniji u odnosu na stromu hloroplasta.

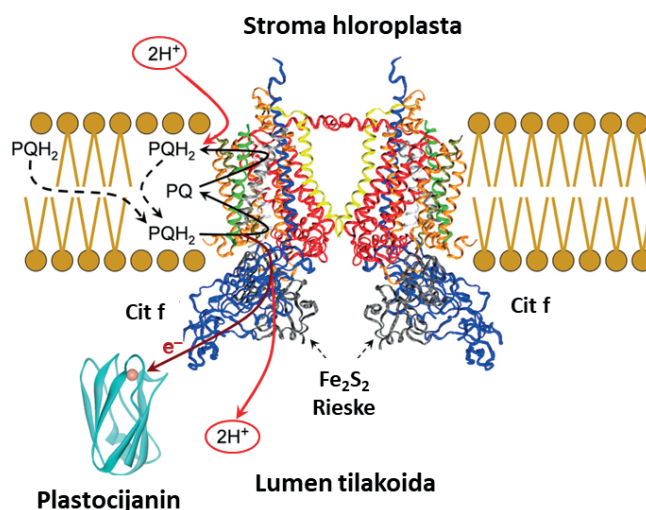
Iz svega navedenog, može se zaključiti da PSII predstavlja: *voda-plastohinon oksidoreduktazu*, enzim (EC 1.10.3.9) čija je aktivnost indukovana svetlošću i koji katališe izdvajanje elektrona iz vode, te njihovo usmeravanje u fotosintetički elektronski transport. Istovremeno, oslobađa se O_2 kao „sporedni proizvod“ celog procesa koji se naziva i fotolize H_2O .

1.5.1.2.1.2. Citohrom b_6f : Struktura, molekularna organizacija i transport elektrona

Kompleks citohrom b_6f (Cyt b_6f) zauzima centralno mesto u fotosintetičkom linearnom transportu elektrona i protoku protona kroz tilakoidnu membranu i njihovom nakupljanju u lumenu tilakoida. Svoju važnu ulogu u fotosintezi ostvaruje elektrohemijским povezivanjem PS II i PS I. To je multi- proteinski kompleks, dinamične strukture, sa nekoliko prostetičnih grupa, te se zbog svoje enzimske funkcije u fotofosforilaciji, može nazvati: *plastohinol-plastocianin reduktaza* (engl. plastoquinol-plastocyanin reductase, EC 7.1.1.6) (**Sl. 1.28 i 1.33**). Cit b_6f je funkcionalni *dimer*, a obe monomerne jedinice sačinjene su od četiri (glavne) subjedinice, koje sačinjavaju:

- citohrom b_6 (Cyt b_6 , sa b-tipom hema koji nije kovalentno vezan za protein),
- citohrom f (Cyt f , sa c-tipom hema koji je kovalentno vezan za protein, nekoliko citohroma c (Cyt c),
- Rieske gvožđe-sumpor proteinski klaster sa $[2Fe-2S]$ -prostetičnom grupom i
- subjedinica IV (subIV) u čijem su sastavu transmembranski proteini koji periferno okružuju centralni deo Cit b_6f kompleksa.

U sastav Cyt b_6f osim ove četiri glavne subjedinice, ulazi još nekoliko manjih proteinskih subjedinica (**Sl. 1.33**). Cit b_6f je od esencijalnog značaja za transmembranski signaling u hinonskom (Q) ciklusu pošto katališe redukciju/ protonizaciju hinona B (Q_B) odnosno, plastohinona (PQ), njegovo dvostepeno vezivanje sa protonima, nastanak plastohinola (PQH_2) i njegovu deprotonizaciju /oksidaciju (izbacivanje H^+ u lumen tilakoida) (**Sl. 1.34**). O funkciji i mehanizmu transporta elektrona i protona kroz Cyt b_6f kompleks biće reči kasnije.



Sl. 1.33. Strukturna i molekularna organizacija Citohrom b_6f kompleksa. (Elektronski izvori slika, str. 101).

Transport elektrona i protona u Cit b_6f kompleksu. Hinonski (Q) ciklus

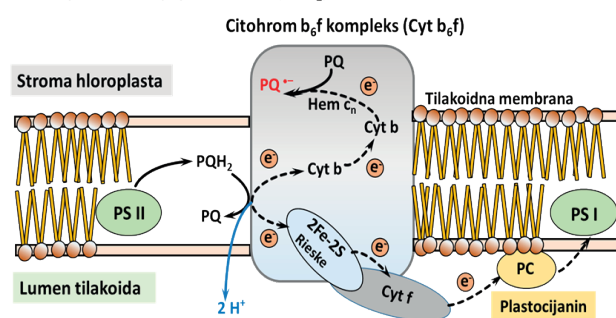
Kompleks Cit b_6f preko lipofilnog pokretnog prenosioca plastohinola (PQH_2) posreduje u prenosu elektro-

na između dva fotosintetička sistema (PS II i PS I) uz istovremeno dvostepeno prenošenje protona iz strome hloroplasta u lumen tilakoida uspostavljajući na taj način elektrohemijski gradijent koji će biti iskorišten za funkcionisanje ATP- sintaze i stvaranje ATP. Protonski tok preko Cyt b_6f iz strome u lumen tilakoida određuje povratno, brzinu elektronskog fluksa kroz membranu od PS II prema PS I i sintezu ATP-a. Stoga se može reći da Cyt b_6f zauzima elektrohemijski, centralno mesto u linearnom elektron-transportnom lancu.

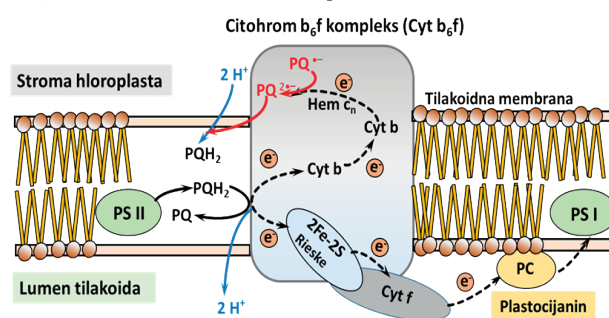
Put elektrona i protona kroz Cyt b_6f određen je tzv. hinonskim ciklusom (Q-ciklus) koji je prvi opisao Piter Mičel (engl. Peter Mitchell) 1975. godine (videti referencu). Savremena istraživanja rezultirala su delimičnim izmenama u tumačenju oksido-redukcionih procesa u kompleksu Cyt b_6f (kao i u kompleksu bc_1 u unutrašnjoj membrani mitohondrija) u Q-ciklusu, tako da se danas, sa sigurnošću zna da je proces oksidacije plastohinola (PQH_2) ostvaren preko razdvajanje puta elektrona na dve grane, kroz postojanje dve polu-reakcije na dve strane kompleksa:

1. Prvi stepen oksidacije je linearni (neciklični) proces, kada se PQH_2 nastao u PSII oksiduje (na strani kompleksa prema lumenu tilakoida), tako što odaje svoja dva elektrona, jedan Rieske Fe-S proteinu, a drugi elektron prihvata jedan od citohroma b (Cyt b). Istovremeno se dva protona ($2 H^+$) „ubacuju“ u lumen tilakoida (**Sl. 1.34A**). Elektron koji je prihvaćen od strane Rieske Fe-S proteina ide na Cyt f i zatim, na plastocijanin (PC), odakle prelazi na PS I i redukuje P_{700} . Redukovani Cyt b transportuje primljeni elektron na drugi Cyt b, odakle se elektron dalje prenosi preko nekoliko drugih kofaktora sa hemom c-tipa (hem c_n) do plastohinona (PQ) redukujući ga na stromalnoj strani kompleksa do plastosemihinona (PQH^+);
2. Drugi stepen oksidacije je ciklični proces u kome se drugi molekul PQH_2 oksidiše dajući jedan elektron u neciklični put prema Rieske Fe-S proteina, Cyt f i PC do PSI, dok drugi elektron ponovo ide preko dva Cyt b i nekoliko drugih kofaktora sa hemom c-tipa (hem c_n) do plastosemihinona (PQH^+), pri čemu nastaje PQH^{2+} sa dva elektrona viška, zbog čega lako privlači i uzima dva protona iz strome hloroplasta, tako da nastaje PQH_2 koji ponovo ulazi u ciklus (**Sl. 1.34B**).

A. Prvi stepen oksidacije plastohinola (PQH_2)



B. Drugi stepen oksidacije plastohinola (PQH_2) – Ciklični proces



Sl. 1.34. Q-ciklus: Proces oksidacije plastohinola (PQH_2) ostvaren je preko razdvajanja puta elektrona na dve grane i postojanja dve polu-reakcije (procesa transporta elektrona) na dve strane kompleksa: linearni proces – prema lumenu (A) i ciklični proces na stromalnoj strani Cyt b_6f kompleksa (B).

Rezultat ovakvog, dvostepenog procesa je da se na nivou Cyt b_6f kompleksa **četiri protona transportuju kroz membranu iz strome u lumen tilakoida za svaka dva elektrona**. Stoga Cyt b_6f predstavlja enzim: plastohinol-plastocijanin oksidoreduktazu (EC 7.1.1.6), od esencijalnog značaja za generisanje transtilakoidnog elektrohemijskog gradijenta (napona, eV) – protonske pokretačke sile (pmf, engl. proton motive force) za sintezu ATP.

1.5.1.2.1.3. Fotosistem I (PS I): Struktura-molekularna organizacija i transport elektrona

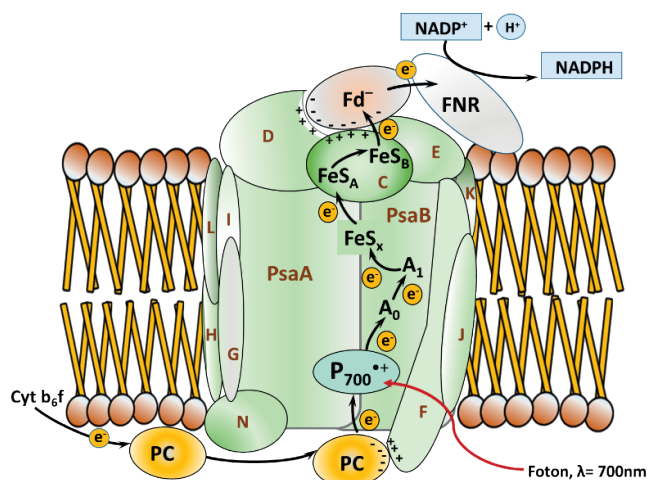
Kompleks PS I je dominantno raspoređen u tilakoidima strome i u rubnim delovima tilakoida grana, prema stromi hloroplasta. To je multimolekulski intermembranski kompleks koji sadrži oko 15 proteinskih subje-

dinica (po nekim podacima, više biljke sadrže 13) i primarno je organizovan kao heterodimer sa dve glavne polipeptidne jedinice: **PsaA i PsaB** koje vezuju reakcioni centar (RC PS I). Reakcioni centar RS PS I je fotohemijski aktivan hlorofil *a*-dimer (specijalni par molekula hlorofila *a*), definisan kao P_{700} ($A_{\max} \lambda = 700\text{nm}$), zatim, primarni elektronski akceptor A_0 (molekul hlorofila *a*), kao i većinu prenosioca elektrona, a to su: **A_1 (filohinon, ili vitamin K_1) i tri [4Fe-4S] enzimska klastera (FeS_x , FeS_A i FeS_B) (Sl. 1.28 i Sl. 1.35)**. Sa terminalnog Fe-S klastera, elektron biva prihvaćen od strane malog regulatornog proteina – **Feredoksina (Fd)**. Postoje dve grane elektronskog transporta kroz lanac kofaktora od A_0 do FeS_x , koje su veoma slične. „Antena“ **pigmentno-proteinski kompleks fotosistema I (LHC I)** je integralni deo PS I, vezan je za dve glavne proteinske subjedinice, PsaA i PsaB i na taj način je u bliskom kontaktu sa komponentama elektronskog transporta kroz reakcioni centar (RC PS I). Proteini PsaA i PsaB se sintetišu ekspresijom gena hloroplastne DNK.

Oksido-redukzione reakcije (transport elektrona) u PS I; redukcija $NADP^+$ i nastanak NADPH

Kompleks PS I je deo linearnog (Z šema) i cikličnog transporta elektrona u svetloj fazi fotosinteze. To je hlorofil-protein kompleks koji funkcioniše kao svetlošću - indukovani enzim: plastocijanin (PC) - feredoxin (Fd) oksidoreduktaza (EC 1.97.1.12). Elektronski transfer od PC ($E \approx +0,370\text{ eV}$) do Fd ($E \approx -0,430\text{ eV}$) – nasuprot elektrohemijском gradijentu (negativni elektroni idu na negativniji akceptor) zahteva apsorpciju energije fotona crvenog dela vidljivog spektra ($A_{\max}$), $\lambda=700\text{nm}$ od strane hlorofila *a* u reakcionom centru (P_{700}). Energija ovih fotona ($E \approx 170\text{ kJ/mol}$) je dovoljna da indukuje primarni fotohemijski rad u PS I: ekscitaciju P_{700} (stvaranje singletnog pobuđenog stanja, P_{700}^*), što dovodi do izbacivanja njegovog elektrona u elektron-transportni lanac, čime P_{700} postaje katjonski radikal (P_{700}^{++}), dovoljnog oksidacionog potencijala ($E \approx +0,400\text{ eV}$) da prihvati elektron od plastocijanina ($E \approx +0,370\text{ eV}$). Ovaj proces transmembranskog razdvajanja naelektrisanja, gde P_{700}^{++} ostaje kao katjon, a elektron se prenosi preko tilakoidne membrane pomoću lanca prenosioca elektrona, je primarni fotohemijski akt (rad) u PS I. Zato, P_{700}^{++} privlači elektrone iz plastocijanina (PC), poreklom od PS II i re-redukuje se njima, stabilizujući na taj način svoj potencijal.

Stoga se PS I smatra i elektronskom pumpom koja prenosi elektrone od pokretnog prenosioca elektrona, plastocijanina (PC) sa lumenalne strane tilakoida do feredoksina (Fd), malog rastvorljivog Fe-S proteina na stromalnoj strani tilakoidnog membranskog sistema (Sl. 1.35). Vezan na stromalnoj strani tilakoidne membrane, nalazi se flavoprotein, feredoksin- $NADP^+$ reduktaza (FNR) Enzim *feredoksin-nikotinamid adenin dinukleotid fosfatna reduktaza*, ili *feredoksin- $NADP^+$ oksidoreduktaza* (EC 1.18.1.2), koji redukuje koenzim $NADP^+$ do NADPH, čime se završava neciklični transport elektrona koji počinje oksidacijom (fotolizom) vode.



Sl. 1.35. Strukturni model PS I i transport elektrona u reakcionom centru. Sinteza NADPH. Komponente transporta elektrona u RC PSI su vezane za dva glavna trans-membranska proteina, PsaA i PsaB. Manje proteinske subjedinice, od PsaC to PsaN, označene su slovima od C do N. Adaptirano prema Taiz i sar., (2018); Elektronski izvori slika, str. 101.

Tok elektrona kroz PS I: Nakon apsorpcije fotona, dolazi do ekscitacije P_{700} (specijalnog para hlorofila a - P_{700}^) koji odavanjem elektrona, postaje katjonski radikal P_{700}^{+} , a njegovi elektroni prvo bivaju prihvaćeni od strane primarnog akceptora, molekula hlorofila (A_0), zatim filohinona (A_1), FeSx, FeSA i FeSB gvožđe-sumpor kofaktora i na kraju, prispeli elektroni redukuju rastvorljivi gvožđe-sumpor protein, feredoxin (Fd) koji potom redukuje $NADP^+$ uz pomoć enzima feredoksin- $NADP^+$ reduktaze (FNR).*

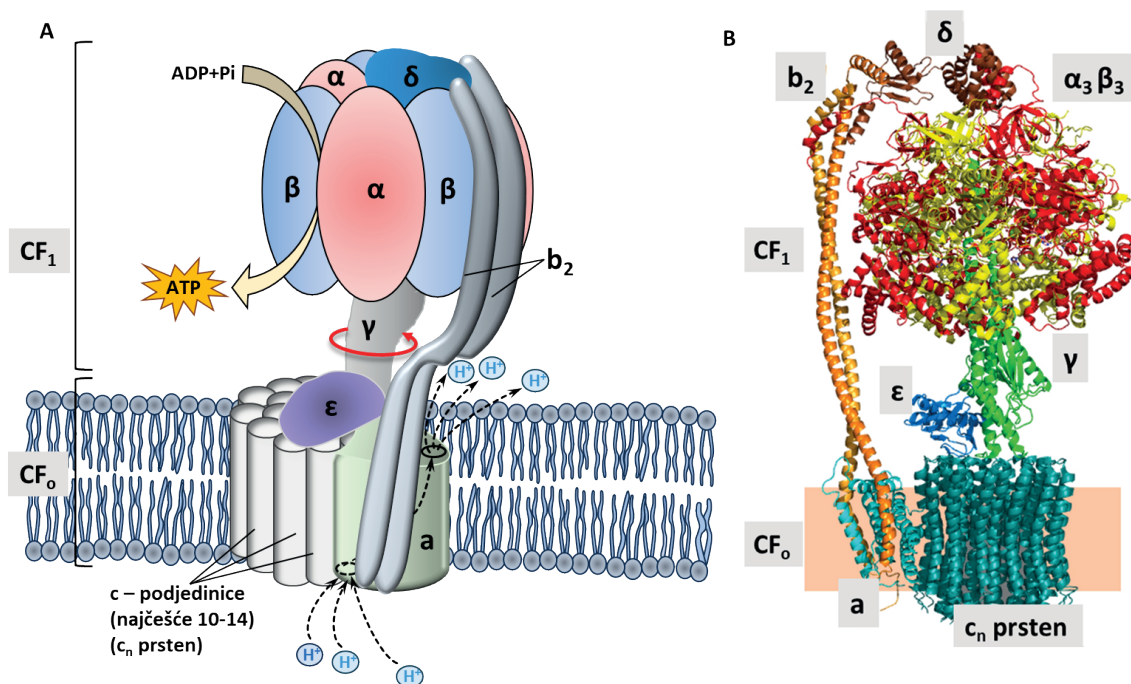
U necikličnom transportu elektrona (Z šema) u svetloj fazi fotosinteze, donor elektrona i protona za sintezu NADPH je H_2O .

1.5.1.2.1.4. Hloroplastna H^+ ATP-sintaza (H^+ ATPsin): struktura, molekularna organizacija i funkcija

Adenozin-trifosfat (ATP) nastao u svetlosnoj fazi fotosinteze, glavni je izvor biološki korisne energije koja obezbeđuje metabolizam svih živih organizama planete. Biljke prevode apsorbovanu svetlosnu energiju u procesu fotosinteze u makroenergetske veze ATP-a pomoću hloroplastne H^+ ATPsin, enzima koji pripada grupi ATP-sintaza F-tipa i najčešće se obeležava kao CF_0 - CF_1 (ili CF_0CF_1).

Proteinski kompleks H^+ ATPsin je lokalizovan u tilakoidima i sastavljen je od 26 proteinskih subjedinica kodiranih ekspresijom gena jedarnog i hloroplastnog genoma, od kojih je 17 u potpunosti ili delimično ugrađeno u membranu. Polipeptidi enzima su organizovani u dve velike subjedinice, to su CF_0 i CF_1 (**Sl. 1.36 A i B**):

- subjedinica CF_0 je integralni deo tilakoidnih membrana, sastavljena od (najverovatnije) četiri polipeptida i sadrži (rotorski) prsten od n c-podjedinica ($n=10-14$), stehiometrije: $a_1b_2c_n$ (ili $a_1b_1b'_1c_n$). Polipeptidi su tako organizovani da formiraju kanal kroz membranu tilakoida za prolaz protona. CF_0 subjedinica enzima je rotirajuća strana enzima;
- subjedinica CF_1 je orijentisana prema stromalnoj strani tilakoida (stromi hloroplasta), sastoji se od pet različitih polipeptida, stehiometrije: $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$, pri čemu tri α i tri β polipeptida alternativno raspoređena, formiraju globulu sa katalitičkom stranom na β polipeptidu (u najvećoj meri). Subjedinica δ na vrhu „glave“ se vezuje za sve tri α subjedinice, dok subjedinica γ predstavlja tzv. „redoks senzor“ sa mogućnošću formiranja disulfidne veze između amino-kiselina čime će se blokirati rotacija CF_0 regiona, smanjiti sinteza ATP i njegovo neekonomično trošenje (hidrolizu) noću. Subjedinica γ takođe ima ulogu, uz subjedinicu ϵ , da prenosi obrtni momenat (rotaciju) sa CF_0 na CF_1 (**Sl. 1.36A i B**).



Sl. 1.36. Struktura i molekularna organizacija hloroplastne H^+ ATP-sintaze. Sintezu ATP-a u hidrofилnoj „glavi“ (CF_1) pokreće CF_0 „rotacioni motor“ u membrani (molekularna organizacija ATP-sintaze (B). Adaptirano prema Vlasov i sar., (2022). Elektronski izvori, str. 101.

Transport protona kroz tilakoidnu membranu i sinteza ATP u hloroplastima – FOTOFOSFORILACIJA

Opšte je prihvaćeno da je proces fotofosforilacije zasnovan na hemiosmotskom mehanizmu koji je prvi put definisan 1960-ih godina od strane britanskog naučnika Petera Mičela (engl. Peter Mitchell) i koji je za svoj doprinos u razumevanju sinteze ATP, kako u fotosintezi (u hloroplastima), tako i u procesu aerobnog disanja (u mitohondrijama) dobio Nobelovu nagradu, 1978. godine. Kasnija istraživanja i razvoj instrumentalnih i molekularnih metoda i tehnika (posebno, kristalografije) doveli su do razjašnjenja strukture, te enzimskih mehanizma koji funkcionišu u hloroplastnoj i mitohondrijskoj sintezi ATP, kao i sintezi ATP u citoplazmatičnoj membrani bakterija, tako da je još jedna Nobelova nagrada za hemiju dodeljena 1997. upravo za naučni doprinos u ovoj oblasti, naučnicima Polu Bojeru (engl. Paul D. Boyer) i Džonu Vokeru (engl. John E. Walker).

Mitchell je definisao ukupnu energiju za sintezu ATP kao „protonsku pokretačku silu (pmf, engl. proton motive force; Δp)“, koja je rezultanta protonskog hemijskog potencijala ($\Delta pH = pH$ gradijent; to je razlika u pH između lumena tilakoida i strome, odnosno, $\Delta pH = pH_{lum.} - pH_{str.}$) i transtilakoidnog električnog potencijala – napona (ΔE):

$$\Delta p = \Delta E - k (pH_{lum.} - pH_{str.}), \text{ na } 25^\circ C$$

k (konstanta proporcionalnosti) = 59 mV po jediničnoj vrednosti pH: transtilakoidna razlika od $pH=1$ je ekvivalentna transtilakoidnom naponu od 59 mV

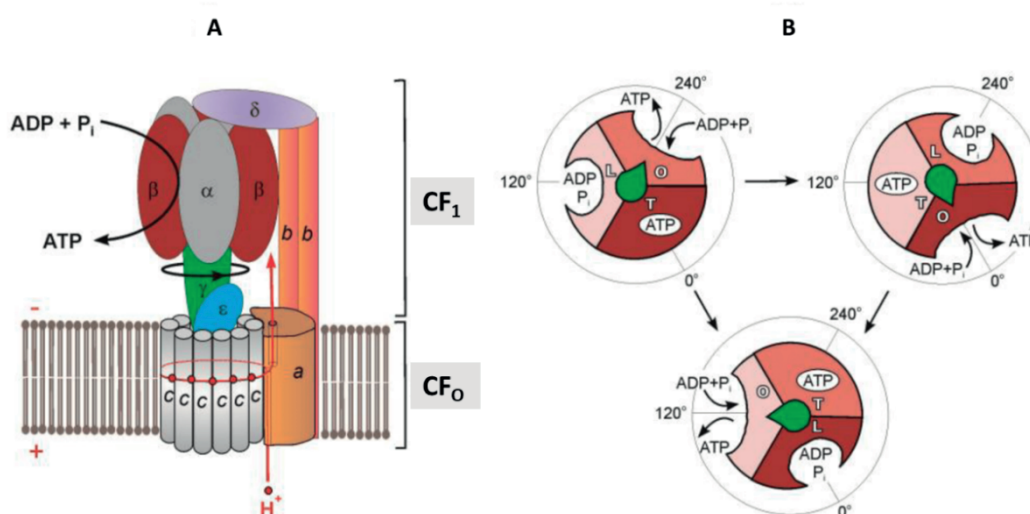
Spregnuta reakcija vektorskog transporta elektrona kroz tilakoidnu membranu i prenošenja protona (H^+) dovodi do toga da tilakoidni lumen postaje pozitivno naelektrisan i kiseo u odnosu na stromu ($pH_{lum.} < pH_{str.}$), a zakišeljavanje lumena povratno kontroliše oksidaciju (deprotonizaciju) plastohinola (PQH_2) preko citohroma b_6f -kompleksa. Prema tome, rezervoar PQ/PQH_2 i njihov kvantitativni odnos je regulatorno redoks mesto na kome se kontroliše efikasnost transporta elektrona, regulacija/ fosforilacija fotosintetičkih proteina, alternativna ekspresija, odnosno, transkripcija gena koji kodiraju proteine fotosintetičkog aparata i dr.

Prema tome, aktivnost enzima H^+ATP sin omogućena je (energizovana) protonskom pokretačkom silom (Δp), a sam enzim se može nazvati i „molekulskim motorom“ („nano – mašinom“) za proizvodnju energije (ATP). Aktivnost enzima se manifestuje kao:

- rotacija CF_0 regiona enzima i iniciranje protonskog fluksa (protok H^+ jona) preko „c“ i „a“ subjedinica CF_0 regiona u tilakoidnoj membrani.
- konformacione promene CF_1 regiona, koje su izazvane rotacijom CF_0 i protonskim tokom (električnom energijom) kroz tilakoidnu membranu (**Sl. 1.37A i B**).

Postoje tri konformacije CF_1 , od kojih je svaka određena različitim položajem centralne subjedinice rotora (γ -subjedinica). Rotacija CF_0 -prstena je podeljena u tri nejednaka koraka, tako da periferna drška (b-subjedinica) deluje kao elastična opruga, određujući promenu položaja α i β -subjedinica CF_1 -regiona i na taj način, ujednačavajući različite energetske doprinose svakog koraka. Karakteristike hloroplastne i mitohondrijske ATP-sintaze su slične.

Rotacija CF_0 , transport protona i uvrtnanje γ -subjedinice dovode do formiranja tri različite konformacije na β -subjedinici – glavnom katalitičkom mestu enzima, to su: labava (L), otvorena (O) i čvrsta (Č). Supstrat (ADP + P_i) se na početku vezuje za otvoreno mesto β -subjedinice i prevodi se u ATP na konformaciji čvrstog vezivanja. Nakon toga, rotacija i promena konformacije u otvorenu, dovodi do oslobađanja ATP iz enzima. U otvorenoj konformaciji katalitičkog mesta ADP i P_i se ponovo ubacuju, potom otvorena konformacija postaje konformacija labavog vezivanja, i na kraju konformacija čvrstog vezivanja, kada se formira novi molekul ATP-a (**Sl. 1.37B**).



Sl. 1.37. Mehanizam sinteze ATP: tri glavne konformacione promene CF_1 regiona (gledano sa gornje strane).

Put protona i smer rotacije γ -podjedinice tokom sinteze ATP-a (A);

Šema rotacionog katalitičkog mehanizma ATP sintaze: svaki par α i β podjedinica je prikazan jednom bojom (braon, svetlo braon i bež); zauzimanje mesta vezivanja ADP i P_i označeno je slovima: O – otvoreni položaj; L – labavo vezivanje; T – čvrsto vezivanje; γ -podjedinica je prikazana kao zelena strelica (B)

Adaptirano prema Zharova i sar., (2023). (Elektronski izvori slika, str. 101).

Tri molekula ATP-a se sintetišu prilikom svake rotacije enzima ATP-sintaze.

Svaka od 14 integralnih membranskih „c“ subjedinica CF_0 regiona enzimskog kompleksa transportuje jedan proton kroz tilakoid po jednoj rotaciji kompleksa, što sugerise o stehiometrijskoj relaciji:

$14 H^+$ u protoku kroz CF_0 daje $3 ATP = 14/3$, ili 4,67 protona za 1 ATP.

Eksperimentalno dobijene vrednosti za ovaj parametar stehiometrije su najčešće niže od ove teorijske vrednosti iz još uvek, nepoznatih razloga.

Na nivou ATP-sintaze se dešava u velikoj meri i regulacija brzine (intenziteta) fotosinteze, jer se brzina transporta elektrona može ograničiti kada ATP-a ima u izobilju, a protonski transtilakoidni gradijent visok.

1.5.1.2.2. Ciklični transport elektrona (CEF, engl. Cyclic Electron Flux): alternativni fotosintetički tok elektrona oko PS I

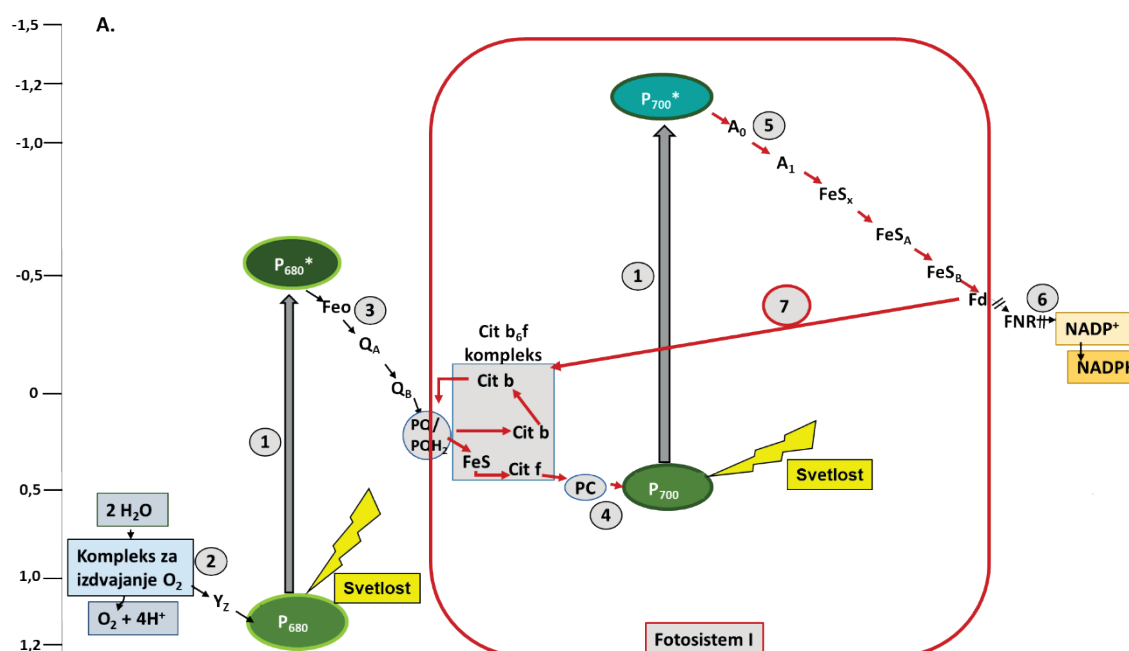
U svetlosnoj fazi fotosinteze, linearni transport elektrona po „Z“ šemi, rezultira sintezom ATP i NADPH, makroenergetskih jedinjenja neophodnih za asimilaciju CO₂ u Calvin-Bensonovom ciklusu. Međutim, brojna istraživanja fotosinteze, 50-ih godina XX veka (posebno treba pomenuti američkog istraživača Daniela I. Arnona i njegovu istraživačku grupu) rezultirala su saznanjima da transport elektrona u svetloj fazi fotosinteze ne mora da bude isključivo linearan, po „Z“ šemi, već da postoji i tzv. ciklični (kružni) elektronski transport kroz tilakoidnu membranu. Glavna specifičnost cikličnog transporta elektrona u odnosu na linearni, je što se u cikličnom transportu, elektroni sa PS I ne koriste za redukciju NADP⁺, već se vraćaju u ciklus kroz PSI do Cytb₆f kompleksa i PQ, gde se formiranjem PQH₂, vezani protoni (H⁺) simultano pumpaju u lumen tilakoida. Prema tome, u kružnom toku elektrona, svetlosna energija prevedena u električnu (transport elektrona) i prikupljena u fotosistemu I se koristi za stvaranje transtilakoidnog protonskog gradijenta (ΔpH), što doprinosi većoj proizvodnji ATP-a, bez istovremenog nastanka i NADPH, jer enzim feredoksin-NADP⁺ reduktaza (FNR) nije uključen.

U ciklični transport elektrona uključen je samo PS I, tj. P₇₀₀, uz prenosioce elektrona: A₀, A₁, FeS_x, FeS_A, FeS_B, Fd, zatim, tu su: Cyt b₆f, PQ i PC (**Sl. 1.38A**).

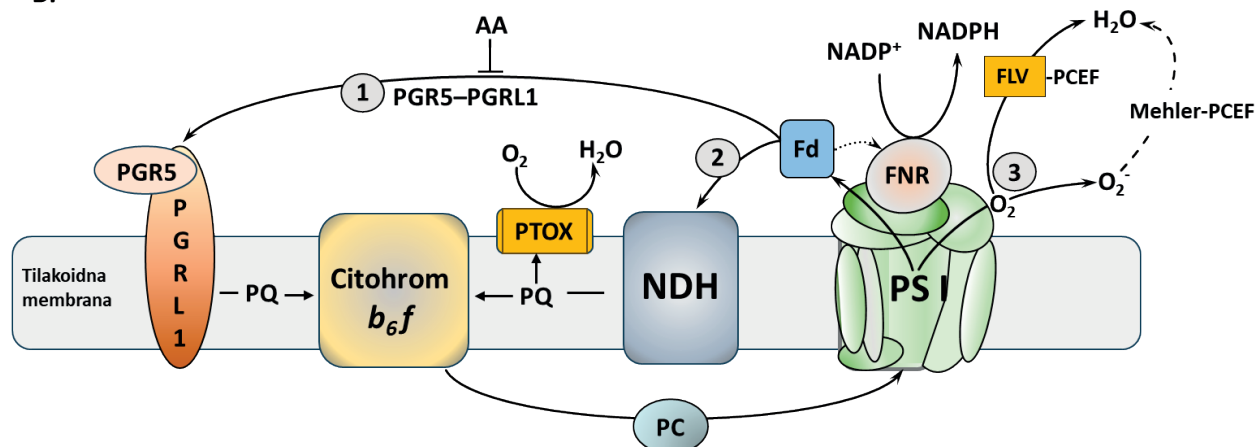
Najnoviji rezultati istraživanja ukazuju da su najmanje dva metabolička puta (elektronskog transporta/ fluksa) uključeni u ciklični transport elektrona, to su (**Sl. 1.38B**):

1. *PGR5-PGRL1 – put zavisen od protonskog gradijenta* (PGR, engl. proton gradient regulations-dependent), koji se smatra glavnim putem, a funkcioniše kroz transport elektrona od feredoksina (Fd) do plastohinona (PQ); naziva se još i Antimicin-senzitivni put (zato što ga blokira herbicid antimicin) i
2. *Hloroplastni-NDH – zavisni put*, koji se naziva još i Antimicin-insenzitivni put, podrazumeva transport elektrona od NADPH do plastohinona (PQ), uz posredstvo enzimskog kompleksa hloroplastne NDH, slične strukture kao respiratorna NADH-dehidrogenaza, ali je ipak specifičnog katalitičkog dejstva. Iako hloroplastna NDH predstavlja fotosintetički enzimski kompleks sa funkcijom uzimanja elektrona od Fd, ne može se smatrati NADPH-dehidrogenazom. Hloroplastni NDH-enzimski kompleks je lokalizovan u tilakoidima strome, ima više od 30 subjedinica, a subkompleks A sa PS I (u literaturi se naziva još i superkompleks A) je skoro u potpunosti organizovan prema stromi hloroplasta. Enzimski kompleks NDH je znatno manje zastupljen u strukturi tilakoida u poređenju sa glavnim fotosintetičkim proteinskim kompleksima.

Značaj i međusobni odnos ova dva puta u fotosintetičkom cikličnom transportu elektrona zavise od taksonomske pripadnosti (cijanobakterije, zelene alge, više biljke i dr.), starosti, ekoloških i brojnih drugih činilaca.



B.



Sl. 1.38. Ciklični transport elektrona (uokvireno crveno: uključuje reakcije 1, 5, 7, 4.) (A) je koordinisan preko dva delimično povezana puta katalisana sa dva enzimska kompleksa (B), to su:

1 PGR5-PGRL1 (koji kontroliše antimicin senzitivni, AA – put) i

2 Hloroplastni NDH-enzimski kompleks (koji kontroliše antimicin insenzitivni put). NDH redukuje plastohinon (PQ), dok ga terminalna plastidna oksidaza (PTOX) oksidiše (preuzima elektrone).

3 Pseudociklični transport elektrona (PCEF: FLV- i Mehler-); FLV - flavinski-2-Fe protein/enzim; feredoksin-NADP⁺ reduktaza (FNR) nije aktivna

Aktivnost kompleksa PGR5-PGRL1 usmerava glavnu rutu PS I cikličnog transporta elektrona regulisanu uglavnom preko generisanja i održavanja transtilakoidnog protonskog gradijenta (ΔpH) sa lumenalne i stromalne strane tilakoida grana kada se stvara protonska pokretačka sila (pmf) neophodna za indukovanje aktivnosti ATP-sintaze. Regulatorna uloga PGR5-PGRL1 enzimskog kompleksa sastoji se u sprečavanju prekomerne acidifikacije tilakoidnog lumena (prekomerno nakupljanje H⁺) i prekomerne redukcije membrane (previše elektrona u elektronskom transportu), te se na taj način, doprinosi stabilizaciji fotosinteze u nepovoljnim uslovima. Eksperimenti su pokazali da u odsustvu PGR5-PGRL1, hloroplastna-NDH kompenzuje do izvesne granice oscilacije u formiranju ΔpH (naročito ukoliko dolazi do njegovog smanjenja).

Regulacija cikličnog transporta elektrona kroz PS I je od ključne važnosti za brzinu i stabilnost fotosinteze. U tom smislu, biljke su razvile složen skup mehanizama za prilagođavanje fotosintetskog procesa promenama intenziteta svetlosti, dužine fotoperioda i dr., pri čemu ciklični transport elektrona zauzima važnu ulogu za uspostavljanje balansa ATP/NADPH. Ciklični elektronski transport ima veliki doprinos u optimizaciji fotosinteze kod C_4 biljaka koje su izložene većim svetlosnim intenzitetima i malom parcijalnom pritisku CO_2 . Hloroplastni NDH-enzimski kompleks ima nezamenljivu ulogu u obezbeđivanju ATP za usvajanje CO_2 u ćelijama omotača provodnih sudova, što potvrđuje i prisustvo agranalnih hloroplasta u njima (o specifičnosti C_4 fotosinteze biće reči kasnije). Suša, koja uslovljava zatvaranje stoma i posledično, nedostatak CO_2 , takođe je signal za aktivaciju cikličnog elektronskog transporta i održavanje dovoljne količine ATP u stromi hloroplasta. Kompleks NDH redukuje plastohinon (PQ), a enzim terminalna plastidna oksidaza (PTOX) ga oksiduje i funkcioniše u procesu **hlororespiracije**, kao donor elektrona za redukciju O_2 u H_2O (ima istu funkciju kao citohrom-c-oxidaza u mitohondrijalskom elektronskom transportu) (**Sl. 1.38B**). Hlororespiracija je put prenosa elektrona nezavisan od svetlosti u hloroplastima u kome je plastohinon (PQ) prenosilac elektrona u O_2 -posredovanoj oksidaciji NAD(P)H.

Procena je da u svetlosnoj fazi fotosinteze, kod C_3 biljaka, u zavisnosti od specifičnih uslova sredine, udeo cikličnog transporta elektrona u odnosu na linearni, može da iznosi i do 1/10.

1.5.1.2.3. Fotosintetički pseudo-ciklični transport elektrona (PCEF, engl.

Pseudocyclic Electron Flux, ili Mehler-ova reakcija): alternativni

fotosintetički tok elektrona kroz PS I do kiseonika/Voda-Voda ciklus

Alternativni fotosintetički elektronski fluksevi: ciklični (CEF) i pseudociklični (PCEF), od izuzetne su važnosti za efikasnost fotosinteze, zato što se njima obezbeđuje dodatna produkcija ATP u nepovoljnim ekološkim uslovima, pre svega, pri visokim svetlosnim intenzitetima kada dolazi do oksidativnog uništavanja fotosistema i pojave fotoinhibicije.

U pseudocikličnom transportu elektrona (PCEF), koji je otkriven polovinom prošlog veka od strane A. H. Mehlera (Mehler-ova reakcija, videti referencu), dolazi do transporta elektrona sa PS I na kiseonik, tj. dolazi do redukcije O_2 u H_2O (**Sl. 1.38B**). Ovaj alternativni elektronski fluks tokom svetle faze fotosinteze u uslovima visokih svetlosnih intenziteta, niskih koncentracija CO_2 i suše se takođe naziva i „Ciklus voda-voda“ jer se elektroni oslobođeni fotooksidacijom vode koriste za vezivanje H^+ i redukciju O_2 , na akceptorskoj strani PS I, čime se (ponovo) formira H_2O , a nastali protonski gradijent se koristi za sintezu ATP.

Danas je poznato da postoje dva pseudociklična puta elektronskog fluksa, to su:

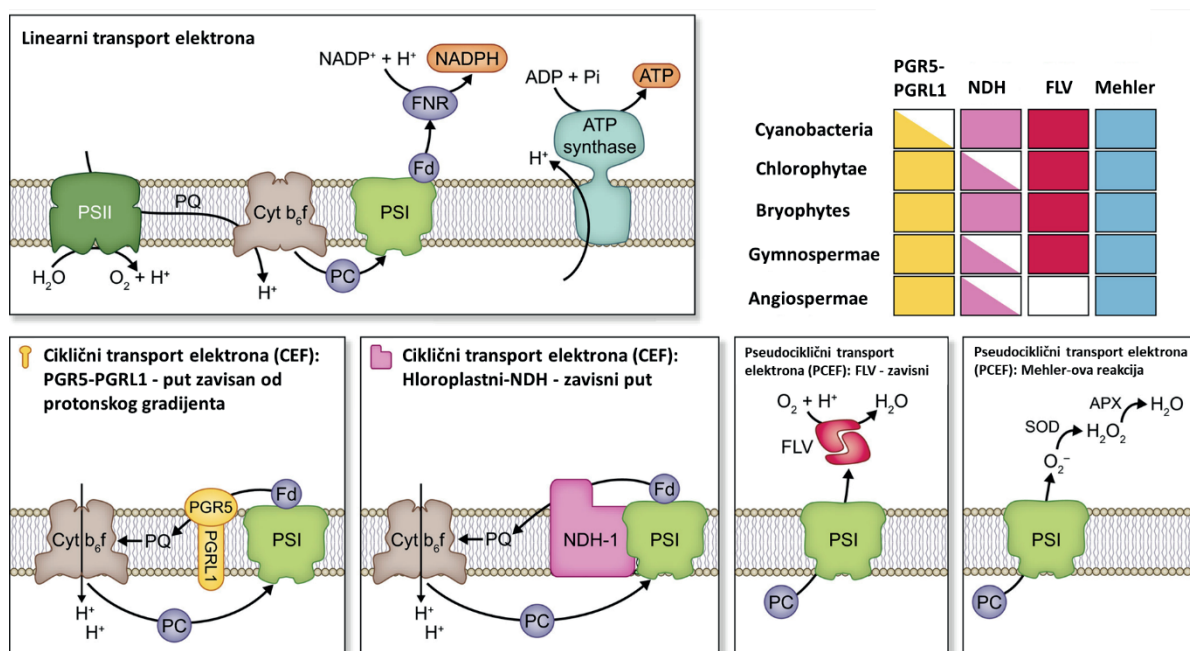
1. Mehler-PCEF biohemijski put koji je prisutan u svim aerobnim fotosintetičkim organizmima, od cijanobakterija do viših biljaka - angiospermi, i dešava se kada PSI redukuje (predaje elektrone) na kiseonik, pri čemu se nastaju reaktivni kiseonični molekuli (ROS, engl. Reactive Oxygen Species). U prvom stepenu redukcije, već na nivou PS I, O_2 prelazi u superoksid anjon ($O_2^{\cdot -}$) nakon što primi elektrone. Ovaj izuzetno reaktivni metabolit uklanja se iz metabolizma antioksidativnim enzimom *superoksid dismutazom*, tako što se vezivanjem H^+ , prevodi u vodonik-peroksid (H_2O_2), a H_2O_2 se potom prevodi u H_2O enzimom *askorbat peroksidaza*.
2. FLV-PCEF biohemijski put koji je određen katalitičkim dejstvom *flavinskih-2-Fe proteina/enzima (flavodii-ron proteini-FLVs: Flv1 i Flv3)* koji koriste višak elektrona na PS I za (foto)redukciju O_2 do H_2O , direktno, bez istovremenog stvaranja ROS. Oba poznata flavoproteina, Flv1 i Flv3, su esencijalni za zaštitu PS I i održavanje stabilne fotosinteze u uslovima promenljivih svetlosnih intenziteta.

Dok Mehler-PCEF daje ograničen doprinos protoku elektrona, FLV-PCEF alternativni elektronski fluks ima veći kapacitet za prikupljanje i dalju distribuciju elektrona, ali je on tokom evolucije nestao kod viših biljaka

(angiospermi), tako da je prisutan samo kod cijanobakterija, algi i mahovina.

Kada se govori o alternativnim elektronskim putevima kroz tilakoidnu membranu, mora se istaći značaj *terminalne plastidne oksidaze (PTOX)*, enzima koji je alternativni akceptor elektrona sa redukovano PQ i koji ih zatim prenosi na O_2 , čime se obrazuje H_2O . Ovim, delimično izmenjenim elektronskim fluksom, sprečava se prekomerna redukcija PS I (prekomerno nakupljanje elektrona u PS I), a elektroni koji potiču od vode, ponovo su iskorišćeni za formiranje vode.

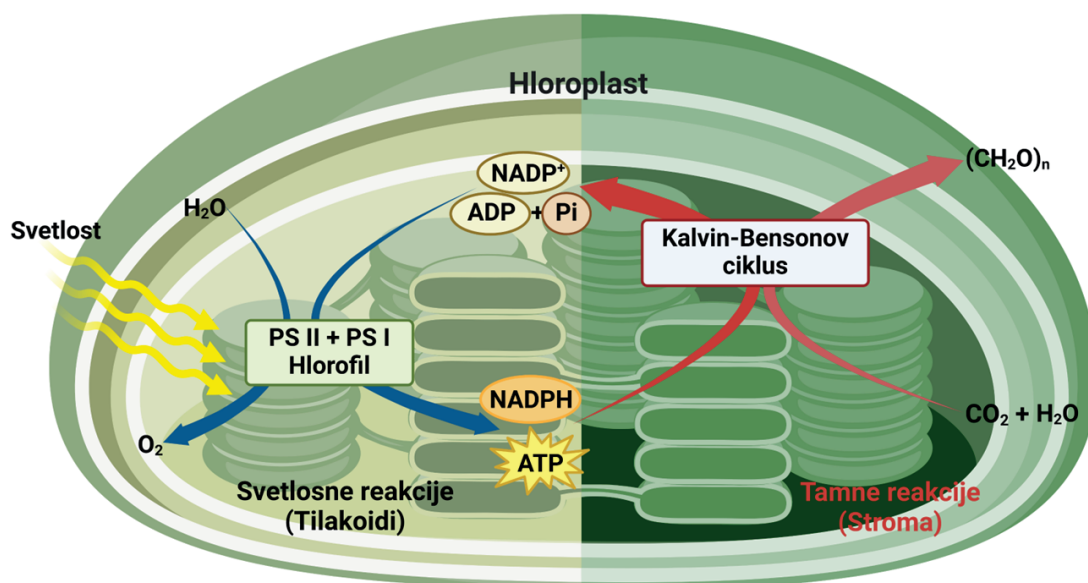
Linearni, ciklični i pseudociklični transport elektrona i varijacije kod specifičnih fotosintetičkih taksonomskih grupa, vide se na slici ispod (**Sl. 1.39**).



Sl. 1.39. Transport elektrona: 1. Linearni; 2. Ciklični (PGR5-PGRL1-protein-zavisni put); 3. Ciklični (Hloroplastni-NDH-zavisni put); 4. Pseudociklični (FLV zavisni) i 5. Pseudociklični – Mehler reakcija. Adaptirano prema: Alboresi i sar., (2019). Elektronski izvori slika, str.101.

1.5.2. Tamne reakcije fotosinteze – Calvin-Bensonov ciklus: C_3 karbonski ciklus (C_3 – fotosinteza)

U svetloj fazi fotosinteze dešavaju se reakcije kojima se korsi svetlosna energija (elektro-magnetno zračenje) za fotohemijску oksidaciju H_2O i produkciju O_2 , te za proizvodnju ATP i NADPH, molekula u kojima je svetlosna energija preobraćena i akumulirana u hemijsku energiju neophodnu za odvijanje enzimi kontrolisanih reakcija tamne faze fotosinteze, kao i brojnih drugih metaboličkih procesa. U stromi hloroplasta odvijaju se reakcije koje čine tamnu fazu fotosinteze i koje su primarno nezavisne od svetlosti. U ovim kompleksnim, enzimi kontrolisanim reakcijama, dolazi do redukcije atmosferskog CO_2 i ugradnje ugljenika (C) u ugljene hidrate – primarne produkte autotrofnog metabolizma, te se zbog toga reakcije tamne faze fotosinteze nazivaju i karbonske reakcije. Metabolički ciklus ugradnje atmosferskog ugljenika u organske molekule, odnosno ugljene hidrate naziva se Calvinov, ili češće, Calvin-Bensonov ciklus (engl. Calvin-Benson cycle) po istraživačima koji su na osnovu svojih eksperimentalnih otkrića dobijenih sredinom XX veka postavili osnove za razumevanje principa autotrofne ishrane, koji važe i danas (**Sl. 1.40**).



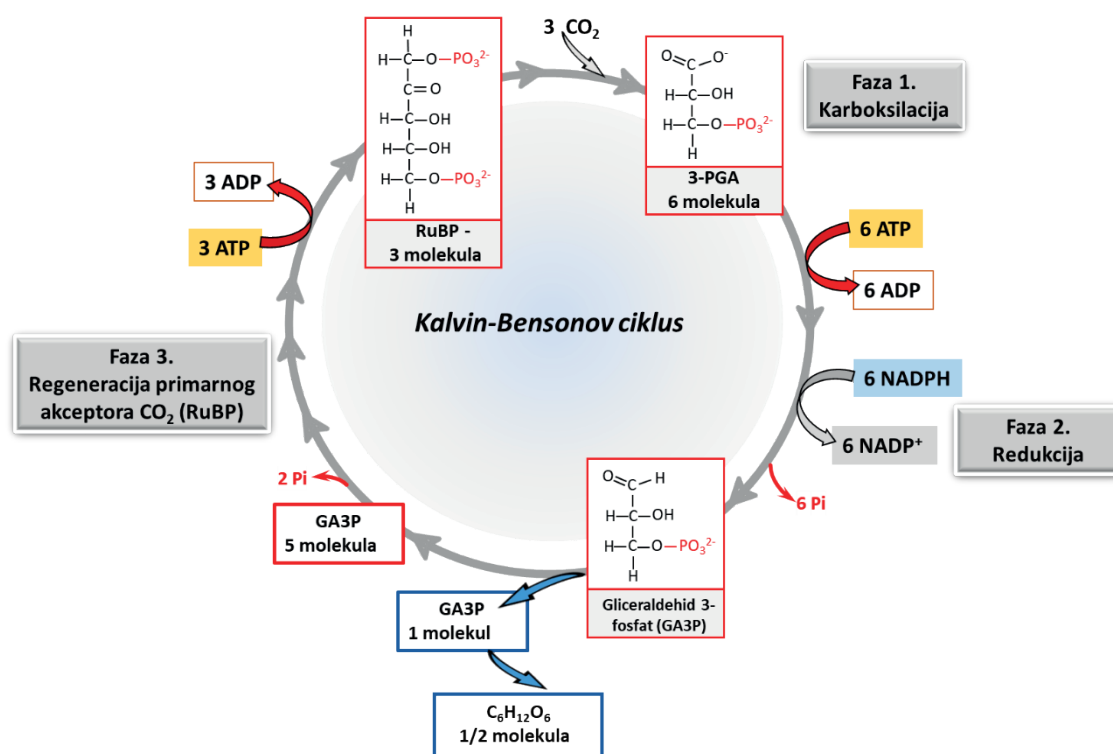
Sl. 1.40. Svetlosne i tamne (karbonske) reakcije fotosinteze u hloroplastu viših biljaka. Kreirano u: BioRender-u. Pajević, S. (2025); Elektronski izvori slika, 101.

Kalvin-Bensonov ciklus čini sistem enzimski kontrolisanih reakcija u stromi hloroplasta, koji počinje asimilacijom CO_2 iz atmosfere, a rezultira ugradnjom ugljenika (C) u molekulski skelet organskih jedinjenja. Za tamne reakcije fotosinteze, neophodni su glavni energetske produkti svetlih reakcija, NADPH i ATP. Prema tome, u ovom metaboličkom procesu autotrofnih organizama se stvara „hrana“ (organska materija, šećer), jer se ugljenik iz atmosfere ugrađuje u organska jedinjenja. Hemijska energija deponovana u C-H-O vezama nastalog organskog jedinjenja je transformisana svetlosna energija apsorbovana u svetloj fazi fotosinteze (ATP i NADPH) i koja će se u procesu ćelijskog disanja prevesti u ATP koji je neophodan za sve metaboličke energetske potrebe organizama. Calvin-Bensonov ciklus se naziva još i Reduktivni pentozno-fosfatni ciklus (RPPC) i definiše fotosintezu kao redukcioni proces, jer ugljenik iz oksidovane (CO_2) prelazi u redukovanu hemijsku formu (C-H).

Fiksacija CO_2 preko karboksilacije ribuloze 1,5-bisfosfata (RuBP), nastanak jedinjenja sa 3 C atoma – trioza fosfata (3-fosfoglicerinske kiseline, 3-PGA) i nakon redukcije, nastanak gliceraldehid 3-fosfata (G3P, ili GAP), odnosno dihidroksiaceton-fosfata (DHAP), označava se kao C_3 tip fotosinteze, jer prvo stabilno jedinjenje koje nastaje u ovom procesu ima 3 C atoma.

Kalvin-Bensonov ciklus čine tri faze:

1. *Karboksilacija – asimilacija CO_2* od strane akceptorskog molekula, a to je šećer pentoza (5C) – ribuloza 1,5-bisfosfat (ili ribuloza di-fosfat, RuBP). Rezultat ovog procesa je stvaranje dva molekula trioza-fosfata (3-C intermedijera, TP) tj. 3-fosfoglicerinske kiseline (3-fosfoglicerat, 3-PGA);
2. *Redukcija 3-fosfoglicerata* uz pomoć enzima za čiju aktivnost su neophodni fotohemijski generisani ATP i NADPH. Rezultat je nastanak dva oblika trioza-fosfata koji se (uz pomoć enzima TP-izomeraza) prevodeu jedan u drugi, to su: aldotrioza-gliceraldehid-3-fosfat (GAP, ili G3P) i ketotrioza – dihidroksiaceton fosfat (DHAP);
3. *Regeneracija akceptora CO_2 (RuBP)* preko serije enzimski-kontrolisanih reakcija (**Sl. 1.41**).



Sl. 1.41. Kalvin-Bensonov ciklus. Nakon faze redukcije, najveći deo formiranih trioza-fosfata nastavlja biohemijski put regeneracije akceptora CO_2 (RuBP), dok njihov manji deo odlazi u biosintetske puteve sinteze (neto) produkata: primarno, glukoze, koja je prekursor u sintezi saharoze (u citoplazmi ćelija) i skroba (u hloroplastu).

Otkriće ovog metaboličkog C_3 -tipa fotosinteze vezuje se za istraživanje američkih hemičara, Kalvina (engl. Melvin Calvin), Bensona (engl. Andrew Alm Benson) i Bashama (engl. James Alan Bassham), od 1946. do 1953. godine, koji su koristili izotop ugljenika ^{14}C i analitičke tehnike hromatografije za identifikaciju pojedinih jedinjenja – intermedijera u ciklusu.

Melvin Kalvin i njegove kolege su istraživali fotosintezu na jednoćelijskoj algi *Chlorella* sa ciljem da jasno definišu korake i intermedijere u fiksaciji CO_2 . U rastvor u kome je alga rasla nakon postizanja konstantne fotosinteze, dodavali su radioaktivni $^{14}\text{CO}_2$ sa ciljem da obeleže intermedijarna jedinjenja proizvedena tokom ciklusa. Čelijski metabolizam je potom zaustavljen, odnosno, enzimi su inaktivirani ubacivanjem algi u vreli alkohol (80% etanol). Hromatografskom metodom je utvrđeno da već nakon 60 sekundi u radioaktivnom $^{14}\text{CO}_2$, alga formira fosforilisani 3- ^{14}C šećer (3-fosfoglicerinsku kiselinu, 3-PGA). Kasnije je otkriveno da se redukcijom 3-fosfoglicerinske kiseline proizvodi više različitih fosforiliranih šećera.

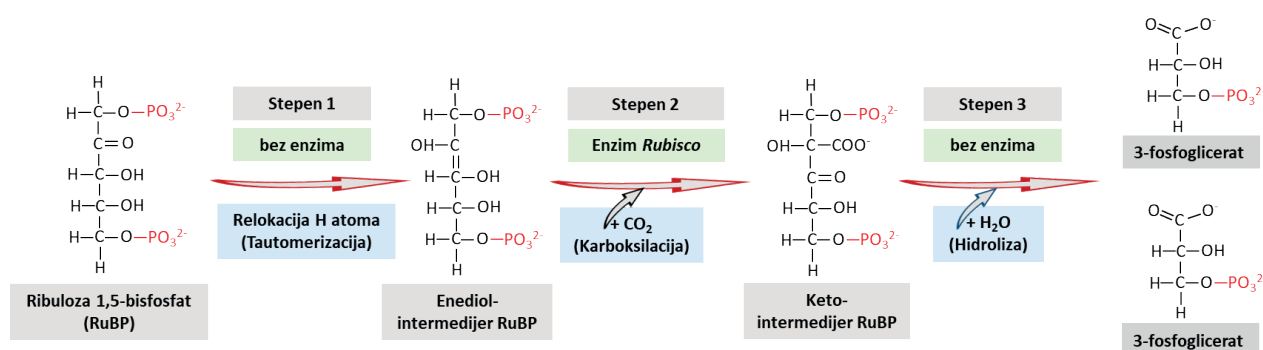
Kalvin je dobio 1961. godine Nobelovu Nagradu u oblasti hemije, za rezultate istraživanja i otkriće CO_2 puta asimilacije u biljnim ćelijama.

Reakcije Kalvin-Bensonovog ciklusa:

1. Karboksilacija Ribuloze 1,5-bisfosfata (RuBP) – Fiksacija CO_2 : Primarni akceptor CO_2 je šećer – pentoza: Ribuloza 1,5-bisfosfat, a ova reakcija je katalisana enzimom Ribuloza 1,5-bisfosfat-karboksilazom (Rubisco ili RuBisCo). Ovaj enzim u uslovima visokog parcijalnog pritiska O_2 i niskog parcijalnog pritiska CO_2 , može da katališe i oksidaciju RuBP, što se dešava u C_2 -oksidativnom fotosintetičkom ciklusu ugljenika (u procesu fotorespiracije), o čemu će biti više reči kasnije. Stoga se ovaj enzim označava i kao Ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaza/ oksigenaza.

Enzim *Ribuloza 1,5-bisfosfat-karboksilaza/oksigenaza* katališe reakciju ugradnje CO_2 i nastanak 2 molekula 3-fosfoglicerinske kiseline. Stoga, CO_2 aktivira enzim Rubisco i služi kao supstrat za njegovu aktivnost.

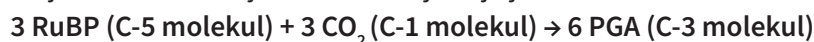
U procesu karboksilacije Kalvin-Bensonovog ciklusa, jedan molekul CO_2 i jedan molekul H_2O reaguju sa jednim molekulom RuBP, tako da nastaju dva molekula 3-fosfoglicerinske kiseline. Vezivanje RuBP (supstrata) i enzima Rubisco, te nastanak 2 molekula 3PGA, dešava se u dvostepenom procesu: prvo nastaje enediol-intermedijer RuBP (nakon relokacije H-atoma) koji je supstrat za vezivanje CO_2 (ili O_2 , ako je u pitanju fotorespiracija). Primarno, nakon karboksilacije nastaje keto-intermedijer RuBP (karboksi-ketoarabinitol-bisfosfat), a zatim njegova hidratacija dovodi do cepanja C-C veze u molekulu pentoze i nastanka 2 molekula 3-fosfoglicerinske kiseline ($2 \times 3\text{PGA}$) (**Sl. 1.42**).



Sl. 1.42. Karboksilacija RuBP (supstrata) i nastanak 3PGA je trostepeni proces.

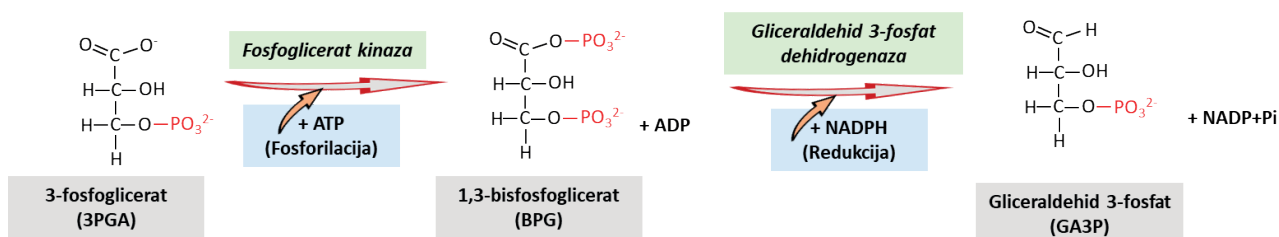
U ovom procesu CO_2 se ugrađuje u karboksilnu grupu 3-fosfoglicerinske kiseline (PGA). Visoki afinitet enzima Rubisco za vezivanje CO_2 osigurava karboksilaciju RuBP i pri niskom parcijalnom pritisku CO_2 .

Sumarna jednačina reakcije karboksilacije koja je katalisana enzimom Rubisco:



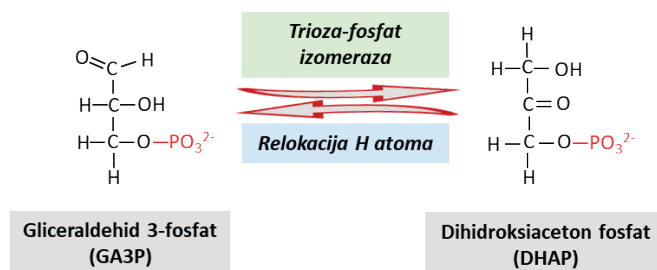
2. Redukcija 3-fosfoglicerinske kiseline (PGA): Energija deponovana u molekulima ATP i NADPH, produktima svetle faze fotosinteze, se koristi za prevođenje nastalog 3-C jedinjenja (3PGA) u drugo 3-C jedinjenje, gliceraldehid 3-fosfat (GA3P). Ovo je omogućeno dvema spregnutim reakcijama (**Sl. 1.43**):

- prvo dolazi do fosforilacije 3PGA na karboksilnoj grupi, pri čemu nastaje 1,3 bisfosfoglicerinska kiselina (BPG), a reakcija je katalisana enzimom *fosfoglicerat kinazom*;
- u drugom stepenu, NADPH redukuje 1,3 bisfosfoglicerat u gliceraldehid 3-fosfat (GA3P) u reakciji koja je katalisana enzimom gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazom. Prenosjenje elektrona na supstrat sa NADPH i nastanak NADP^+ , je proces redukcije. Nastali ADP i NADP^+ odlaze ponovo kao supstrati u reakciji svetle faze fotosinteze da bi se re-energizovali, odnosno da bi opet nastali ATP i NADPH.



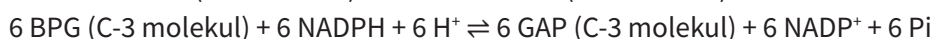
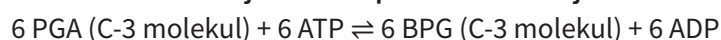
Sl. 1.43. Spregnute reakcije fosforilacije i redukcije 3PGA i nastanak GA3P

U reverzibilnoj reakciji katalisanoj enzimom *trioza-fosfat izomerazom*, relokacija H atoma u molekulu GA3P dovodi do formiranja izomerne forme GA3P, a to je dihidroksiaceton fosfat (DHAP) (**Sl. 1.44**).



Sl. 1.44. Reakcija izomeracije GAP i DHAP.

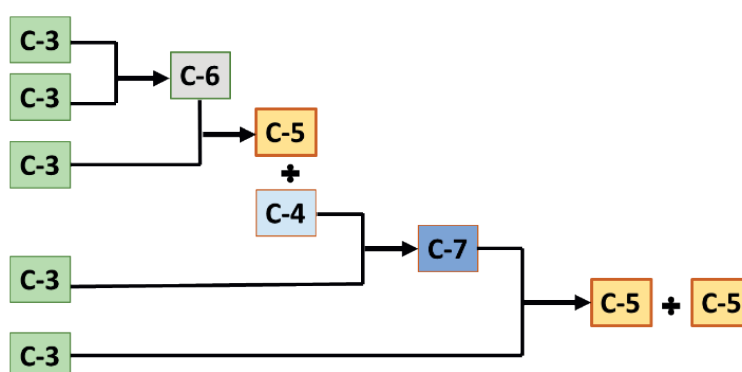
Sumarna jednačina procesa redukcije:



$6 \text{ GAP (C-3 molekul)} \rightleftharpoons 6 \text{ DHAP (C-3 molekul)}$ – ova reakcija se smatra i početkom sledeće faze

3. **Regeneracija** ribuloze-1, 5-bisfosfata (RuBP): Nakon formiranja 6 molekula GAP u fazi redukcije, jedan C molekul (odnosno 1/6 ukupno fiksiranog C u jednom ciklusu) napušta Kalvinov ciklus i služi za sintezu neto fotosintetičkih proizvoda (primarno, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, o čemu će biti reči kasnije). Pošto molekul $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ima šest atoma ugljenika, potrebno je da se Kalvinov ciklus ponovi šest puta (po jedan obrt za svaki fiksiran molekul ugljen-dioksida) da bi se sintetisao jedan molekul ugljenih hidrata. Preostali GAP molekuli (5/6 fiksiranog ugljenika po jednom ciklusu) se zadržava u samom ciklusu da bi se ponovo sintetizovao molekul akceptora za fiksaciju CO_2 – RuBP i da bi se ciklus održao, odnosno, da bi se obezbedila kontinuirana fotosintetička fiksacija CO_2 . Konstantna regeneracija RuBP obezbeđena je putem serije enzimski kontrolisanih reakcija koje uključuju formiranje ugljovodoničnih fosfata strukture: C-3, C-4, C-5, C-6 i C-7 (**Sl. 1.45**). U regeneraciji RuBP koristi se takođe ATP.

U ovoj seriji reakcija, pet trioza (C-3) se pretvara u tri pentoze (C-5):



Sl. 1.45. Prevođenje trioza u pentoze u fazi regeneracije RuBP Kalvin-Bensonovog ciklusa.

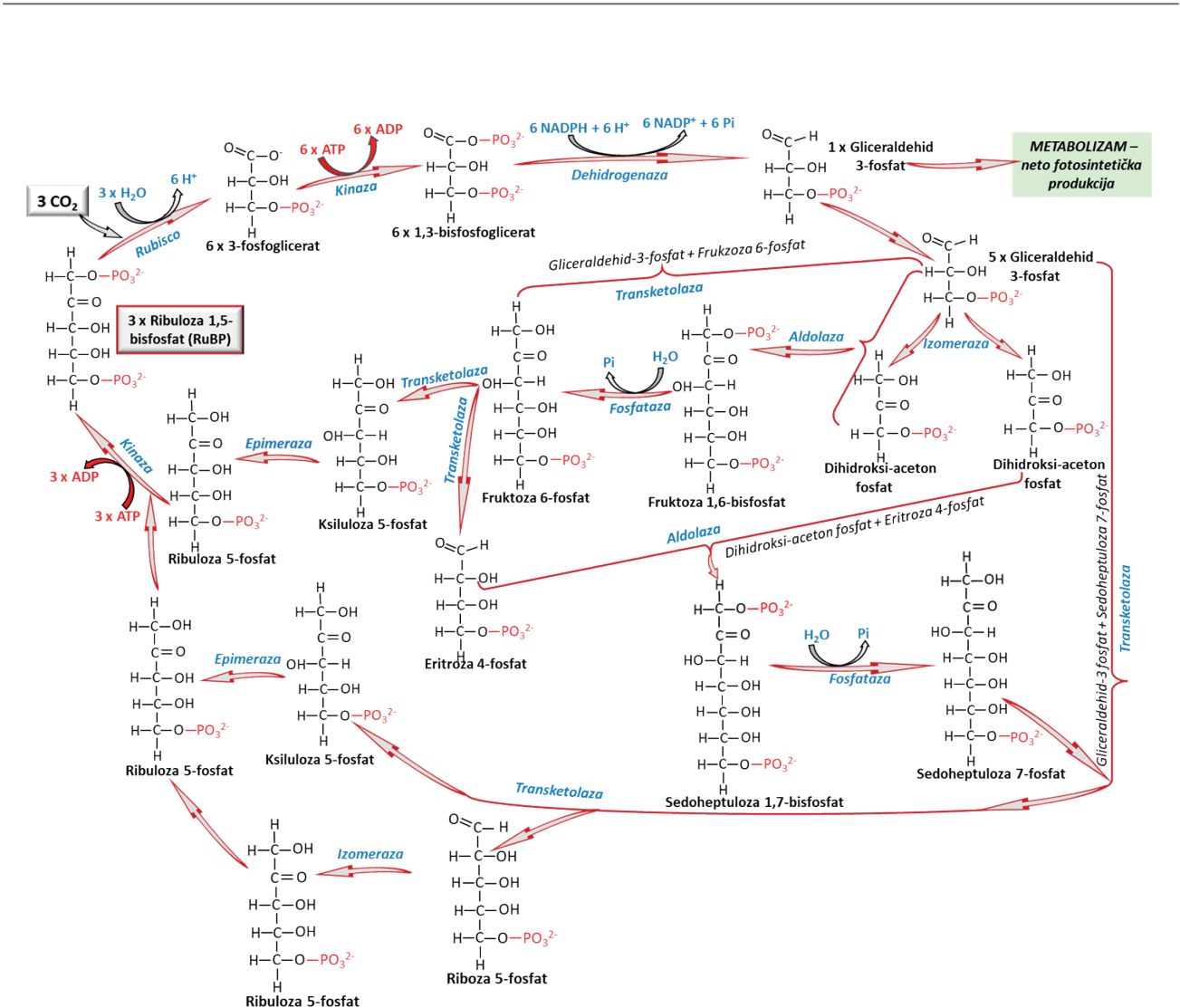
Prvi deo faze regeneracije Kalvin-Bensonovog ciklusa uključuje konverziju GA3P-a u fruktoza-6-fosfat (F6P), tako što se jedan molekul GA3P enzimom *trioza-fosfat izomerazom* prevodi u DHAP koji onda u procesu aldolne kondenzacije sa molekulom GA3P (katalisano enzimom *aldolazom*) gradi molekul fruktoza-1,6-bisfosfat (FBP), koji se hidrolizuje i defosforiliše (enzim *fruktoza 1,6-bisfosfataza*) u fruktoza-6-fosfat (F6P) (Tabela 1.4). U sledećem koraku, dolazi do premeštanja C atoma (C-1 i C-2) sa molekula F6P na molekule GA3P,

što je enzimski katalisano *transketolazom*, rezultat je nastanak dva molekula: eritroze-4-fosfata (E4P) i ksiluloze-5-fosfata (X5P). Ova faza ciklusa može izuzetno uticati na krajnju brzinu fiksacije CO₂, jer povezuje primarni (sinteza skroba i saharoze iz F6P) i sekundarni metabolizam: supstrati i proizvodi enzima *transketolaze* mogu obezbediti ugljenik (iz eritroze-4-fosfata) za sintezu aromatičnih amino kiselina i fenilpropanoida (jedinjenja koja utiču na za ukus, teksturu i boju), sintezu nukleotida (iz R5P) i dr.

Tabela 1.4. Faza regeneracije Kalvin-Bensonovog ciklusa: reakcije i enzimi

Enzimi	Reakcije
<i>Trioza-fosfat izomeraza</i>	Gliceraldehid-3-fosfat (GA3P) $\longrightarrow$ Dihidroksiaceton fosfat (DHAP)
<i>Aldolaza</i>	GA3P + DHAP $\longrightarrow$ Fruktol-1,6-bisfosfat (FBP)
<i>Fruktol-1,6-bisfosfataza</i>	FBP + H ₂ O $\longrightarrow$ Fruktol-6-fosfat (F6P) + P _i
<i>Transketolaza</i>	F6P + GA3P $\longrightarrow$ Eritroza-4-fosfat (E4P) + Ksiluloza-5-fosfat (X5P)
<i>Aldolaza</i>	E4P + DHAP $\longrightarrow$ Sedoheptuloza-1,7-bisfosfat (SedBP)
<i>Sedoheptuloza-1,7-bisfosfataza</i>	SedBP + H ₂ O $\longrightarrow$ Sedoheptuloza-7-fosfat (Sed7P) + P _i
<i>Transketolaza</i>	Sed7P + GA3P $\longrightarrow$ Riboza-5-fosfat (R5P) + Ksiluloza-5-fosfat (X5P)
<i>Ribuloza-5-fosfat epimeraza</i>	X5P $\longrightarrow$ Ribuloza-5-fosfat (Ru5P)
<i>Riboza-5-fosfat izomeraza</i>	R5P $\longrightarrow$ Ribuloza-5-fosfat (Ru5P)
<i>Ribuloza-5-fosfat kinaza (Fosforibonukleaza)</i>	Ru5P + ATP $\longrightarrow$ Ribuloza-1,5-bisfosfat (RuBP) + ADP + H ⁺

U sledećoj etapi ciklusa aldolnom kondenzacijom (enzim *aldolaza*), eritroza-4-fosfat (E4P) i dihidroksiaceton-fosfat (DHAP) grade C-7 jedinjenje, sedoheptulozu-1,7-bisfosfat (SedBP), čijom defosforilacijom (enzim fosfataza) nastaje sedoheptuloza-7-fosfat (Sed7P). U drugoj reakciji katalisanoj enzimom *transketolaza*, sedoheptuloza-7-fosfat i gliceraldehid-3-fosfat (GA3P) grade dva molekula pentoze: ribozu-5-fosfat (R5P) i ksilulozu-5-fosfat (X5P). Epimerizacijom dva molekula (enzim *epimeraza*) ksiluloze-5-fosfata nastaju dva molekula ribuloze-5-fosfata (Ru5P), dok izomerizacijom (enzim *izomeraza*) molekula riboze-5-fosfata, nastaje jedan molekul ribuloze-5-fosfata (Ru5P). Fosforilacijom sa ATP katalisanom enzimom *kinaza* na kraju ciklusa regenerišu se 3 molekula ribuloze-1,5-bisfosfata (RuBP) (**Sl. 1.46**).



Sl. 1.46. Calvin-Bensonov ciklus: faza karboksilacije, faza redukcije i faza regeneracije primarnog akceptora CO_2 . Tri molekula RuBP (3 molekula $\times$ C-5 = C-15, ukupno) reaguje sa tri molekula CO_2 (C-3, ukupno); u fazi karboksilacije i u fazi redukcije nastaje 6 molekula GA3P (6 molekula $\times$ C-3 = C-18, ukupno).

Regeneracija RuBP obezbeđuje kontinuiranu i neometanu asimilaciju CO₂ i sintezu organske materije (primarni metabolizam).

Sumarno, za fosforilaciju trioza-fosfata (C-3) koji nastaju u fazi karboksilacije i redukcije Kalvin-Benson-ovog ciklusa, neophodna je energija ATP i NADPH koji nastaju u svetlosnoj fazi fotosinteze, u/n tilakoidima hloroplasta:



Od šest molekula nastalih trioza fosfata (3PGA), pet se koristi kao supstrat u fazi regeneracije akceptora CO_2 (RuBP):



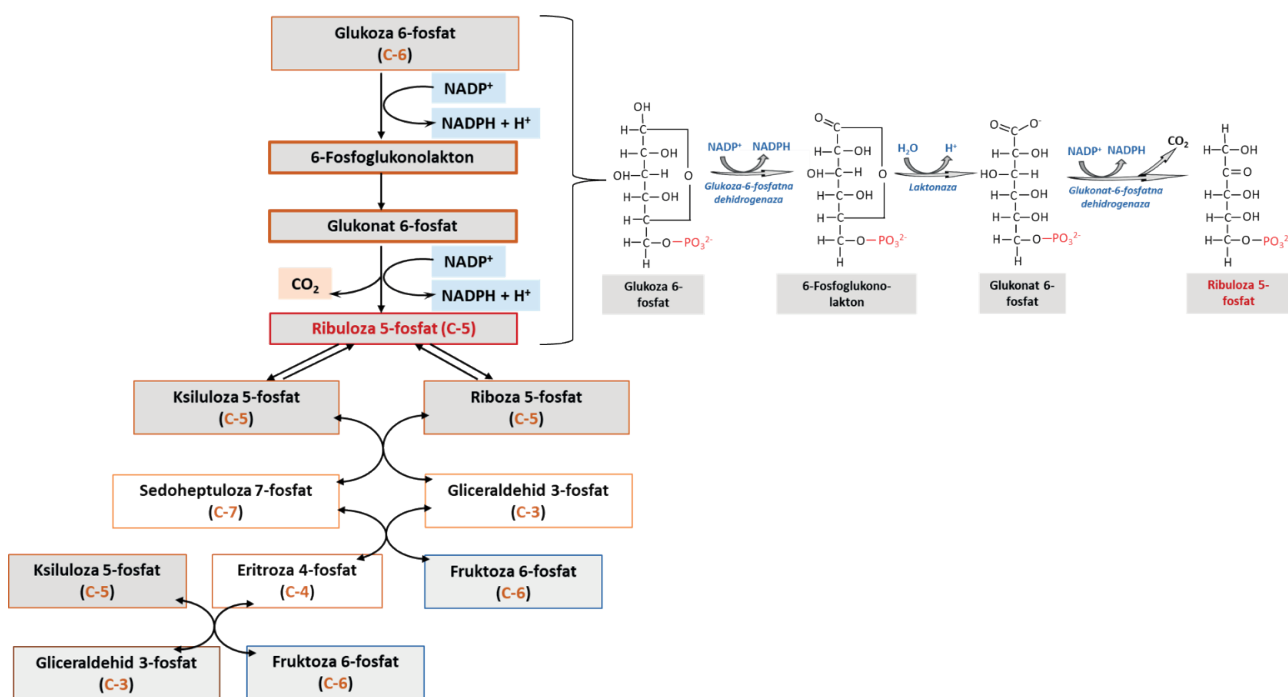
Prema stehiometrijskoj jednačini fotosinteze (kvantitativni odnosi ulaznih i izlaznih komponenti procesa), od ukupno asimilovanog ugljenika, 1/6 trioza fosfata (GA3P) je supstrat za sintezu neto-produkta primarnog metabolizma, a to su ugljeni hidrati, glukoza, saharoza i skrob.

1.5.2.1. Regulatorni mehanizmi Calvin-Bensonovog ciklusa

1.5.2.1.1. Oksidativni pentozno-fosfatni ciklus u hloroplastima (OPPC):

sinteza pentoza za regeneraciju RuBP i NADPH u mraku

Već je rečeno da svetla i tamna faza fotosinteze teku simultano na svetlosti. Calvin-Benson-ov ciklus, koji se u skladu sa hemijskim reakcijama naziva još i *reduktivni pentozno-fosfatni ciklus (RPPC)*, predstavlja glavni metabolički put CO_2 u fotosintezi i pokreće se zahvaljujući svetlosnoj energiji koja je prevedena u hemijsku (ATP i NADPH) u svetlosnoj fazi fotosinteze. Sve dok traje sinteza ATP i NADPH u tilakoidima, redukcija CO_2 u Calvin-Benson-ovom ciklusu je dominantan proces u stromi hloroplasta. Kada u nedostatku svetlosti prestane sinteza ATP i NADPH, u hloroplastu počinje niz reakcija *oksidativnog pentozno-fosfatnog ciklusa (OPPC)*, metaboličkog puta koji se dešava i u citoplazmi animalnih ćelija. Ove sukcesivne reakcije u OPPC su reverzne reakcije u odnosu na Calvin-Benson-ov ciklus (RPPC) i istovremeno su reverzibilne, pošto ih obavljaju isti enzimi u oba smera (**Sl. 1.47**).



Sl. 1.47. Oksidativni pentozno-fosfatni ciklus (OPPC) u hloroplastima (Fosfo-glukonatni ciklus).

Oksidativni pentozno-fosfatni metabolički put/ciklus (OPPC) je aerobni deo pentozno-fosfatnih metaboličkih puteva u kome se heksoza-fosfati (glukoza 6-fosfat) oksiduju u pentoza-fosfate (ribulozu-5-fosfat), pri čemu se oslobađa molekul CO_2 (dekarboksilacija) i 2 molekula redukovano nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NADPH):



Glukoza-6-fosfat se oksiduje enzimom glukoza-6-fosfat dehidrogenaza do 6-fosfoglukonolaktone koji se potom hidrolizuje enzimom laktonaza do intermedijera glukonat-6-fosfata čijom oksidacijom (enzim: glukonat-6-fosfat-dehidrogenaza) nastaje ribuloza-5-fosfat. Konverzija glukoze-6-fosfata u ribulosu-5-fosfat nije

reverzibilna, spontana je i egzergona (egzotermna) reakcija gde se slobodna energija reakcije/reaktanata akumulira u produktu – rudokovanom NADPH (dva molekula), a istovremeno dolazi i do dekarboksilacije glukoza-6-fosfata i oslobađanja 1 molekula CO_2 .

U mraku je aktivnost fotosintetičkih enzima i koncentracija međuprodukata (pre svega, glavnih supstrata, trioza-fosfata) Calvin-Benson-ovog ciklusa relativno niska, stoga je značaj OPPC u hloroplastima da:

- obezbeđuje izvesnu količinu NADPH za reakcije koje se nastavljaju u mraku (regeneracija redukujućih ekvivalenata) i
- održava konstantnu količinu pentoza u hloroplastima koje su neophodni supstrat da se izgradi (u fazi regeneracije Calvin-Benson-ovog ciklusa) Ribuloza-1,5-bisfosfat (RuBP) – primarni akceptor CO_2 . Bez postojanja izvesne količine pentožno-fosfatnog pula (RuBP) i u mraku, u tzv. fazi *indukcije fotosinteze*, sa prvim momentima osvetljavanja hloroplasta nakon mraka, reduktivni pentožno-fosfatni ciklus ne bi mogao da počne, jer bi nedostajao akceptor CO_2 , kao i redukujući oblici NADPH.

1.5.2.1.2. Enzimi Calvin-Bensonovog ciklusa (RPPC) i njihova katalitička aktivnost

Sadržaj i aktivnost enzima određuje kvalitativni i kvantitativni odnos brojnih intermedijera i supstrata u RPPC zavisno od dinamike svetlosti i mraka. Stoga je biohemijska transformacija hloroplasta u odnosu na delovanje spoljašnjih faktora (svetlost, temperatura, vlažnost itd.) zavisna od enzima koji kao glavni regulatorni mehanizam određuju efikasnost iskorištavanja svetlosne energije u fotosintetičke svrhe. Kvalitativni i kvantitativni enzimski profil u hloroplastima (stromi, gde se odvija Calvin-Benson-ov ciklus) određen je ekspresijom jedarnog i hloroplastnog genoma. Jedarno kodirani enzimi sintetišu se (u fazi translacije) na 80S-ribosomima u citoplazmi i transportuju u stromu hloroplasta, dok se hloroplastno kodirani enzimi sintetišu na 70S-ribosomima u stromi hloroplasta. Veliki deo regulatornog signalinga između jedarnog i plastidnog genoma određen je time što produkti aktivnih gena jedra kontrolišu transkripciju i translaciju na aktivnim genima plastidnog genoma, što je utvrđeno i kod sinteze enzima Rubisco. Ovo međutim, nije isključivo, pošto postoji i obrnuta regulacija, kada sinteza proteina u stromi hloroplasta određuje ekspresiju (transkripciju/ posttranskripciju/ translaciju/posttranslaciju) na nivou jedarnog genoma. Treba istaći da posttranslacione modifikacije u sintezi proteina/ enzima utiču na brze promene u aktivnosti enzima.

Iako za tamnu fazu fotosinteze nije potrebna neposredna apsorpcija svetlosti, ona u velikoj meri upravlja ekspresijom stromalnih enzima hloroplasta koji su kodirani jedarnim genomom, u prvom redu to su: fitohrom i „plavi receptori“ (kriptohrom i fototropin).

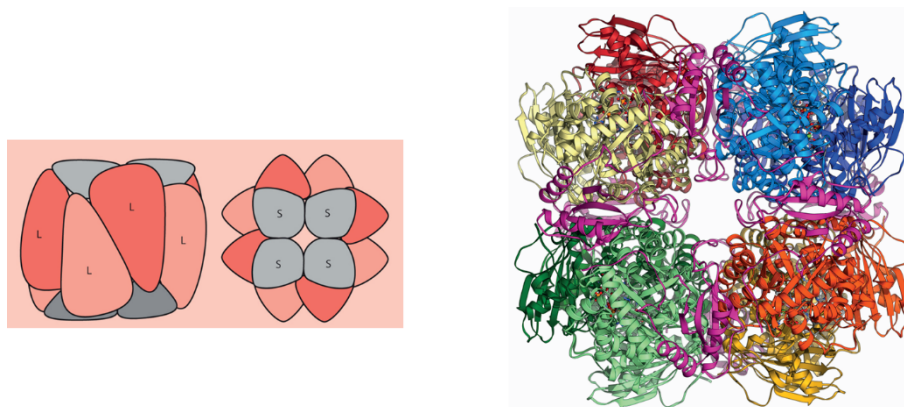
Pet glavnih enzima Calvin-Benson-ovog ciklusa čija aktivnost je indukovana i zavisna od svetlosti su:

- *Rubisco*,
- *Fruktoza-1,6-bisfosfataza*,
- *Sedoheptuloza-1,7-bisfosfataza*,
- *Ribuloza-5-fosfat kinaza (Fosforibonukleaza) i*
- *Glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaza (NADP-glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza).*

1.5.2.1.2.1. Enzim ribuloza-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (Rubisco)

Ribuloza bisfosfat-karboksilaza/oksigenaza (Rubisco) je jedini enzim koji omogućava fiksaciju atmosferskog CO_2 i ugradnju ugljenika u organske molekule za formiranje biomase. Ovaj enzim je stoga najzastupljeniji protein, neophodan za postojanje života na Zemlji. Sastoji se od osam velikih polipeptidnih subjedinica (L, engl. Large) svake veličine od 51 do 58 kDa i osam malih subjedinica (S, engl. small) svake veličine od 12 do 18 kDa, koje zajedno formiraju strukturu L8S8. Savijanje polipeptida koji čine subje-

dinice i njihovo sklapanje u konformaciju funkcionalnog enzima Rubisco uključuje male proteine – šaperone (engl. chaperone). (**Sl. 1.48.**).



Sl. 1.48. Ribuloza bisfosfat-karboksilaza/oksigenaza (Rubisco). Sastoji se od 8 velikih (L) i 8 malih (S) subjedinica (dva centralna sloja od 4 L-subjedinice okružena su sa po 4 S-subjedinice); lateralni izgled i izgled sa gornje strane. Adaptirano prema Prat i sar., (2009). Elektronski izvori slika, str. 101.

Sa ukupno 16 subjedinica, Rubisco je jedan od najvećih enzima u prirodi. Velike podjedinice enzima su kodirane u stromi hloroplasta ekspresijom gena hloroplastnog genoma, dok su male podjedinice kodirane nuklearnim genomom ćelije, a zatim su unete u stromu hloroplasta preko spoljašnje i unutrašnje membrane. Na funkcionalnom nivou, svaka velika podjedinica (L) nosi po jedno katalitičko mesto, dok male podjedinice (S) stabilizuju enzimski kompleks, imaju regulatornu ulogu, a dosadašnja naučna dostignuća upućuju na zaključak da nemaju neposrednu ulogu u fiksaciji CO_2 . Kod nekih fotosintetičkih purpurnih bakterija Rubisco je dimer i sastoji se samo od dve velike subjedinice.

Postoje dva mehanizma aktivacije i regulacije katalitičke aktivnosti enzima Rubisco pod uticajem svetlosti, to su: molekuli CO_2 (različiti CO_2 molekuli imaju ulogu supstrata i aktivatora enzima) i enzim Rubisco-aktivaza.

Da bi funkcionisao, Rubisco mora da prođe proces aktivacije koji podrazumeva:

- vezivanje CO_2 (i Mg^{2+}) za amino-kiselinu lizin velikih proteinskih subjedinica (L) i
- aktivnost enzima Rubisco-aktivaze.

Molekuli CO_2 imaju dvostruku ulogu kada se govori o aktivnosti enzima Rubisco. Oni transformišu enzim iz neaktivne u aktivnu formu (aktivacija) i predstavljaju supstrat za karboksilaciju (kataliza). Opšti mehanizam aktivacije Rubisco enzima pod uticajem svetlosti (apsorpcijom fotona) je:

- promena u kovalentnim vezama proteinskih subjedinica Rubisco, što rezultira hemijskom modifikacijom enzima: dolazi do karbamilacije amino-grupa u proteinu i posledično, promene u njegovoj enzimskoj aktivnosti:

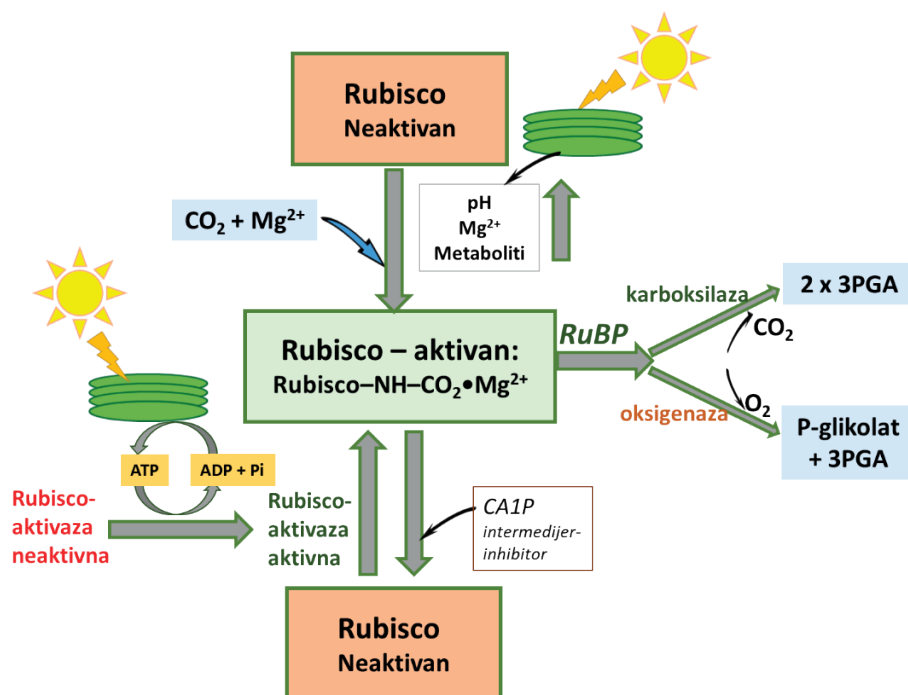
$\text{Rubisco-NH}_2 + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{Rubisco-NH-CO}_2^- + \text{H}^+$, ili pak, može doći do redukcije disulfidnih veza enzima;

- nekovalentne modifikacije, kao što je promena pH i koncentracije jona (Mg^{2+}) u ćeliji/hloroplastu, vezivanje enzima i regulatornih proteina u super-molekulske komplekse i sl.

Treba napomenuti da se CO_2 vezan kao karbamat razlikuje od CO_2 koji je supstrat reakcije karboksilacije Rubisco enzima.

Rubisco je aktivan samo kada NH_2 grupa amino-kiseline *lizina* iz L-subjedinica enzima reaguje sa CO_2 i formi-

ra amid ugljene kiseline (liliz-karbamat: Rubisco-NH-CO_2). Karbamilacija dovodi do konformacionih promena proteina velikih subjedinica enzima (L), a nastala katalitički aktivna forma enzima Rubisco se stabilizuje formiranjem kompleksa sa Mg^{2+} : $\text{Rubisco-NH-CO}_2 \text{Mg}^{2+}$ (**Sl.1.49**).



Sl. 1.49. Rubisco se aktivira na svetlosti preko dva procesa:

1. Neaktivni Rubisco reaguje sa CO_2 i formira karbamat, stabilizuje se pomoću Mg^{2+} i postaje aktivan (funkcioniše i kao karboksilaza i kao oksigenaza).
2. Enzim rubisco aktivaza, koja se aktivira na svetlosti preko ATP-a, oslobađa blokirana katalitička mesta enzima Rubisco pentoza fosfatima – RuBP i intermedijerima Kalvin-Benson-ovog ciklusa (analozima RuBP, npr. Karboksirabinitol- 1-fosfatom (CA1P)).

Enzim Rubisco-aktivaza (označava se najčešće – **Rca**) energiju ATP koristi za stvaranje konformacionih promena enzima Rubisco, čime se redukuje njegov afinitet za čvrsto vezivanje inhibitora (primarno, pentoza-fosfata). Naime, nekarbamilovani, neaktivni oblik Rubisco ima veliki afinitet prema pentoza-fosfatima i veoma čvrsto vezuje RuBP i analoge, što dovodi do inhibicije samog enzima. Prevrneno vezivanje supstrata (RuBP) za Rubisco dovodi do deaktivacije enzima. Rubisco-aktivaza uz utrošak ATP-a, oslobađa (čvrsto) prevremeno vezani RuBP i druge inhibitore (CA1P i dr.) i na taj način omogućava karbamilaciju / aktivaciju slobodnog („oslobođenog“) enzima Rubisco. Stoga enzim Rubisco aktivaza povezuje hidrolizu ATP-a sa strukturnim remodelovanjem Rubisco-a.

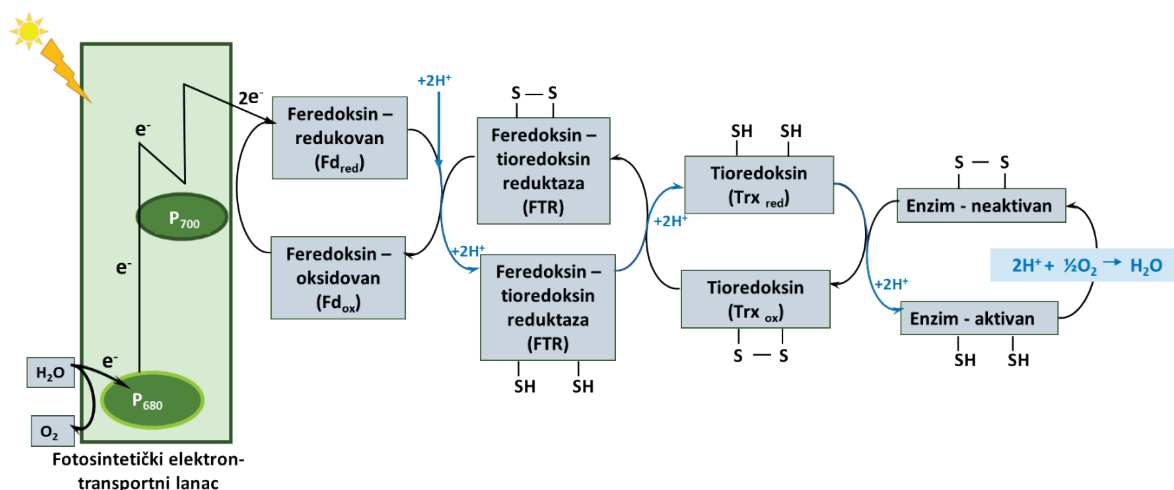
Enzim Rca je enzim-protein hloroplasta koji je neophodan za svetlosnu aktivaciju ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze *in vivo* u periodu indukcije fotosinteze kada biljka izlazi iz perioda mraka. U većini biljaka koje su do sada ispitane, postoje dve izoforme Rca koje se razlikuju samo na karboksilnom kraju proteina: dugačka forma- α (46 kDa) i kratka forma- β (42 kDa). Enzim RCA može se smatrati i proteinom šaperonom.

1.5.2.1.2.2. Katalitička aktivnost nekih enzima Kalvin-Bensonovog ciklusa regulisana je direktno svetlošću, preko feredoksin- tioredoksin sistema (Fd/Trx sistema)

Danas se sa sigurnošću zna da je katalitička aktivnost enzima Kalvin-Bensonovog ciklusa: Rubisco, Fruktosa-1,6-bisfosfataza, Sedoheptuloza-1,7-bisfosfataza, Ribuloza-5-fosfat kinaza (Fosforibonukleaza), Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (NADP-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza), regulisana svetlošću i to

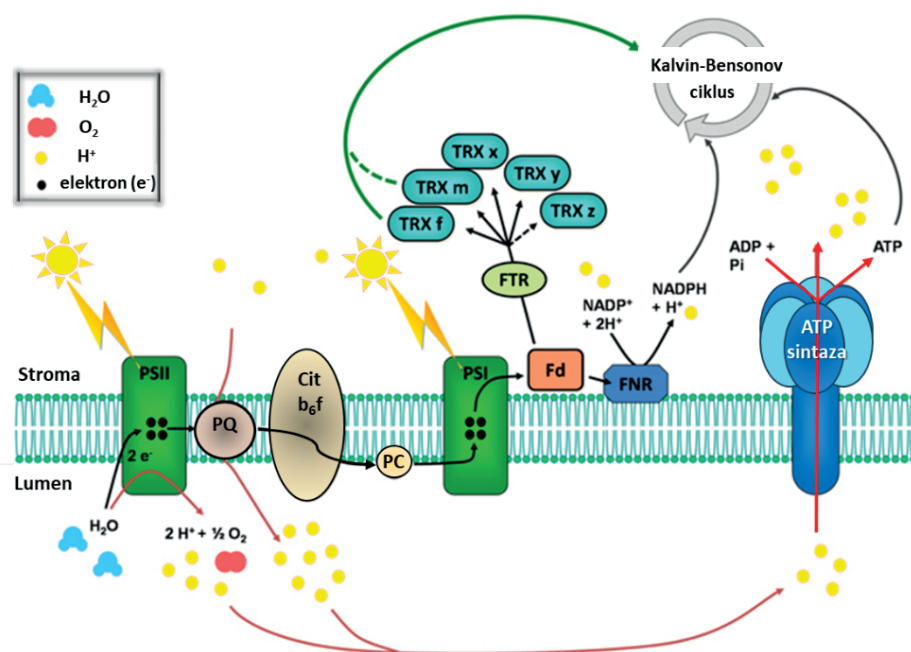
direktno, preko feredoksin / tioredoksin (Fd/Trx) sistema. Proteini: Feredoksin (Fd), Feredoksin-tioredoksin-reduktaza (FTR) i Tioredoksin (Trx) čine važan regulatorni kompleks, koji se naziva Fdx/Trx sistem. To je redoks-aktivna proteinska kaskada koja prenosi protone (redukcione ekvivalente- NADH, NADPH) na različite proteine-enzime (njihove redoks-aktivne cisteinske (Cis) ostatke), čime se modifikuje metabolizam. Kako je feredoksin (Fd) terminalni akceptor elektrona fotosintetskog transportnog lanca svetle faze fotosinteze, on je ključan za dalju distribuciju elektrona tokom različitih oksido-redukcionih procesa.

Aktivacija enzima Calvin-Benson-ovog ciklusa počinje apsorpcijom fotona i redukcijom feredoksina (Fd) kao terminalnog akceptora elektrona u elektron-transportnom lancu. Redukovani feredoksin zbog viška elektrona, uzima dva protona za redukciju katalitički aktivnih disulfidnih veza ($-S-S-$) enzima feredoksin-tioredoksin reduktaze (Fd/Trx reduktaza, FTR). Enzim FTR je gvožđe – sumpor $[4Fe-4S]$ protein (EC 1.8.7.2, sistematskog naziva: feredoksin:tioredoksin-disulfid-oksido-reduktaza) i predstavlja centralnu komponentu ove redoks-enzimske kaskade, koja prikuplja elektrone i prenosi ih sa Fd do malog regulatornog proteina tioredoksina (Trx), različitih podtipova (Trx: f-, m-, x-, y-, z-tip). Redukcija Trx podrazumeva prihvatanje dva elektrona sa FTR, posledično privlačenje dva protona ($2H^+$) i konverziju disulfidnih veza ($-S-S-$) u tiolne ($-SH$). Redukovani Trx, svoju aktivnost ispoljava tako što aktivira specifične enzime cepajući njihove disulfidne veze na oksidovanim cisteinima i formirajući na taj način, slobodne (redukovane) cisteine (**Sl. 1.50**).



Sl. 1.50. Feredoksin- tioredoksin sistem (Fd/Trx sistem): deo redukovanog feredoksina služi kao donor elektrona feredoksin-tioredoksin reduktazi (FTR), čiji se disulfidni most redukuje i podleže tiol-disulfidnoj razmeni sa oksidovanim tioredoksinom (Trx_{ox}). Redukovani tioredoksin (Trx_{red}) može redukovati disulfide nekoliko ciljnih enzima, od kojih je većina slabo aktivna ili neaktivna u oksidovanom obliku.

Fd/Trx sistem predstavlja važan signalni put svetlosne regulacije hloroplastnih enzima. To je enzimska, oksido-redukciona kaskada u kojoj dolazi do razmene elektrona/protona između tiol (SH) i disulfidnih ($S-S$) grupa amino-kiselina u proteinima, što menja redukcionu status enzima hloroplasta i utiče na njihova katalitička svojstva (aktivira ih ili inaktivira) (**Sl. 1.51**).



Sl. 1.51. Mehanizam prenosa signala za aktivaciju enzima Calvin-Bensonovog ciklusa preko Feredoksin-zavisnog (Fd) sistema redukcije tioredoksina (Trx).

Feredoksin-tioredoksin sistem (Fd/Trx sistem) funkcionalno povezuje svetlosni signal sa aktivnošću enzima u stromi hloroplasta (svetlosnu i tamnu fazu fotosinteze): nakon ekscitacije u reakcionom centru, hlorofil šalje elektron u elektron-transportni lanac do konačnog akceptora na stromalnoj strani tilakoida – feredoksina (Fd) koji uz pomoć enzima Fd/Trx reduktaze (FTR) redukuje hloroplastni tioredoksin (Trx- f-, m-, -x-, -y-, -z i dr.) i NADP+ uz katalitičko dejstvo enzima Feredoxin NADP-reduktaze (FNR). Adaptirano prema Michelet i sar., (2013). Elektronski izvori slika, str. 101.

Feredoksin/tioredoksin reduktaza (FTR) i tioredoksin (Trx) utiču na potrošnju NADPH, što dovodi do promene odnosa NADPH/NADP+ i promene količine nagomilanog NADP+ koji je ključni nosač elektrona za širok spektar redoks reakcija, uključujući fotosintezu. Kako je hloroplastni redoks status zavisen od količine NADPH i NADP+, odnosno njihovog međusobnog koncentracijskog odnosa (NADPH prema NADP+), feredoksin- tioredoksin sistem (Fd/Trx) omogućava biljkama da promene svoj metabolizam na osnovu intenziteta svetlosti. Konkretno, Fd/Trx sistem koji preko redoks statusa hloroplasta kontroliše aktivnost enzima Calvin-Bensonovog ciklusa omogućava biljkama da uravnoteže sintezu i razgradnju ugljenih hidrata na osnovu dostupnosti svetlosti. Na svetlosti redukovani Fd (Fd-) aktivira biosintezu ugljenih hidrata, dok u mraku, Fd ostaje oksidovan, što ostavlja Trx neaktivnim i dovodi do razgradnje ugljenih hidrata.

Biljke poseduju ne samo Fd/Trx sistem plastida, već i ranije poznati NADP/Trx sistem u citosolu, endoplazmatskom retikulumu i mitohondrijama, a do sada je otkriveno najmanje 19 tipova Trx, od čega, devet u hloroplastima. Istraživanja pokazuju da je veliki broj fizioloških procesa biljaka regulisan aktivacijom/inaktivacijom enzima preko redoks-enzimskih kaskada – promenom tiol (SH) i disulfidnih (S-S) veza gde Trx ima ključnu ulogu. Ovaj mehanizam je posebno rasprostranjen u biljkama, gde je do sada identifikovano oko 200 proteina, čija je aktivacija uslovljena sa Trx, kao što su npr. enzimi u amiloplastima koji omogućuju sintezu skroba i enzimi koji se aktiviraju kod klijanja semena (amilaze i dr.).

1.5.2.1.2.3. Svetlošću indukovano kretanje jona kroz tilakoidne membrane i promena pH strome hloroplasta utiče na katalitičku aktivnost enzima Calvin-Benson-ovog ciklusa

Kada se govori o svetlosnoj aktivaciji i regulaciji enzima Calvin-Bensonovog ciklusa mora se pomenuti i uticaj protonskog (H⁺) fluksa iz strome hloroplasta u lumen tilakoida, što je povezano sa antiportom jona Mg²⁺

iz lumena tilakoida (intratilakoidnog prostora) u stromu hloroplasta. Ovakav jonski fluks koji je iniciran apsorpcijom svetlosti i transportom elektrona, dovodi do povećanja pH strome hloroplasta i povećanja aktivnosti enzima koji zahtevaju Mg^{2+} (i pH oko 8) za svoju katalitičku aktivnost, a to su: Rubisco, fruktoza-1,6-bisfosfat, sedoheptuloza-1,7-bisfosfat i ribuloza-5-fosfat kinaza (fosforibonukleaza).

1.5.3. Fotorespiracija: C_2 – oksidativni fotosintetički put ugljenika/ C_2 -ciklus

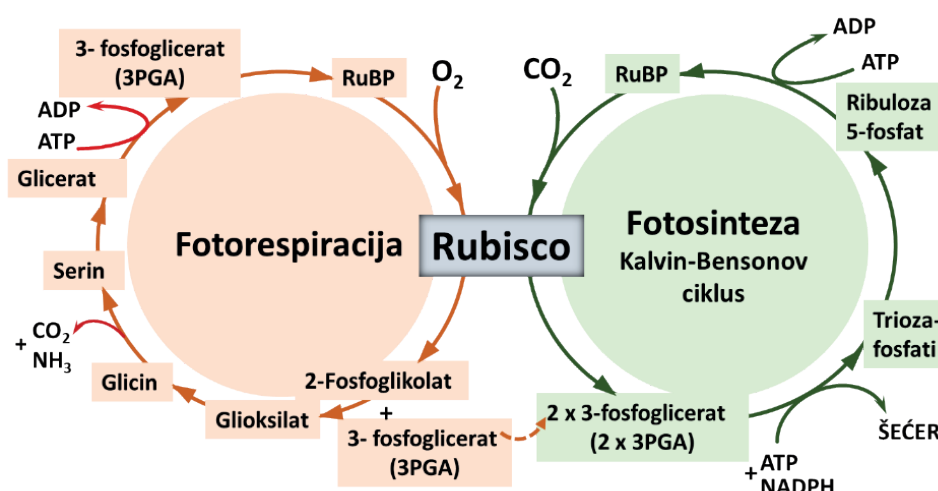
U hloroplastima C_3 -biljaka u uslovima velike osvetljenosti, parcijalni pritisak O_2 se povećava, dok se istovremeno parcijalni atmosferski pritisak CO_2 smanjuje. Tada enzim RuBP-karboksilaza (Rubisco) pretežno ima oksigenaznu aktivnost. To dovodi do oksigenacije RuBP i iniciranja procesa fotorespiracije, tj. usvajanja kiseonika i izdvajanja ugljen-dioksida na svetlosti, te otuda i naziv ovog metaboličkog procesa, fotorespiracija, sugerise da je u pitanju ćelijsko disanje stimulirano svetlošću. Otkrili su ga istraživači Diker i Tio (engl. Dicker i Tio) 1959. godine, registrujući povećanje intenziteta disanja zelenih listova C_3 biljaka (veće oslobađanje CO_2) na svetlosti nego u mraku u uslovima nižih koncentracija CO_2 i istovremeno, većih koncentracija O_2 u okolnoj atmosferi. Termin „fotorespiracija“ uveden je u nauku 1963. godine od strane naučnika Krotkov-a, a suština ovog metaboličkog procesa je da u uslovima niskog parcijalnog pritiska CO_2 i istovremeno, visokog parcijalnog pritiska O_2 , enzim Rubisco ima više oksigenaznu aktivnost i katališe usvajanje O_2 i njegovo vezivanje za RuBP (umesto usvajanje CO_2 i karboksilaciju RuBP).

Rubisco je enzim koji ima nezamenljivu katalitičku ulogu u fotosintetičkoj asimilaciji CO_2 , odnosno, u karboksilaciji, ali važno njegovo svojstvo je takođe i sposobnost da katalizuje i oksigenaciju RuBP u procesu definisanom kao *fotorespiracija*. Zbog toga se ovaj enzim označava kao Ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaza/ oksigenaza (Rubisco/RuBisCO; EC 4.1.1.39). Karboksilacijom RuBP nastaju dva molekula 3-fosfoglicerinske kiseline (fosfoglicerata, 3PGA), dok oksigenacijom nastaje jedan molekul 3-fosfoglicerinske kiseline (3PGA) i jedan molekul 2-fosfoglikolatač istovremeno se oslobađa CO_2 (u mitohondrijama):



Zbog toga što primarni produkt oksigenacije, fosfoglikolat ima 2C-atoma, ovaj ciklus se naziva i C_2 -oksidativni fotosintetski ciklus ugljenika.

Zanimljivo, C_2 -oksidativni fotosintetski ciklus ugljenika i C_3 reduktivni fotosintetski ciklus ugljenika koegzistiraju u biljnim ćelijama i oba ova metabolička puta su pokrenuta od strane enzima Rubisco, ali teku dijametralno suprotno (**Sl. 1.52**).



Sl. 1.52. C_2 -oksidativni fotosintetski ciklus ugljenika i C_3 -reduktivni fotosintetski ciklus ugljenika ne teku odvojeno, već koegzistiraju u biljnim ćelijama. Oba metabolička puta su katalisana enzimom Rubisco, koji funkcioniše kao karboksilaza (u fotosintezi – stroma hloroplasta), ili kao oksigenaza (u fotorespiraciji – stroma hloroplasta, peroksizomi, mitohondrije).

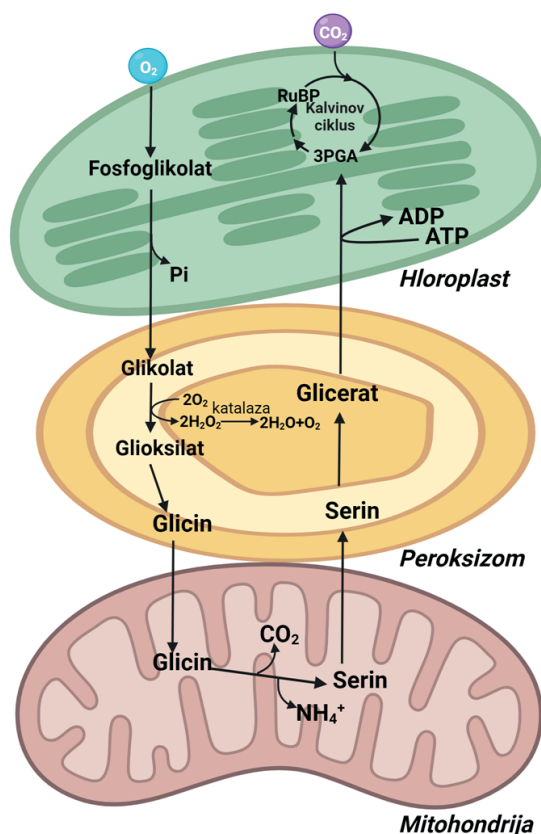
Fotorespiratorni metabolički put se pokreće oksigenacijom RuBP u stromi hloroplasta uz katalizu enzima Rubisko-oksigenaza, a nastali primarni intermedijer, 2-fosfoglikolat, se dalje metaboliše u peroksizomima, potom u mitohondrijama i ponovo u stromi hloroplasta, pri čemu dolazi do dekarboksilacije (gubitak CO_2) i deaminacije (gubitak NH_3 (NH_4^+)). Oksigenacija RuBP dovodi do gubitka ugljenika koji bi inače bio iskorišćen u Calvin-Bensonovom ciklusu za sintezu trioza-fosfata, dok istovremeno, nastali produkt oksigenacije, 2-fosfoglikolat inhibira dva hloroplastna enzima: trioza-fosfat izomerazu i fosfoglicerat kinazu (fosfofrukto kinazu).

Fiziološki smisao i značaj fotorespiracije za metabolizam biljaka:

Da bi biljka izbegla inhibiciju enzima i značajan gubitak ugljenika za Calvin-Benson-ov ciklus, u uslovima niske međućelijske koncentracije CO_2 /visokog parcijalnog pritiska O_2 (kada su CO_2 i O_2 kompetitori za aktivaciju Rubisco), oksigenacija RuBP i C_2 -oksidativni fotosintetski put ugljenika omogućava da se i u nedostatku unutarćelijskog CO_2 sačuva veći deo trioza-fosfata (PGA) za normalno funkcionisanje Calvin-Bensonovog ciklusa. Takođe, i pored toga što se u procesu troši energija (ATP i NADPH), fotorespiracija ima veliki značaj za sinhronizaciju svetle i tamne faze fotosinteze, posebno za prevenciju blokade elektrona i protona na plasto-hinonu (PQ), odnosno, za sprečavanje njegove prevelike redukcije u uslovima limitiranog CO_2 u biljnim ćelijama. Zaštitna uloga fotorespiracije može biti posebno važna u uslovima stresa kao što je suša, kada se stome listova zatvaraju na svetlosti kako bi se sprečio prekomerni gubitak vode.

Fotorespiracija je naročito izražena kod biljaka koje dominantno imaju C_3 -tip fotosinteze (tzv. C_3 -biljke), jer su one evolutivno adaptirane na višu CO_2 -kompenzacionu tačku u odnosu na C_4 -biljke (tropske biljke, visoke organske produkcije; o čemu će biti više reči kasnije). Zbog toga se biljke i mogu podeliti u dve grupe: one koje imaju fotorespiraciju (C_3 -biljke) i bez fotorespiracije (C_4 -biljke).

Fotorespiracija/ C_2 -oksidativni fotosintetski put ugljenika se dešava se **u hloroplastima, peroksizomima i mitohondrijama** fotosintetskih ćelija (Sl. 1.53).



Sl. 1.53. Mehanizam C_2 - oksidativnog fotosintetskog ciklusa ugljenika: funkcionalna povezanost hloroplasta, peroksizoma i mitohondrija i glavni intermedijeri ciklusa. Kreirano u: BioRender-u. Pajević, S. (2025); Elektronski izvori slika, str. 101.

Proces fotorespiracije je enzimski kontrolisan i odvija se u tri funkcionalno povezane organele: hloroplastima, peroksizomima i mitohondrijama. Bliska pozicija ove tri organele u ćeliji ukazuje na intenzivan proces fotorespiracije, odnosno, povezanost biohemijskih reakcija u njima (Tabela 1.5).

U hloroplastima (reakcije 1 i 2), enzim Rubisko-oksigenaza katališe asimilaciju O_2 i nastanak dva molekula fosfoglikolata i dva molekula fosfoglicerata. Aktivnošću enzima fosfoglikolat fosfataze nastaju dva molekula glikolata i dva molekula neorganskog fosfata.

Dva molekula glikolata, istovremeno sa dva molekula glutamata, odlaze u peroksizome.

U peroksizomima (reakcije 3, 4 i 5) se glikolat oksiduje sa O_2 aktivnošću enzima glikolat oksidaze, a nastali peroksid se neutrališe enzimom katalazom. Glutamat-glioksilat aminotransferaza je enzim u peroksizomima koji katališe prevođenje nastalog gliksilata i glutamata u glicin i oksoglutarat.

Amino-kiselina glicin potom iz peroksizoma odlazi u mitohondrije.

U mitohondrijama (reakcije 6 i 7), katalitičkim dejstvom enzima glicin-dekarboksilaza-kompleksa, kao i hidroksimetil-transferaza-kompleksa od dva molekula glicina (ukupno 4-C atoma), dekarboksilacijom i deaminacijom (oslobađanjem CO_2 i NH_4^+), nastaje amino-kiselina serin (3-C atoma), koja se ponovo transportuje u peroksizome.

U peroksizomima (reakcije 8 i 9) se serin transformiše u 3-C amino-kiselinu – glicerat, uz katalitičko dejstvo enzima serin-2-oksoglutarat aminotransferaze i hidroksipiruvat reduktaze. Glicerat i 2-oksoglutarat iz peroksizoma, uz NH_4^+ iz mitohondrija vraćaju se u hloroplaste kao supstrat za regeneraciju trioza fosfata i amino-kiselina.

U hloroplastima se, na kraju fotorespiratornog ciklusa (reakcije 10, 11 i 12), glicerat fosforiliše u 3-fosfoglicerat (3PGA) i ulazi u Kalvin-Bensonov ciklus, a u stromi hloroplasta se izgubljeni glutamat (izgubljeni azot, na početku ciklusa) nadoknađuje u sintezi glutamina katalitičkim dejstvom enzima glutamin-sintaze, da bi potom glutamin i eksportovani oksoglutarat iz peroksizoma uz pomoć enzimskog kompleksa feredoksin-zavisne glutamat-sintaze (GOGAT) napravili 2 molekula amino-kiseline glutamata.

Tabela. 1.5. C_2 -oksidativni fotosintetski ciklus ugljenika. Funkcionalna povezanost hloroplasta, peroksizoma i mitohondrija i glavni intermedijeri ciklusa – reakcije i enzimi.

Enzimi:	Reakcije:	U ćelijskoj organeli:
<i>Rubisco</i>	1. Ribuloza 1,5-bisfosfat + 2 O ₂ → 2 x 2-Fosfoglikolat + 2 x 3-Fosfoglicerat	Hloroplast
<i>Fosfoglikolat fosfataza</i>	2. 2 x 2-Fosfoglikolat + 2 H ₂ O → 2 x Glikolat + 2 P _i	
<i>Glikolat oksidaza</i>	3. Glikolat + 2 O ₂ → 2 x Glioksilat + 2 H ₂ O ₂	
<i>Katalaza</i>	4. 2 H ₂ O ₂ → 2 H ₂ O + O ₂	Peroksizom
<i>Glutamat-glioksilat aminotransferaza</i>	5. 2 x Glioksilat + 2 x Glutamat → 2 x Glicin + 2 x 2-Oksoglutarat	
<i>Glicin-dekarboksilaza kompleks (GDC)</i>	6. Glicin + NAD ⁺ + [GDC] → CO ₂ + NH ₄ ⁺ + NADH + [GDC – THF – CH ₂]	
<i>Serin-hidroksimetil transferaza</i>	7. [GDC – THF – CH ₂] + Glicin + H ₂ O → Serin + [GDC]	Mitohondrija
<i>Serin-2-oksoglutarat amino-transferaza</i>	8. Serin + 2-Oksoglutarat → Hidroksipiruvat + Glutamat	Peroksizom
<i>Hidroksipiruvat reduktaza</i>	9. Hidroksipiruvat + NADH + H ⁺ → Glicerat + NAD ⁺	
<i>Glicerat kinaza</i>	10. Glicerat + ATP → 3-Fosfoglicerat + ADP	
<i>Glutamin sintetaza</i>	11. Glutamat + NH ₄ ⁺ + ATP → Glutamin + ADP + P _i	Hloroplast
<i>Feredoksin-zavisna glutamat-sintaza (GOGAT)</i>	12. 2-Oksoglutarat + Glutamin + 2 x Feredoksin (redukovani) + 2 H ⁺ → 2 x Glutamat + 2 x Feredoksin (oksidovani)	

1.5.4. Tamne reakcije fotosinteze – Kalvin-Bensonov ciklus: C_4 i CAM karbonski ciklusi (C_4 i CAM fotosinteza)

Difuzija CO₂ iz atmosfere kroz stome u hloroplast, aktiviranje enzima Rubisco, te vezivanje ugljenika za pentozu je od ključne važnosti za neto fotosintetičku produkciju. Stoga su ekološki činioci, pre svega sadržaj vode u ćelijama i koncentracije (parcijalni pritisci) CO₂ i O₂ u atmosferi, glavni činioci koji utiču na strukturne i fiziološke adaptacije biljaka. Kopnene biljke su evolutivno razvile dva glavna fotosintetička mehanizma adaptacije u uslovima niskih koncentracija CO₂ (i istovremeno, većih koncentracija O₂) kada je neophodno obezbediti dovoljno CO₂ za aktivaciju enzima Rubisco, kako bi funkcionisao kao karboksilaza, umesto kao Rubisco-oksigenaza (što će voditi ka fotorespiraciji):

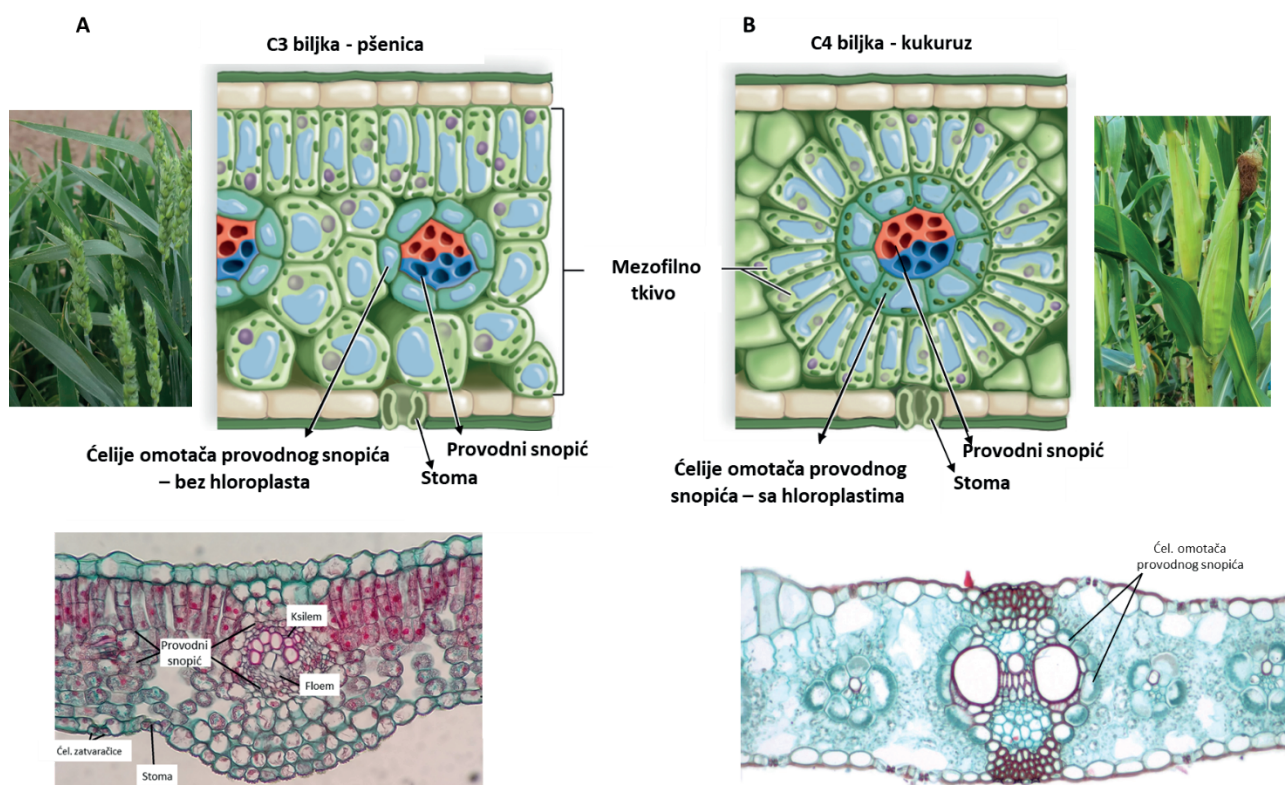
- C_4 put fotosintetičke fiksacije ugljenika (C_4) i
- CAM put fotosintetičke fiksacije ugljenika (engl. *Crasulaceae acid metabolism*)

Usvajanje CO₂ navedenim metaboličkim putevima obezbeđuje koncentrovanje dostupnog ugljenika u ćelijama omotača provodnih sudova (gde je lociran enzim Rubisco), u uslovima kada je njegov sadržaj u atmosferi smanjen i stoga predstavlja adaptaciju na smanjenje dostupnog CO₂ za fotosintetičke potrebe.

1.5.4.1. C_4 -ciklus ugljenika (C_4 -fotosinteza)

U odnosu na C_3 biljke C_4 biljke imaju specifičnu fotosintezu jer fiksiraju ugljenik u jedinjenja sa četiri ugljenika u mezofilnim ćelijama, pre nego što se isti iskoristi u ćelijama omotača provodnih snopića za karboksilaciju RuBP prve faze Kalvin-Bensonovog ciklusa.

Na temelju rezultata istraživanja koje su krajem 50-ih i početkom 60-ih godina XX veka sprovodili naučnici Hugo Peter Kortschak i Yuri Karpilov prateći metabolički put radioaktivnog izotopa ugljenika ^{14}C , australijski naučnici M.D. Hatch i C.R. Slack su krajem 60-ih godina, predložili model za C_4 put kao alternativni put karboksilacije u odnosu na Calvin-Bensonov ciklus (C_3 tip). Eksperimenti u kojima su biljke kukuruza (*Zea mais*) i šećerne trske (*Saccharum officinarum*) izlagane atmosferi sa $^{14}\text{CO}_2$ otkrili su da su jedinjenja sa četiri ugljenika: malat (jabučna kiselina – organska kiselina), odnosno, aspartat (asparaginska kiselina – amino-kiselina), među najranijim obeleženim proizvodima karboksilacije. Specifičnost C_4 karbonskog ciklusa je primarno vezivanje CO_2 u jedinjenje sa četiri ugljenika, zatim njegova dekarboksilacija i ponovo fiksiranje u jedinjenje sa tri ugljenika (Hatch, M.D, Slack, C.R. 1966; Slack, C.R., Hatch, M.D. 1967; Hatch, M.D. 2002). Ovi metabolički koraci definišu suštinu C_4 -fotosintetičkog puta i predstavljaju naučnu potvrdu da C_3 metabolički put ugljenika (Kalvin-Bensonov put) nije jedini i isključivi tip karboksilacije i sinteze organske materije u tamnoj fazi fotosinteze. Nakon ovog otkrića, dalja napredna istraživanja u oblasti biljne anatomije, fiziologije, biohemije i molekularne biologije doprinela su izuzetnim otkrićima da je C_4 fotosintetički put metabolički podeljen u dva morfološki različita tipa ćelija u listu i da uključuje nekoliko osnovnih biohemijskih faza. Listove C_4 biljaka karakteriše anatomija tipa *Kranz*, za koju je karakteristično da je provodni snopić (vaskularno tkivo) okružen sa najčešće dva sloja ćelija omotača. Sloj ćelija omotača provodnih snopića je dalje okružen radijalno raspoređenim ćelijama mezofila (**Sl. 1.54**).



Sl. 1.54. Morfološke i anatomske razlike između C_3 (A) i C_4 (B) biljaka Elektronski izvori slika, str. 101.

Ćelije omotača provodnih snopića imaju izražene hloroplaste koji u unutrašnjoj strukturi nemaju tilakoidni sistem podeljen u dva odeljka (grana tilakoidi i stroma tilakoidi), već *sadrže samo tilakoide strome*, kao i skrobna zrna. Stoga su ovakvi hloroplasti, koji se nalaze u ćelijama omotača provodnih sudova, *agranalni hloroplasti* i razlikuju se od onih u ćelijama mezofila sa granalnim hloroplastima. Ova specifičnost u strukturi hloroplasta ukazuje na različitu funkciju mezofilnih ćelija i ćelija omotača provodnih sudova u C_4 -fotosintetičkom metabolizmu:

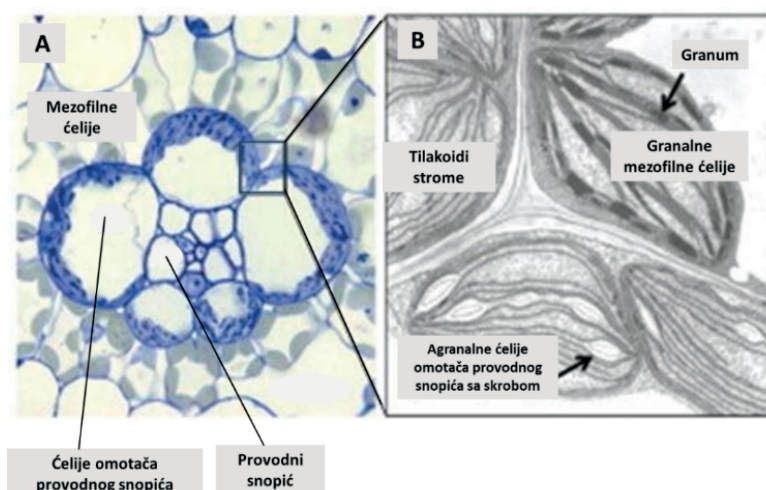
- mezofilne ćelije sa granalnim hloroplastima imaju fiziološku ulogu „dobavljača“ CO_2 za karboksilaciju (Kalvin-Bensonov ciklus);
- ćelije omotača provodnih snopića sa agranalnim hloroplastima „sakupljaju“ CO_2 za nesmetano odvijanje Kalvin-Bensonovog ciklusa u njima (**Sl. 1.54B**).

Specifična anatomija omogućava C_4 -biljkama da se u cilindru koji grade ćelije omotača provodnih sudova koncentriše CO_2 i da se karboksilacija (tamna faza fotosinteze) dešava i kada je relativno nizak parcijalni pritisak CO_2 , što su uslovi koji u C_3 -biljkama dovode do pojave fotorespiracije i gubitka C koji bi bio iskorišten za asimilaciju. Stoga C_4 fotosinteza kod biljaka sa Kranz - anatomijom rezultira višom organskom produkcijom u odnosu na C_3 -biljke. Neke od biljnih vrsta, pre svega iz porodice trava (fam. Poaceae) sa relativno visokom organskom produkcijom, kao što su kukuruz, šećerna trska, sirak i sl. (**Sl. 1.55**), koriste C_4 metabolički put ugljenika za povećanje katalitičkog kapaciteta enzima Rubisco. Biljke sa C_4 fotosintetičkim putem su bolje prilagođene i pokazuju veću fotosintetičku produktivnost u okruženju sa visokim dnevnim temperaturama, intenzivnom sunčevom svetlošću, malim parcijalnim pritiskom CO_2 , kao i ograničenim sadržajem azota i vode.



Sl. 1.55. Neke od tipičnih C_4 biljaka: kukuruz (*Zea mays* L.), sirak (*Sorghum* sp. L.), štir (*Amaranthus retroflexus* L.). Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 101.

Stoga, C_4 -fotosinteza je morfo-anatomskim i fiziološkim adaptacijama, pre svega, razdvajanjem mesta asimilacije CO_2 za fotosintetičke potrebe (mezofil) i karboksilacije RuBP (ćelije omotača provodnih snopića) omogućila bolje iskorištavanje CO_2 za stvaranje organske materije, čime su C_4 -biljke zbog veće produktivnosti, postale invazivne i dominantne na staništima sa tropskom i subtropskom klimom (male do srednjih geografskih širina). Smatra se da su biljke sa C_4 -fotosintezom evolutivno nastale iz C_3 -biljaka strukturno-fiziološkim adaptacijama na ekološke pritiske, pre svega nedostatak CO_2 i kompetitorski efekat povećanog parcijalnog pritiska O_2 za vezivanje na Rubisco. Evolucija C_4 -fotosinteze iz C_3 eliminiše RuBP- karboksilaciju u hloroplastima mezofilnih ćelija i istovremeno aktivira PEP – karboksilaciju u citosolu mezofilnih ćelija, što dovodi do smanjenja broja i veličine hloroplasta u mezofilnim ćelijama. Istovremeno, agranalni hloroplasti u ćelijama omotača provodnih snopića su većih dimenzija i centripetalno raspoređeni u ćeliji. Ova strukturna dihotomost hloroplasta predstavlja evolutivnu adaptaciju na različite uloge u procesu fotosinteze: hloroplasti mezofilnih ćelija imaju dominantno ulogu u svetlim reakcijama fotosinteze, dok su hloroplasti u ćelijama omotača provodnih sudova evolutivno adaptirani na povećanje efikasnosti fiksacije CO_2 i sintezu organske materije (tamna faza fotosinteze) (**Sl. 1.56**).



Sl. 1.56. Dva različita tipa hloroplasta u ćelijama C_4 -biljaka: **granalni** hloroplasti u mezofilnim ćelijama i **agranalni** hloroplasti u ćelijama omotača provodnog snopića. Adaptirano prema: Majeran i van Wijk (2009). Elektronski izvori slika, str. 102.

Opšte karakteristike C_4 -fotosinteze:

Fosfoenol-piruvat (fosfoenol pirogroždana kiselina, PEP) je jedinjenje sa tri C atoma koje se smatra primarnim supstratom za vezivanje atmosferskog CO_2 i koje će nakon karboksilacije dati jedinjenje sa četiri C atoma. Usvojeni CO_2 je na raspolaganju ćeliji za karboksilaciju u tamnoj fazi fotosinteze u formi bikarbonatnog anjona (HCO_3^-). *Karbonska anhidraza* (EC 4.2.1.1) je CO_2 – indukovani rastvorljivi enzim, koji katalizuje reakciju reverzibilne hidratacije CO_2 u HCO_3^- i ima veliki značaj za regulaciju ćelijske pH vrednosti.

Nakon što CO_2 (HCO_3^-) uđe kroz stome u mezofilne ćelije, enzim *fosfoenol-piruvat karboksilaza* (PEP-karboksilaza; EC 4.1.1.38) katališe inicijalnu karboksilaciju fosfoenol-piruvata (PEP, C_3) u oksal-sirćetnu kiselinu (eng. oxalacetic acid, OAA, C_4) u mezofilnim ćelijama koje su preko stoma u bliskom kontaktu sa eksternom atmosferom. Specifičnost C_4 -ciklusa je što PEP-karboksilaza ima visoku efikasnost vezivanja HCO_3^- , te stoga i u uslovima niskih koncentracija CO_2 , odnosno, visokih koncentracija O_2 nema kompeticije između CO_2 i O_2 , što kod C_3 biljaka uslovljava pojavu fotorespiracije (Rubisco postaje oksigenaza).

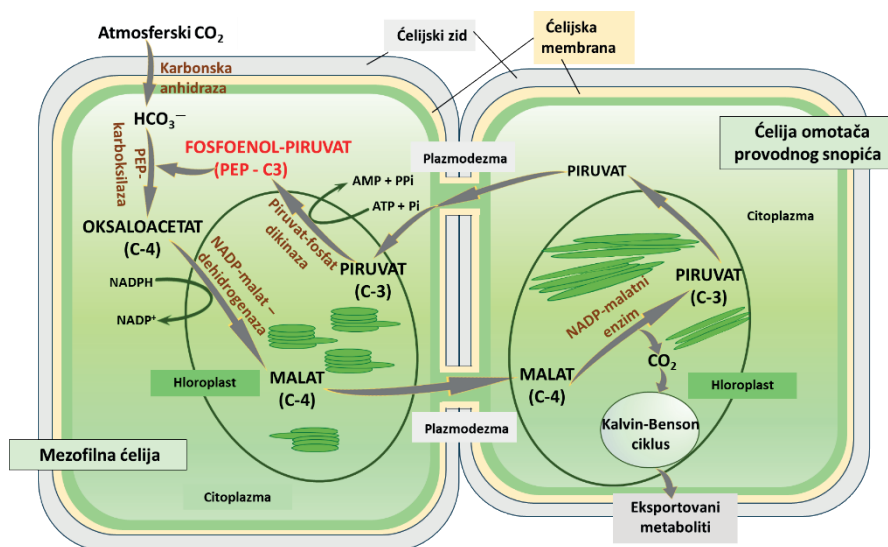
Organske, C_4 -kiseline, imaju bitnu ulogu intermedijera u fotosintetskom C_4 ciklusu: *oksaloacetat* (OAA), *malat* i *aspartat* (Asp) su supstrati/intermedijeri koji obezbeđuju koncentrovanje CO_2 u ćelijama omotača provodnih sudova. Zapravo, OAA je neposredan, kratkotrajan proizvod inicijalnog procesa fiksacije CO_2 u ćelijama mezofila. Malat i aspartat, koji su rezultat brzog prevođenja OAA, su organske kiseline koje se transportuju u ćelije omotača provodnih snopića lista gde se dekarboksilišu, a oslobođeni CO_2 se koristi za karboksilaciju u Calvin-Bensonovom ciklusu i proizvodnju pimarne organske materije. Nakon dekarboksilacije, jedinjenja sa tri ugljenika vraćaju se u ćelije mezofila gde se koriste za regeneraciju akceptora CO_2 , a to je PEP.

Transformacija OAA koja nastaje nakon inicijalne karboksilacije PEP, te reakcija dekarboksilacije – oslobađanja CO_2 za potrebe Calvin-Bensonovog ciklusa može se biohemijski opisati kroz dva podtipa C_4 -fotosintetičkog ciklusa, to su: malatni podtip i aspartatni podtip.

Za oba biohemijska puta je karakteristično da se u ćelijama mezofila, bikarbonatni jon (HCO_3^-) koji je nastao hidratacijom atmosferskog CO_2 , katalitičkim delovanjem enzima *karbonske anhidraze* koristi za karboksilaciju fosfoenol-piruvata (PEP) uz pomoć enzima *fosfoenol-piruvat karboksilaze*. Nakon toga, nastali oksaloacetat (OAA), se u C_4 – *Malatnom podtipu* (C_4 -NADP-malatno-enzimski podtip) (**Sl. 1.57**) redukuje u malat

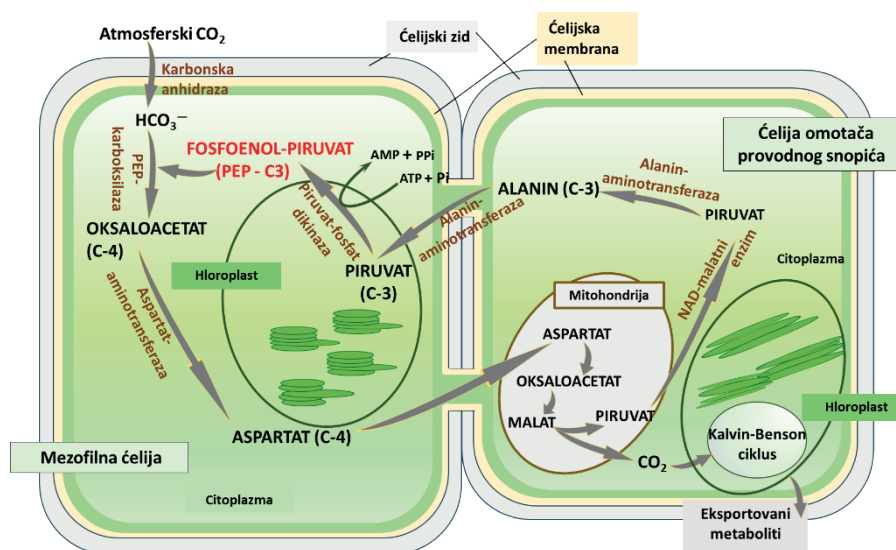
(jabučnu kiselinu) u hloroplastima mezofilnih ćelija pomoću enzima *NADP-malat dehidrogenaze*, a zatim difunduje u ćelije omotača provodnih snopića, gde se u hloroplastima dekarboksiliše pomoću *NADP-malatnog enzima*. Oslobođeni CO_2 se koristi za karboksilaciju RuBP i sintezu ugljenih hidrata u Kalvin-Bensovom ciklusu, dok piruvat (pirogroždana kiselina) difunduje u mezofilne ćelije, gde se u hloroplastima preobraća u PEP katalitičkim dejstvom enzima *piruvat-fosfat dikinaze*.

Malat se smatra glavnom organskom kiselinom koja se transportuje između dva kompartimenta u C_4 biljkama koje imaju NADP-malatni enzim, dok aspartat (asparaginska kiselina) ima ovu ulogu u C_4 biljkama koje imaju NAD-malatni enzim.



Sl. 1.57. C_4 – fotosintetički ciklus – **malatni podtip** (C_4 -NADP-malatno-enzimski podtip): sistem biohemijskih reakcija koje uključuju dva tipa ćelija: ćelije mezofila i ćelije omotača provodnih sudova.

U drugom, C_4 – **aspartatnom podtipu** (C_4 -NAD-malatno-enzimski podtip), nastala oksalsirćetna kiselina (OAA) nakon karboksilacije fosfoenol-piruvata (PEP), u mezofilnim ćelijama se transaminira u aspartat (Asp) pomoću enzima *Asp-aminotransferaze* (Sl. 1.58). Aspartat potom odlazi u mitohondrije ćelija omotača provodnih sudova gde katalitičkim dejstvom *mitohondrijske aminotransferaze*, nastaje oksasirćetna kiselina, koja se redukuje u malat pomoću *NAD-malat dehidrogenaze*. Malat se dekarboksiliše pomoću *NAD-malatnog enzima*, a oslobođeni CO_2 difunduje u hloroplast ćelija omotača provodnih snopića, gde se fiksira u Kalvin-Bensovom ciklusu. Piruvat koji nastaje u reakciji dekarboksilacije se u citosolu ćelija omotača provodnih sudova pretvara u amino-kiselinu alanin (Ala) pomoću enzima *Ala-aminotransferaze*. Alanin se ponovo transaminira u piruvat aktivnošću *Ala-aminotransferaze* u citosolu mezofilnih ćelija. Aktivnošću enzima *piruvat-fosfat dikinaze* u hloroplastima mezofilnih ćelija piruvat se preobraća u PEP i difunduje u citosol mezofilnih ćelija.



Sl. 1.58. C_4 -fotosintetički ciklus – **aspartatni podtip** (ili: C_4 -NAD-malatno-enzimski podtip). Sistem biokemijskih reakcija koje uključuju dva tipa ćelija: ćelije mezofila i ćelije omotača provodnih sudova.

Sumarno predstavljene glavne biokemijske reakcije oba podtipa C_4 -fotosinteze, nalaze se u Tabeli 1.6.

Tabela. 1.6. C_4 -fotosintetski ciklus ugljenika: funkcionalna povezanost mezofilnih ćelija i ćelija omotača provodnih sudova; glavni intermedijeri ciklusa - reakcije i enzimi

Enzimi:	Reakcije:
1. Fosfoenol-piruvat karboksilaza (PEP-karboksilaza)	Fosfoenol-piruvat + $\text{HCO}_3^- \longrightarrow$ Oksaloacetat + P_i
2. NADP-malat dehidrogenaza*	Oksaloacetat + $\text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow$ Malat + NADP^+
3. Aspartat-aminotransferaza**	Oksaloacetat + glutamat $\longrightarrow$ Aspartat + 2-oksoglutarat
4. Malatni enzimi-enzimi koji katališu dekarboksilaciju:	
4a. NADP-malatni enzim*	Malat + $\text{NADP}^+ \longrightarrow$ Piruvat + CO_2 + $\text{NADPH} + \text{H}^+$
4b. NAD-malatni enzim**	Malat + $\text{NAD}^+ \longrightarrow$ Piruvat + CO_2 + $\text{NADH} + \text{H}^+$
5. Alanin-aminotransferaza**	Piruvat + glutamat $\longrightarrow$ Alanin + 2-oksoglutarat (Aspartatni tip C_4 fotosinteze)
6. Piruvat-fosfat dikinaza	Piruvat + P_i + ATP $\longrightarrow$ Fosfoenol-piruvat + AMP + PP_i
7. Adenilat kinaza	AMP + ATP $\longrightarrow$ 2 ADP
8. Pirofosfataza	PP_i + $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow$ 2 P_i

* samo u malatnom podtipu C_4 fotosinteze; **samo u aspartatnom podtipu C_4 -fotosinteze

Ova dva metabolička C_4 fotosintetička podtipa se ne isključuju, pošto brojni naučni dokazi ukazuju da mnoge C_4 biljke koriste kombinaciju organskih kiselina (i malat i aspartat) i enzima dekarboksilaza (NADP-malatni enzim, NAD-malatni enzim) u ćelijama omotača provodnih sudova tokom fiksacije CO_2 , tako da kategorije C_4 -tipa metabolizma nisu isključive (u istim ćelijama mogu zavisno od uslova, da postoje i malatni i aspartatni tip, ali takođe i kombinacija ova dva biokemijska puta). Smatra se da sposobnost stvaranja više vrsta organskih kiselina i korišćenja različitih dekarboksilaza daje prednost C_4 biljkama tokom razvika u promenljivim uslovima životne sredine (naročito svetlosnim), tako što se lakše uspostavlja ravnoteža između dva ćelijska odeljka uključena u C_4 fotosintetski put.

Treba takođe istaći da malatni enzimi (NADP-malatni enzim, NAD-malatni enzim), koji katališu dekarboksilaciju organskih C_4 -kiselina, spadaju u najzastupljenije proteine kod C_4 -biljaka.

1.5.4.2. CAM ciklus ugljenika (engl. *Crassulacean Acid Metabolism/CAM-fotosinteza*)

Fotosinteza se odvija tokom dana, a razmena gasova noću

CAM-fotosintetički karbonski ciklus predstavlja kao i prethodno opisan C_4 -ciklus, evolutivno razvijenu ekofiziološku izmenu fotosinteze u smislu adaptacije biljaka na život u sušnim (ili periodično sušnim) uslovima gde istovremeno postoji značajno dnevno variranje temperature, sa hladnim noćima i vrelim danima. Opstanak biljaka u ovakvim, dominantno aridnim klimatskim uslovima, zahteva morfo-anatomske i fiziološke adaptacije koje u ekološki limitirajućim uslovima (suša, nedostatak nutrijenata i mali parcijalni pritisak CO_2) doprinose boljem iskorištavanju vode i mineralnih elemenata, te obezbeđivanju dovoljnih koncentracija CO_2 za potrebe karboksilacije od strane Rubisco enzima i time smanjivanju fotorespiracije.

CAM-metabolički tip fotosinteze otkriven je 1940-ih godina u sukulentoj biljnoj vrsti *Bryophyllum calycinum* koja taksonomski pripada familiji Crassulaceae, te se stoga definiše i kao Crassulacean acid metabolism (CAM fotosinteza). Danas je poznato da se CAM-fotosinteza sreće kod velikog broja biljnih vrsta (po nekim podacima, preko 1400, iz čak 38 familija, ne samo kopnenih, već i vodenih biljaka, koje su izložene nedostatku CO_2 zbog nje-gove spore difuzije kroz vodu sredinu). Neke od tipičnih predstavnika biljaka sa CAM fotosintezom su: ananas (*Ananas comosus*, fam. Bromeliaceae), agava (*Agave* spp., fam. Asparagaceae), kaktusi (fam. Cactaceae), orhideje (fam. Orchidaceae) i dr., a potrebno je istaći da mnoge od ovih biljaka imaju i ekonomsku/komercijalnu vrednost.

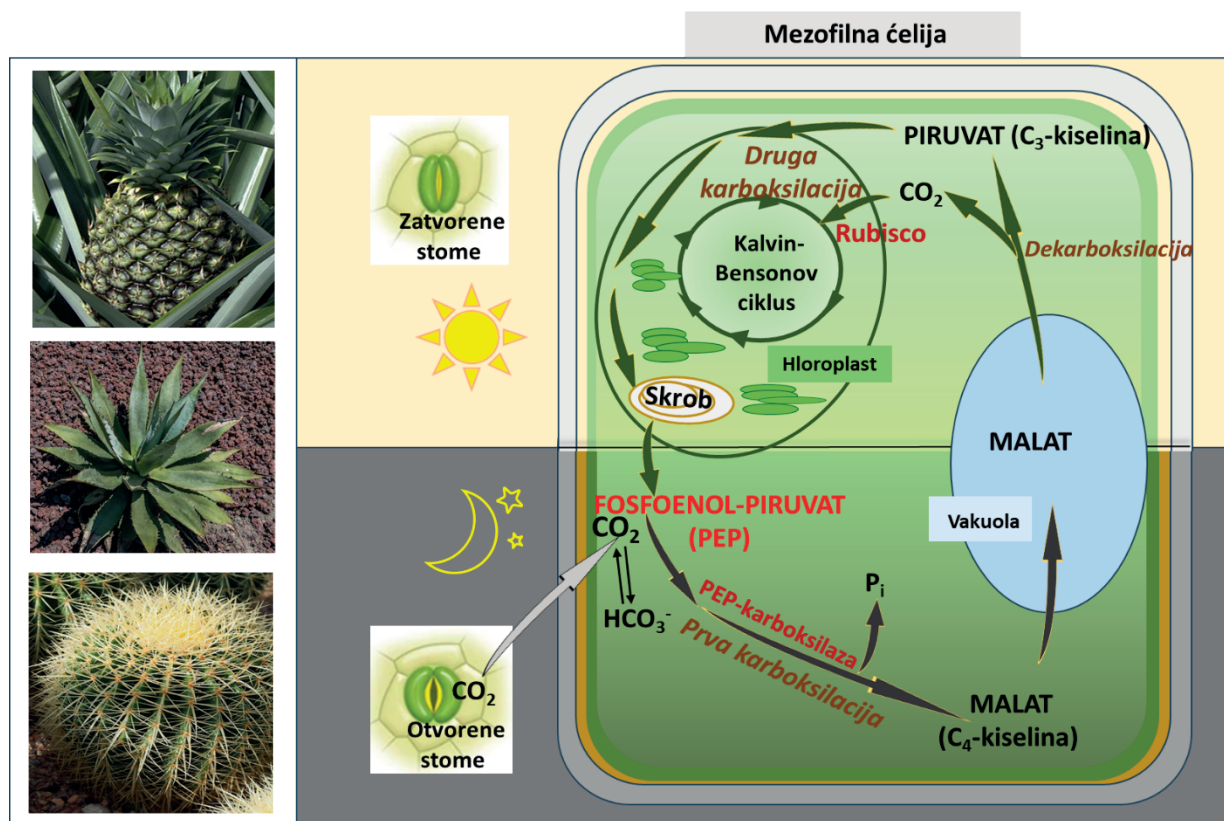
Areal rasprostranjenja biljnih vrsta sa CAM metabolizmom određen je sposobnošću biljaka da opstanu u uslovima oštre klime (velika dnevna temperaturna amplituda: hladne noći i vrela dana, nedostatak ili neravnomerana dostupnost vode), tako da su one u većoj, ili manjoj meri, evolutivno razvile morfo-anatomske adaptacije usmerene ka sukulenciji stabla i glavnih fotosintetičkih organa – listova.

Opšte karakteristike CAM-fotosinteze:

Biohemijski put koji definiše CAM-metabolizam, veoma je sličan C_4 -tipu sa osnovnom razlikom da su kod C_4 -tipa dve karboksilacije (vezivanje CO_2 sa PEP i vezivanje CO_2 sa RuBP odvojeni prostorno, u dva tipa ćelija), dok su kod CAM biljaka one odvojene vremenski. Generalno, CAM fotosinteza se sastoji od reakcija koje se odvijaju noću, kada su niže temperature i stome su otvorene, tako da usvojeni CO_2 preko otvorenih stoma može da difunduje u mezofilne ćelije i deponuje se za potrebe druge karboksilacije (Kalvin-Bensonov ciklus) koja mora da se odvija danju (dok su istovremeno stome zatvorene, što je adaptacija u smislu zaštite od prekomernog gubitka vode transpiracijom). Stoga se CAM fotosinteza može podeliti u dve faze:

1. Noćno deponovanje i koncentrovanje CO_2 za potrebe karboksilacije RuBP u tamnoj fazi fotosinteze vrši se karboksilacijom fosfoenol-piruvata (PEP) sa atmosferskim CO_2 (ili respiratornim CO_2 – poreklom iz ćelijskog disanja) uz pomoć enzima *PEP-karboksilaze*, što dovodi do stvaranja oksalsirćetne kiseline (OAA). Zatim se OAA redukuje enzimom *malat-dehidrogenazom* u malat (jabučnu kiselinu), koji se zatim transportuje u vakuolu i skladišti u njoj kao rezervoar CO_2 . Nagomilavanje organskih kiselina (dominantno, malata) u vakuolama, tokom noći kada su stome otvorene, dovodi do zakišeljavanja (acidifikacije) CAM biljaka. Transport malata u vakuolu je aktivni proces, koji se odvija kroz anjonske kanale, ATPazama, odnosno, protonskim pumpama koje se nalaze u tonoplastu, pre svega, to su H^+ -V-ATPaze. Pored jabučne kiseline, neke druge kiseline kao što su limunska kiselina i izo-limunska kiselina takođe doprinose ukupnoj vakuolarnoj kiselosti, ali je njihova količina zanemarljiva i one ne pokazuju konzistentan dnevni obrazac fluktuacije, kao što to pokazuje jabučna kiselina.

2. Dnevna remobilizacija organskih kiselina (pre svega, malata) iz vakuola mezofilnih ćelija i njihova dekarboksilacija, pri čemu oslobođeni CO_2 služi za karboksilaciju RuBP u Kalvin-Bensonovom ciklusu. Ovo je duga karboksilacija, koja se dešava uprkos tome što su stome zatvorene i nema direktnog dotoka CO_2 (**Sl. 1.59**).



Sl. 1.59. Usvajanje CO_2 preko otvorenih stoma noću i asimilacija CO_2 (Kalvin-Bensonov ciklus) iza zatvorenih stoma tokom svetlosnog perioda, omogućava da transpiracijski gubitak vode bude minimalizovan na visokim dnevnim temperaturama. Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 102.

Između ove dve faze postoje prelazi kada su stome (delimično) otvorene za unos CO_2 , a to je kratko vreme tokom ranog jutarnjeg i kasnog večernjeg svetlosnog perioda. Tada se dešava direktna fiksacija CO_2 i sinhrono odvijanje svetle i tamne faze fotosinteze. U ovom periodu je i zaliha CO_2 u vakuolarnom malatu iscrpljena (smanjuje se kiselost i raste pH ćelijskog soka).

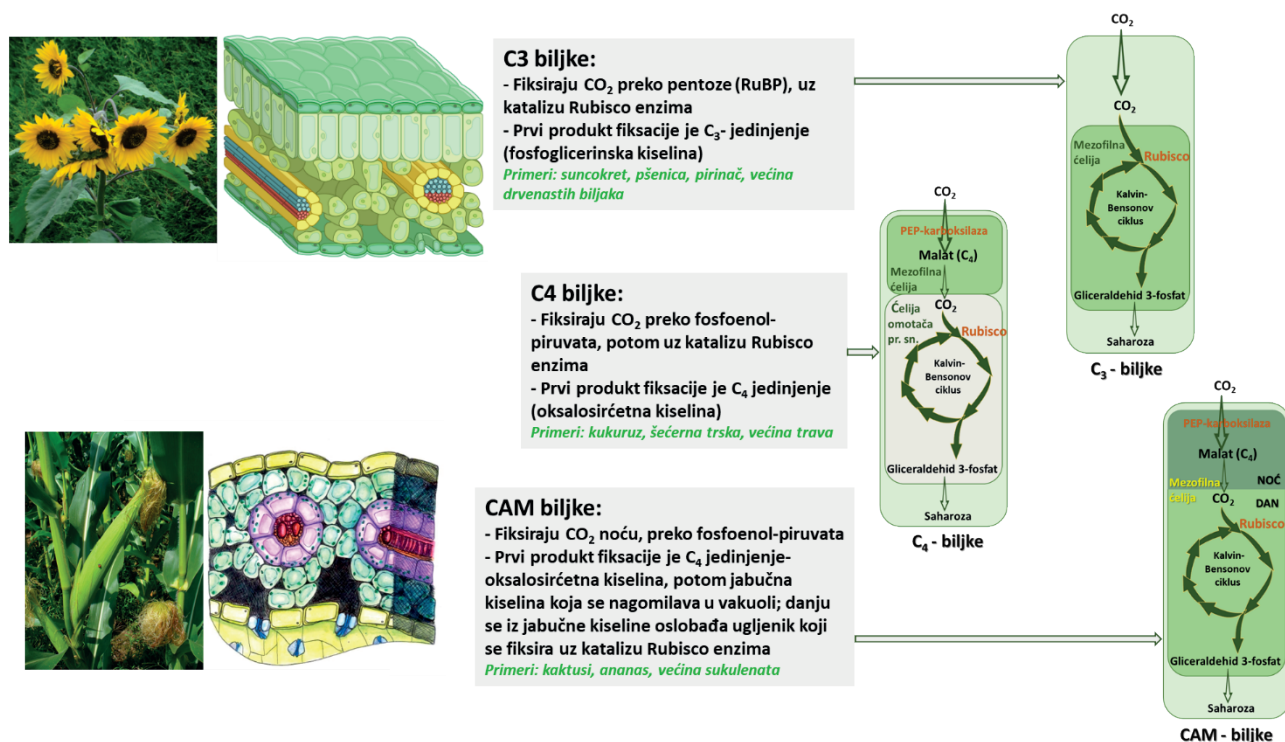
Biljke kod kojih je CAM metabolizam prisutan u većoj ili manjoj meri, prepoznate su kao agronomski važne (npr. ananas, agava, opuncija, aloja, vanila itd.), sa velikim potencijalom u proizvodnji hrane, vlakana, biogoriva, lekova i sl. Ne može se zanemariti ni činjenica da su to vredne ukrasne biljke (npr. agava, kaktusi, kalanhoe i orhideje). Glavne morfo-anatomske i eko-fiziološke razlike između C_3 , C_4 i CAM biljaka date su u **Tabeli 1.7.** i na **Sl. 1.60:**

Tabela. 1.7. Glavne specifičnosti C_3 , C_4 i CAM metabolizma

Svojstvo	C_3	C_4	CAM
Naziv	CO_2 se primarno ugrađuje a u jedinjenje sa 3-C atoma (fosfoglicerinska kiselina)	CO_2 se primarno ugrađuje u jedinjenje sa 4- C atoma (oksalsirćetna kiselina)	engl. Crassulacean Acid Metabolism prvi put otkriven kod biljaka iz porodice Crasulaceae
Rasprostranjenje – klimatsko područje	umerena klima	tropska i suptropska klima	aridna – sušna klima
Tipični predstavnici	pšenica, šećerna repa, soja suncokret, eukaliptus, paradajz, duvan...	kukuruz, sirak, šećerna trska...	kaktus, agava, bromelija, ananas, orhideja...
Otpornost na ekološke ekstreme (visoka temperatura, suša, visok svetlosni intenzitet)	niska	visoka	visoka
Anatomija lista, struktura hloroplasta	mezofilno tkivo diferencirano u palisadno i sunđerasto; granalni hloroplasti	„kranz“ anatomija; hloroplasti su dimorfni: granalni i agranalni	mezofilno sunđerasto tkivo sa ćelijama ispunjenim velikim vakuolama; granalni hloroplasti
Primarni akceptor CO_2 , Karboksilacija, enzimi	RuBP	PEP (u mezofilnim ćel.) i RuBP (u ćel. omotača provodnih sudova)	PEP (noću) i RuBP (danju)
Fiksacija CO_2 – metabolički ciklus	Kalvin-Bensonov ciklus	„Hatch i Slack“ ciklus; Calvin-Bensonov ciklus	„Hatch i Slack“ ciklus; Calvin-Bensonov ciklus
CO_2 -kompenzaciona tačka*	visoka (25 - 100 ppm CO_2)	niska (<10 ppm CO_2)	niska (<5 ppm CO_2)
Svetlosna kompenzaciona tačka**	niska	visoka	visoka
Fotorespiracija	intenzivna	niska	uglavnom niska
Otvorenost stoma	danju	danju	noću
Transpiracija	intenzivna	umerena	malog intenziteta
Fotosintetička produktivnost/količina stvorene organske materije	umerena	visoka	niska

* Koncentracija atmosferskog CO_2 pri kojoj se brzina fotosinteze (fotosintetskog usvajanja CO_2) tačno poklapa sa brzinom ćelijskog disanja (respiratornim oslobađanjem CO_2).

** Svetlosni Intenzitet pri kome se brzina fotosinteze (fotosintetskog usvajanja CO_2) tačno poklapa sa brzinom ćelijskog disanja (respiratornim oslobađanjem CO_2).



Sl. 1.60. Glavne specifičnosti C₃, C₄ i CAM metabolizma. (Kreirano u BioRender-u. Pajević, S. 2025 i adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 102.

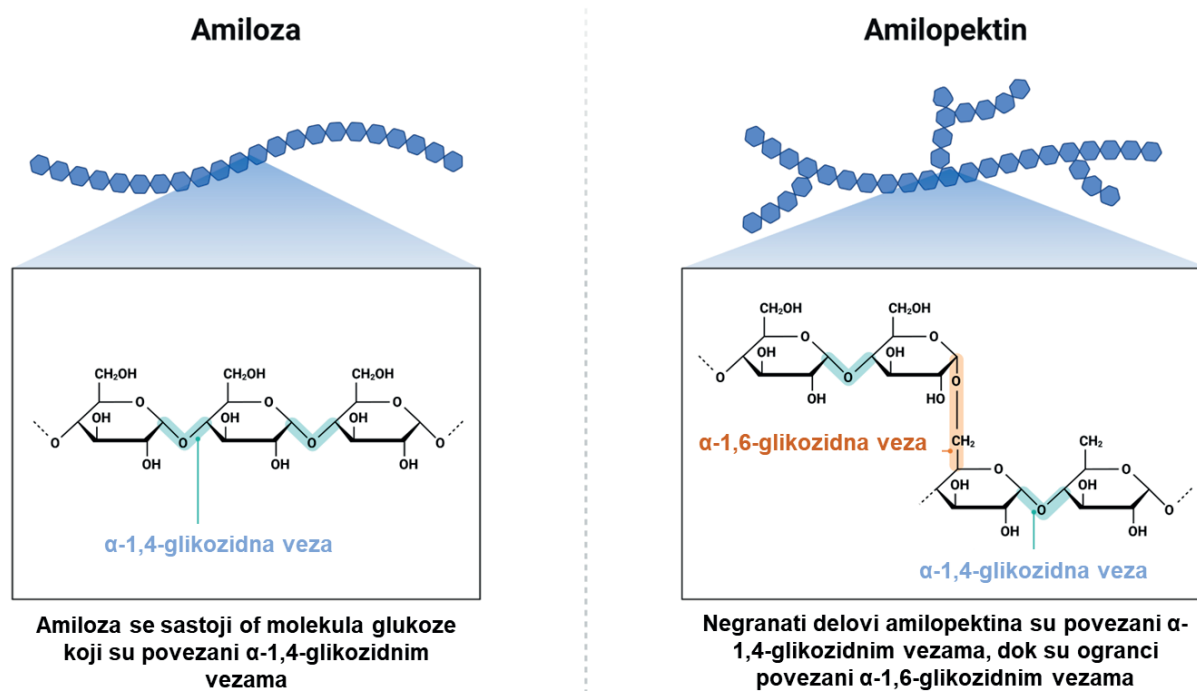
1.5.5. Sinteza primarnih produkata fotosinteze (neto-fotosintetička produkcija)

Metaboliti sintetisani na svetlosti u procesu fotosinteze (fotosintati, asimilati, redukovani ugljenik), predstavljaju izvor energije za sve metaboličke procese koji rezultiraju razvićem biljaka. Primarni produkt asimilacije ugljenika u fotosintetičkim ćelijama i organima je šećer glukoza (videti osnovnu jednačinu fotosinteze), monosaharid koji se enzimski polimerizuje u stromi hloroplasta u homopolisaharid – skrob. Sintetisane ugljene hidrate biljke mogu da skladište i kao vakuolarnu saharozu (ili fruktozu i njene polimere – fruktane), ali je ipak, najčešći oblik skladištenja skrob, koji je glavna rezerva ugljenika u biljkama, a njegova količina u plodovima i semenima je parametar ekonomskog prinosa od biotehnološkog značaja. Uz celulozu, skrob je najzastupljeniji glukan (derivat monosaharida glukoze) u biljkama i predstavlja osnovni supstrat ćelijskog disanja. Tokom dana, naročito, kada su povoljni ekološki uslovi za fotosintezu (svetlost, temperatura, vlažnost) skrob se nakuplja u vidu skrobnih granula u hloroplastima, dok se njegov (uglavnom) manji deo paralelno razgrađuje do trioza-fosfata, prenosi u citoplazmu i koristi za sintezu disaharida saharoze. Noću međutim, prestaje fotosinteza i nastajanje skroba, te počinje njegova razgradnja u hloroplastima do trioza-fosfata, njihov transport u citoplazmu i sinteza saharoze, koja se potom transportuje u floem i kreće ka „ušču“ asimilata (plodovi, semena, organi za deponovanje organske materije), da bi se na kraju opet biohemijски prevela u skrob – hemijski najpogodniji oblik nakupljenih akumuliranih asimilata. Prema tome, sinteza, nakupljanje i preraspodela asimilata (redukovanog ugljenika) ima dnevnu dinamiku i bitno zavisi od uslova sredine i kapaciteta („zahteva“) tkiva za rezervisanje hranljivih materija („ušća asimilata“).

1.5.5.1. Sinteza skroba na svetlosti i njegovo nakupljanje u obliku nerastvorljivih granula u stromi hloroplasta

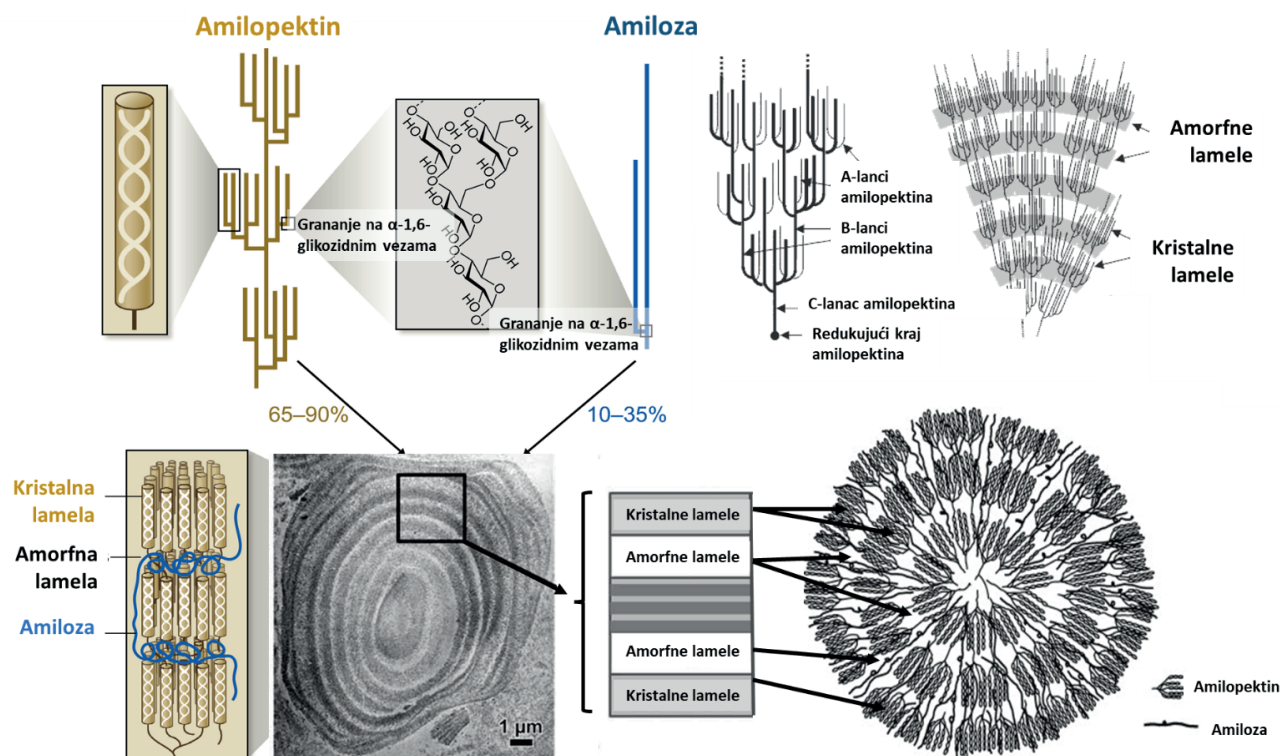
Na svetlosti se u stromi hloroplasta skladišti asimilisani ugljenik u obliku nerastvorljivih skrobnih granula (zrna), koje se razlažu tokom noći kada nema fotosinteze. Skrob je, kao i glikogen, složeni polisaharid

sačinjen od monosaharida glukoze i sadrži dve glavne komponente: amilozu i amilopektin. Molekuli α -D-glukoze (glukozil-jedinice) vezuju se preko α -D-1,4 glikozidnih veza u duge lance amiloze, dok uspostavljanje α -D-1,6 glikozidnih veza omogućava grananje ovih lanaca i dovodi do formiranja amilopektina, koji u svojoj strukturi ima između 5–6% α -D-1,6 glikozidnih veza (amiloza ih ima ispod 1%). Hloroplasti mogu da skladište značajne količine skroba (**Sl. 1.61**):



1.61. Hemijska struktura skroba sa dve polimerne komponente: amilozom i amilopektinom. Kreirano u BioRender-u. Pajević, S. (2025); Elektronski izvori slika, str. 102.

Nerastvorljive granule skroba imaju (polu-)kristalnu strukturu zbog specifične organizacije: amilopektin je glavni polimer skrobne granule i čini između 65–90% njenog sastava, dok amiloza ima udela u njenoj strukturi do 35% i za razliku od amilopektina, nije neophodna za stvaranje polukristalne strukture skrobnih granula. Koncentrični i naizmenično raspoređeni slojevi kristalnih i amorfnih lamela (regiona), vidljivih svetlosnim mikroskopom (nakon bojenja jodom), posledica su specifične molekulske arhitekture skrobnih granula (**Sl. 1.62**).



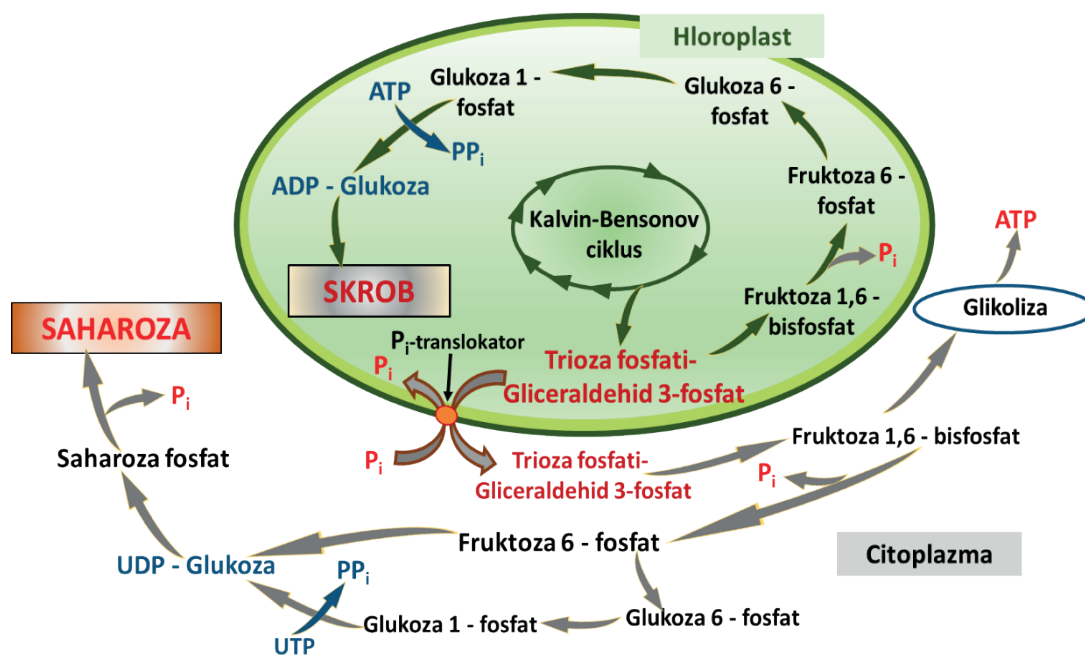
Sl. 1.62. Molekularna organizacija skrobnih granula. Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 102.

Amilopektin ima razgranatu strukturu, zbog većeg broja α -1,6 glikozidnih veza, koja omogućava da susedni glukozni lanci u granama formiraju molekulsku konfiguraciju dvostrukih spirala (heliksa) i njihovo organizovanje („pakovanje“) u tzv. kristalne lamele (regione), dok mesta grananja amilopektinskih polimera formiraju amorfne lamele (regione) skrobnih granula (**Sl. 1.62**). Naizmenično koncentrično smenjivanje kristalnih i amornih lamela daje matriksu skrobnog zrna semi-kristalnu strukturu. Prema tome, skrobno zrno predstavlja sfero-kristalni sklop molekula amilopektina orijentisanih radijalno. Interakcije skrobnih zrna sa brojnim komponentama iz strome hloroplasta (proteini, (fosfo)lipidi, joni i dr.) utiču takođe na supramolekulsku arhitekturu skrobnih granula, njihova biohemijska svojstva i funkcionalnost, tako da postoji njihova izrazita specifičnost u odnosu na biljnu vrstu/genotip, fazu ontogenetskog razvića, fotosintetička svojstva, faktore spoljašnje sredine itd.

Sinteza skroba u hloroplastima u procesu fotosinteze je kompleksan proces, kontrolisan brojnim enzimima.

Tokom fotosinteze, u stromi hloroplasta, može da se nakuplja veća količina asimilata (redukovano ugljenika) bez narušavanja osmotskog balansa ćelije zbog toga što se amiloza i amilopektin „pakuju“ u nerastvorljive – *osmotski neaktivne* skrobne granule.

Biosinteza glukoze, počinje od trioza fosfata (TP) stvorenih nakon faze redukcije Calvin-Bensonovog ciklusa (**Sl. 1.63**).



Sl. 1.63. Biosinteza skroba u stromi hloroplasta i saharoze u citoplazmi je u direktnoj korelaciji sa Kalvin-Bensonovim ciklusom.

Biohemijski put i enzimi u sintezi skroba (**Sl. 1.64**):

U stromi hloroplasta:

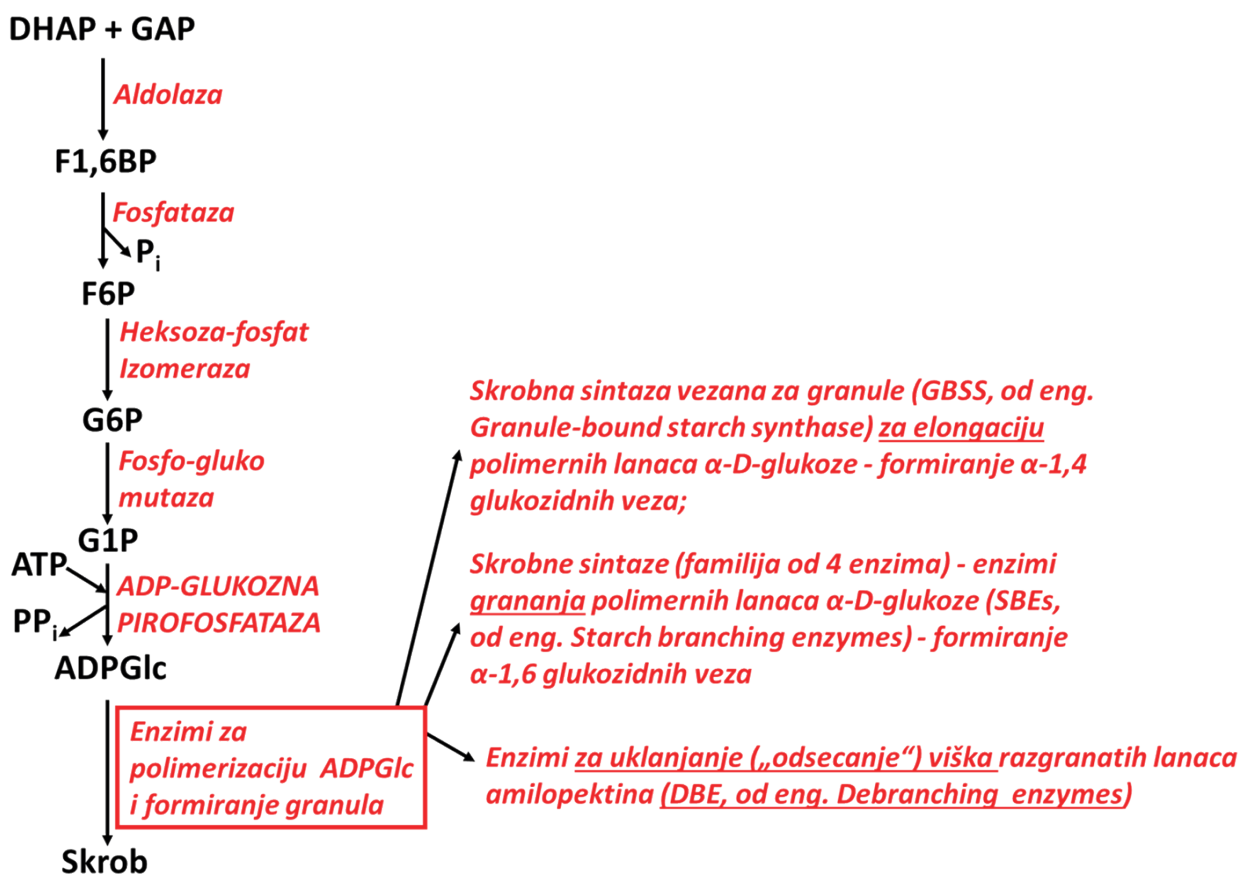
Sve enzimске reakcije koje katališu prevođenje trioza-fosfata (TP) u glavni intermedijer ADP-Glukožu (ADP-Glc) dešavaju se u hloroplastima. Sinteza skroba i njegova razgradnja ne teku simultano: danju dominira sinteza skroba u hloroplastima, dok se noću dešava njegova razgradnja i prenošenje nastalih TP u citoplazmu.

Trioza fosfati (TP), konkretno, gliceralehid-fosfat (GAP) i dihidroksiaceton-fosfat (DHAP), u reakciji aldolne kondenzacije (koju katališe *aldolaza*) obrazuju heksozu, fruktozu 1,6-bisfosfat (F1,6-BP). Dalje, defosforilacijom fruktoze 1,6-bisfosfat uz pomoć enzima *fosfataze* obrazuje se fruktoza 6-fosfat (F6-P), heksoza koja je produkt Kalvin-Bensonovog ciklusa i osnovni supstrat za sintezu skroba. Potom F6P pomoću enzima *heksoza-fosfatne izomeraze* prelazi u glukožu 6-fosfat (G6P), koja uz pomoć katalitičkog dejstva enzima *fosfo-gluko mutaze* prelazi u glukožu 1-fosfat (G1P).

Prvi regulatorni korak u biosintezi skroba je formiranje adenzin 5'-difosfat glukoze (ADP-glukoze), koja je rastvorljivi prekursor i supstrat za aktivnost izoenzimске familije *skrobnih sintaza* (SSs). ADP-glukoza se sintetise od glukoza-1-fosfata (G1P) fosforilacijom pomocu **ADP-glukozne pirofosforilaze** (AGPaza) nakon čega prelazi u ADP-glukožu (ADPGlc) uz izdvajanje pirofosfata (PPi). Ova reakcija, kojom se obezbeđuje supstrat za elongaciju α-glikanskog (glikozidnog) lanca, predstavlja u suštini, prvi korak u stvaranju tipične molekulske arhitekture skrobne granule. Napred opisan biohemijski put sinteze skroba u hloroplastima je opšte-prihvaćen i smatra se tipičnim, mada se mogu u literaturi naći i mišljenja da se ADP-glukoza može direktno transportovati iz citoplazme u hloroplaste kroz dvostruku membranu, nakon što se sintetise od ADP i G1P nastalog od saharoze aktivnošću enzima *saharoza-sintaza* (SuSy, engl. Sucrose synthase). Obe izoforme **ADP-glukozne pirofosforilaze**, plastidna i citoplazmatska mogu se identifikovati u endospermu žitarica, što nedvosmisleno ukazuje da sinteza ADP-glukoze može da se odvija ne samo u hloroplastima, već i u citoplazmi fotosintetičkih ćelija.

Enzimi koji spadaju u grupu skrobnih sintaza (SSs, engl. Starch synthases) ugrađuju glukožu iz ADP-glukoze

počev od neredukujućeg kraja α -glukanskog lanca formirajući α -(1,4) glikozidne veze, istovremeno oslobađajući ADP (Sl. 1.64).



Sl. 1.64. Biohemijski put sinteze skroba u hloroplastima.

Dok je izduživanje lanaca amiloze katalisano jednim enzimom iz familije *skrobnih sintaza* (SSs) koji je vezan za granule (GBSS, engl. Granule-bound starch synthase), amilopektinski razgranati lanci se formiraju katalitičkim delovanjem četiri SSs izoenzima, koji katališu reakcije polimerizacije unutar skrobne granule i nazivaju se *enzimi grananja* (SBEs, engl. Starch branching enzymes). Ovi enzimi grananja omogućuju formiranje amilopektinskih grana tako što se formiranjem α -(1,6) glikozidnih veza uvode tačke grananja kroz njihovo uzastopno cepanje i ponovno formiranje u glukanskom lancu. Da bi se održala uređena struktura unutar amilopektina, višak razgranatih lanaca se uklanja *enzimima koji cepaju glukanske lance na mestima grananja*, tj. na α -(1,6) glikozidnim vezama (DBE, engl. Debranching enzymes) (Sl. 1.64).

1.5.5.2. Razgradnja skroba noću – biohemijski put i enzimi

Skrob koji je preko dana, za vreme fotosinteze obrazovan u stromi hloroplasta, ne može ostati u hloroplastu, jer bi povratno negativno uticao na fotosintezu, te se preko noći, kada nema fotosinteze, razgrađuje stvarajući brojne intermedijere koji odlaze u različite metaboličke puteve, a najvažniji produkti razgradnje, trioza-fosfati (TP), odlaze preko TP-translokatora (nosača) u citoplazmu. Disaharid saharoza (Suc, engl. sucrose) se sintetiše u citoplazmi fotosintetičkih ćelija od trioza-fosfata (TP) koje su poreklom iz hloroplasta i nastaju nakon razgradnje skroba. Na svetlosti, u procesu fotosinteze, visok odnos TP/ P_i ukazuje na intenzivnu organsku produkciju i formiranje skrobnih granula u hloroplastu, dok u mraku, produkti njihove razgradnje (TP) predstavljaju supstrat za sintezu saharoze – glavnog transportnog oblika fotosintetičkih asimilata. Tre-

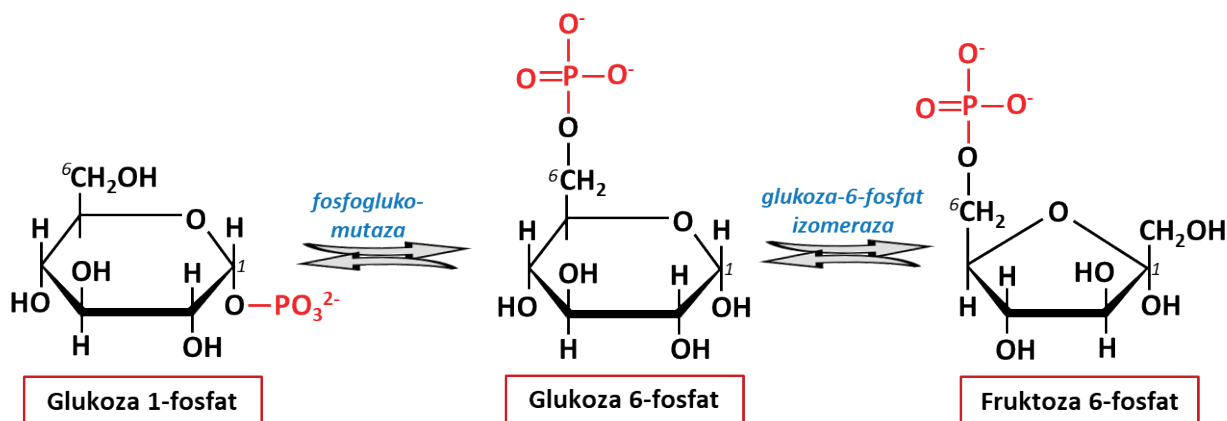
1.5.5.3. Sinteza saharoze u citoplazmi – biohemijski put i enzimi

Saharoza je glavni produkt CO_2 - fotosintetičke asimilacije u zelenim listovima i istovremeno predstavlja glavno jedinjenje za transport sintetisane organske materije na velike udaljenosti. Istovremeno, kod nekih biljaka ovaj disaharid je osnovni oblik skladištenja asimilata, npr. kod šećerne repe, šećerne trske, mrkve i sl. To je disaharid koji se sastoji od molekula glukoze i molekula fruktoze.

Oslobađanje šećera iz rezervi skroba ima izuzetno veliki uticaj na rast i razviće biljaka, jer su oni istovremeno moćni signalni molekuli u regulaciji ekspresije gena, tako da preko proteina upravljaju metabolizmom i koordinišu procese koji rezultiraju ontogenetskim razvićem, te većom ili manjom organskom produkcijom.

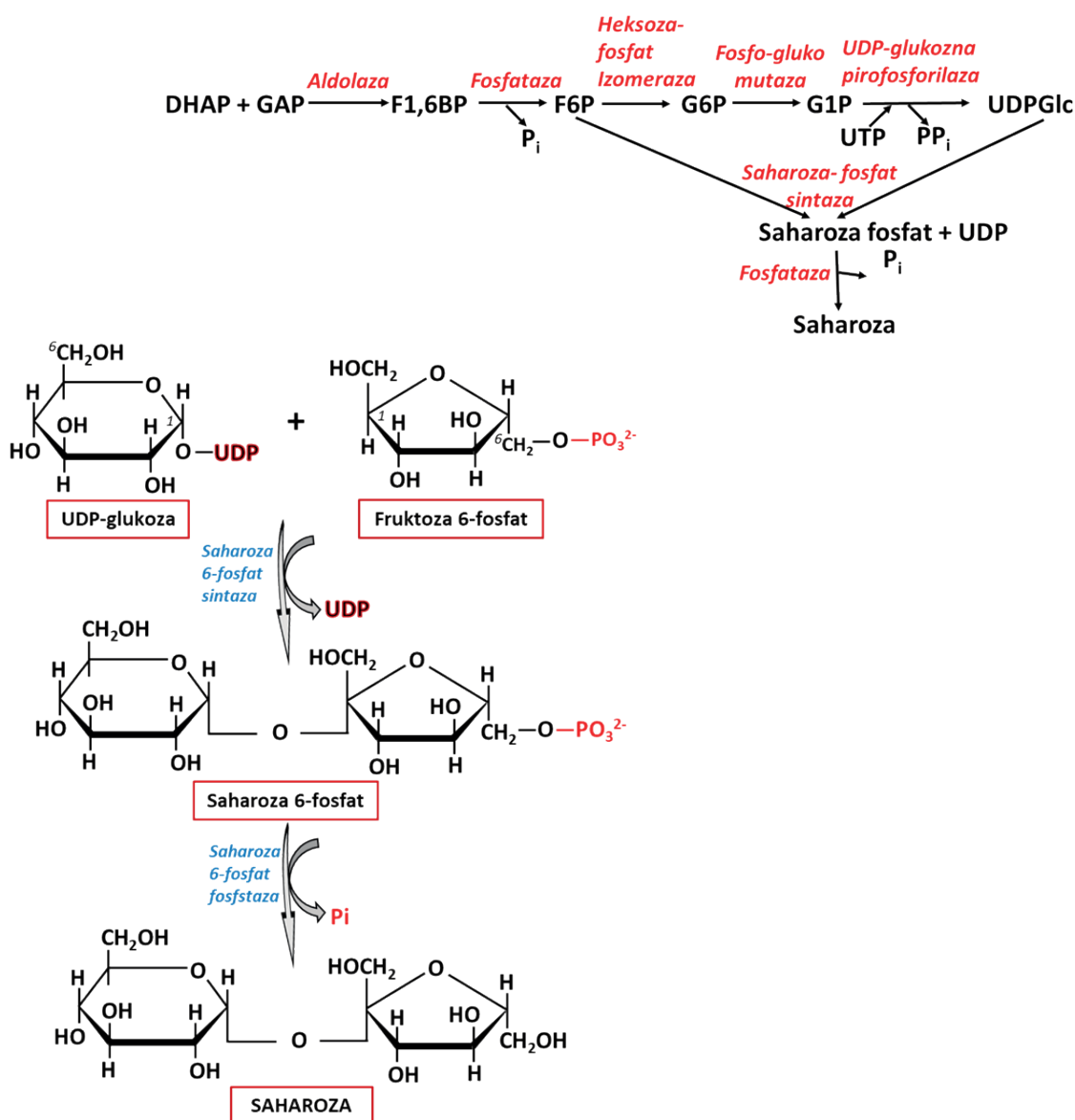
Tri međusobno konvertibilna molekula heksoza (heksoza-fosfata), koji čine depo heksoza-fosfata predstavljaju najvažnije regulatore procesa prevođenja skroba u saharozu i obrnuto, to su:

- Glukoza 1-fosfat (G1P; α -D-Glukoza 1-fosfat)
- Glukoza 6-fosfat (G6P; α -D-Glukoza 6-fosfat)
- Fruktoza 6-fosfat (F6P; α -D-Fruktoza-6-phosphat) (**Sl. 1.66**).



Sl. 1.66. Heksozno-fosfatni depo (skladište).

Ključna reakcija u citoplazmi koja obezbeđuje sintezu saharoze je prevođenje glukoze-1-fosfata (G1P) u UDP-glukozu (UDPGlc; Uridin-difosfat glukoza): $\text{G1P} + \text{H}^+ + \text{UTP} \rightarrow \text{UDPGlc} + \text{P}_i$. Ova reakcija je katalisana enzimom *UDP-glukoznom pirofosforilazom* (**Sl. 1.67**).



Sl. 1.67. Biohemijski put sinteze sahoroze u citoplazmi fotosintetičkih ćelija.

U reakciji katalisanoj enzimom *saharoza-fosfat sintaza*, UDPGlc reaguje sa F6P i nastaje saharoza 6-fosfat (Suc6P) i UDP. Poslednja reakcija podrazumeva hidrolizu sahoroze 6-fosfata enzimom *saharoza 6-fosfatazom* i nastanak sahoroze (Sl. 1.67).

Saharoza je neredukujući disaharid: anomerni ugljenik glukoze (C-1) je spojen sa anomernim ugljenikom fruktoze (C-2) preko stabilne glikozidne veze koja neutrališe redukujuće krajeve oba monomera spajanjem ugljenika iz njihovih karbonilnih grupa (C=O). Na taj način, sprečava se učešće ovih grupa u neenzimskim oksidoredukcionim reakcijama i saharoza, kao neredukujući, a osmotski aktivan šećer, predstavlja najpogodniji transportni molekul stvorenih fotosintata (asimilata).

Sintaza sahoroze enzimski je regulisana na nivou transkripcije, a rezultirajuće promene u sintezi i aktivnosti enzima se dešavaju relativno sporo. Brže promene u fluksu enzima sahorozne sintaze dešavaju se usled brzih promena nivoa uridin-nukleotida neophodnog za stvaranje UDP-glukoze.

Aktivnost enzima UDP-glukozne pirofosforilaze je veća od ADP-glukozne pirofosforilaze. Dokazano je da je

glavni metabolički put za korišćenje UDP-glukoze, sinteza saharoze-fosfata, odnosno, saharoze. S druge strane, specifičnu prekursorsku ulogu ADP-glukoze za sintezu hloroplastnog skroba podržava spregnuti enzimski sistem *ADP-glukozne pirofosforilaze* i *transglukozidaze*.

Kada se govori o složenim signalnim putevima interkonverzije heksoza fosfata, te stvaranju i održavanju heksozno-fosfatnog metaboličkog depoa, treba istaći i važnu ulogu nekoliko enzima koji katališu fosforilaciju fruktoze 6-fosfata (F6P) i stvaranje fruktoze 1,6-bisfosfata (F1,6BP), što je reverzna reakcija slična reakciji u glikolizi, odnosno glukoneogenezi, to su:

- *ATP-zavisna fosfofruktokinaza (ATP-PFK)*, tipična kinaza koja koristi ATP kao donor fosfata;
- *PP_i-zavisna fosfofruktokinaza (PP-PFK)*, jedinstveni biljni enzimi (postoje dva tipa, 1 i 2) koji katališu fosforilaciju fruktoze 6-fosfata (F6P) koristeći pirofosfat (PP_i) za stvaranje fruktoze 1,6-bisfosfata (F1,6BP), a takođe katališu (u većoj meri) i reverznu reakciju fosforilacije F6P koristeći pirofosfat kao supstrat. Skoro sve kinaze koriste ATP kao donora fosfata, dok nekoliko kinaza koristi pirofosfat (PP_i), gde spada i PP_i-zavisna fosfofruktokinaza (PP-PFK). Aktivacija enzima PP-PFK i pomenuta konverzija fosforilisanih šećera koja je slična reakciji u glikolizi i glukoneogenezi, predstavlja vrlo važan regulatorni mehanizam u održavanju depoa heksoza te stoga utiče i na preraspodelu asimilata i regulaciju rasta i razvika biljaka;
- *Fruktoza 6-fosfat 2-kinaza* koja katališe ATP-zavisnu fosforilaciju F6P u fruktozu 2,6-bisfosfat (F2,6BP); u obrnutoj reakciji, F2,6BP enzimom fosfatazom oslobađa Pi i opet nastaje F6P.

U jednom od signalnih puteva, kojim se koordiniše sinteza saharoze na svetlosti pri intenzivnoj fotosintezi (ne samo u mraku, razgradnjom skroba), veća produkcija trioza-fosfata (fosfo-glicerinske kiseline, gliceraldehid-fosfata i dihidroksiaceton-fosfata) usloviće inhibiciju enzima *Fruktoza 6-fosfat 2-kinaze* i posledično, smanjenje sinteze F2,6BP, a to će opet, povećati aktivnost enzima PP-PFK i dovesti do veće sinteze F6P, neophodnog supstrata za sintezu saharoze, uz istovremeno oslobađanje Pi važnog za svetlosne reakcije fotosinteze. Enzimska regulacija sinteze saharoze na svetlosti i njen transport ima veliki biološki značaj.

1.5.5.4. Biohemijska regulacija konverzije saharoze u skrob u organima za deponovanje asimilata (u tzv. „ušču asimilata“)

Tokom vegetacionog perioda, skrob ima višestruku ulogu u metabolizmu biljaka, pre svega, skrob je supstrat za ćelijsko disanje, odnosno izvor asimilovanog ugljenika za energetske potrebe u metabolizmu fotosintetičkih organa za njihov rast i razvike. Druga najvažnija funkcija skroba je da predstavlja glavnu rezervnu materiju u organima za deponovanje u tzv. „ušču“ asimilata (u semenima, krtolama, plodovima), ili može biti privremena rezerva ugljenika koja doprinosi vitalnosti metabolizma u organima kao što su cvetovi, plodovi i semena koji inače nemaju deponovan skrob. Prisustvo skroba u tkivima i organima stoga ima izuzetan uticaj na razvike biljaka, pošto njegova spregnuta sinteza i razgradnja regulišu dostupnost slobodnih šećera, koji kontrolišu ćelijsko disanje, produkciju ATP i brojnih intermedijera metabolizma.

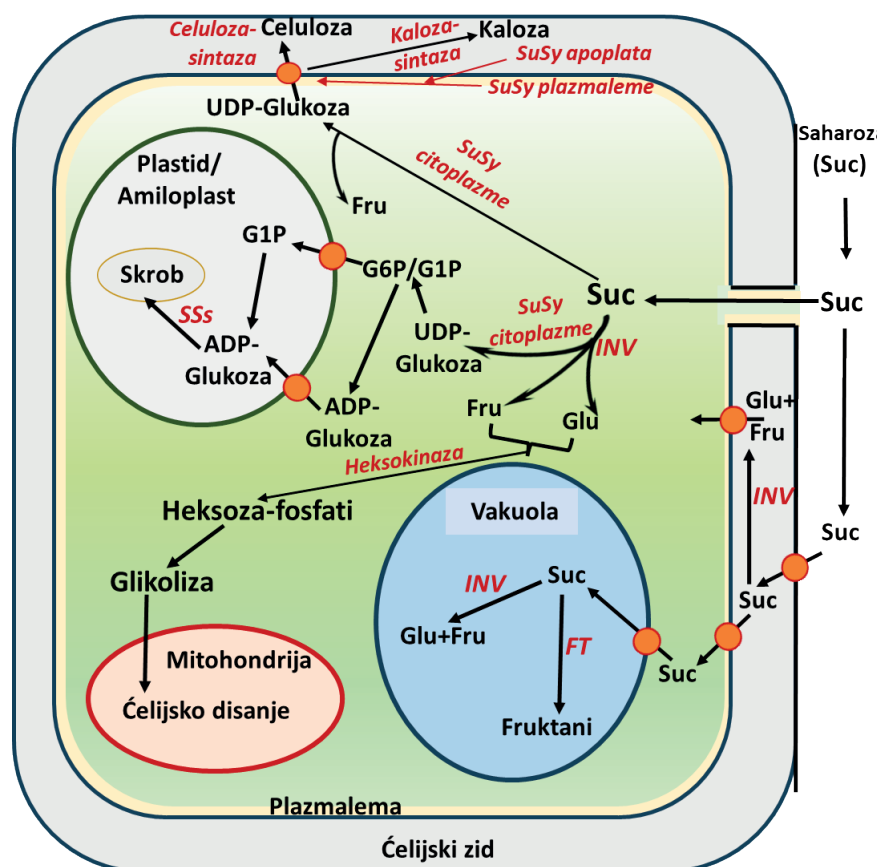
Sinteza i akumulacija skroba u organima za skladištenje su relativno dobro proučeni, i bez obzira na specifičnosti kod različitih biljnih vrsta, može se govoriti o opšteprihvaćenom modelu regulacije. Generalno, u svim organima za deponovanje (osim endosperma žitarica), saharoza koja iz izvora (fotosintetičkog mezofila) flo-emom dolazi do parenhimskih ćelija organa za skladištenje (ušća asimilata) ulazi u citoplazmu ćelija (preko specifičnih transportera) i može da se razgrađuje na različite načine i na različitim sub-ćelijskim nivoima uz pomoć dve grupe enzima:

1. Enzimi iz familije *invertaza (INVs)* hidrolizuju saharozu do glukoze i fruktoze i na taj način imaju uz ostale brojne enzime izuzetnu ulogu održavanja rezervoara heksoza u primarnom metabolizmu i re-

gulacije heksoza-skrob-saharoza signalinga. U zavisnosti od optimalne pH vrednosti i (sub)ćelijskog mesta katalitičkog delovanja, brojne INVs se definišu kao invertaze ćelijskog zida, zatim citoplazmatске, vakuolarne i dr. Katalitička funkcija enzima invertaza ima brojne implikacije na razviće biljaka i njihov prinos (organsku produkciju).

2. Saharozna sintaza (SuSy, engl. sucrose synthase) je enzim glukozil-transferaza koji ima izuzetnu ulogu u metabolizmu šećera, posebno u organima za deponovanje asimilata i koja katališe reverzibilnu reakciju prevođenja saharoze u fruktozu i uridin-difosfat glukozu (UDPGlc), odnosno, fruktozu i adenozin-difosfat glukozu (ADPGlc).

Kada je u pitanju skladištenje skroba u npr. krtoli krompira, saharoza koju isporučuje floem iz fotosintetskog tkiva metabolizuje se na različite načine: 1. enzimski se hidrolizuje pomoću enzimske familije *invertaza* (INVs), koje mogu biti apoplastne, citoplazmatске ili invertaze plazmaleme, što rezultira stvaranjem glukoze (Glu) i fruktoze (Fru), ili se može 2. konvertovati u UDP-Glukozu i fruktozu pomoću *saharozne sintaze* (SuSy). Preovlađujući put cepanja saharoze zavisi od ontogenetske faze razvića samog organa za deponovanje (**Sl. 1.68**).



Sl. 1.68. Pojednostavljeni šematski prikaz metabolizma šećera u ćelijama tkiva/organa za deponovanje asimilata („ušća asimilata“): sinteza celuloze, kaloze i skroba. (adaptirano prema: Stein, O. i Granot, D. (2019). Elektronski izvori slika, str. 102.

Objašnjenje slike: Saharoza (Suc) može biti hidrolizovana u ćelijskom zidu pomoću apoplastne INV, pri čemu nastaju glukoza (Glu) i fruktoza (Fru), koji se potom unose u ćeliju pomoću heksoznog (monosaharidnog) transportera. Alternativno, Suc se može uneti u ćelije tkiva za deponovanje pomoću saharoznog proteinskog transportera ili kroz plazmodezme. Unutar ćelije, Suc se može u vakuoli akumulirati ili hidrolizovati pomoću vakuolarne INV, pri čemu nastaju Glu i Fru.

Saharoza je osnovni supstrat i za sintezu **fruktana**, rezervne materije u vakuoli (najčešće plodova) izvesnog broja viših biljaka. Fruktani su linearni, ili razgranati oligo- ili poli- fruktozni molekuli koji nastaju relativno

ograničenom polimerizacijom fruktoznih jedinica (5-60) vezanih preko dva tipa glikozidnih veza: $\beta(2 \rightarrow 1)$, ili $\beta(2 \rightarrow 6)$. Postoje četiri tipa fruktana, od kojih je *inulin* najzastupljeniji i najrasprostranjeniji kod biljaka. Biosinteza fruktana je katalisana sa nekoliko enzima *fruktosil-transferaza* (FT).

U citoplazmi, saharoza može biti hidrolizovana citoplazmatskom INV da bi se dobili Glc i Fru, koji su supstrati za sintezu heksoza-fosfata što je katalisano enzimima heksokinazama. Nastale fosforilisane heksoze mogu se usmeriti na sintezu skroba u plastidima ili ući u proces glikolize u citoplazmi i potom preko piruvata u ćelijsko disanje za proizvodnju ATP i različitih intermedijera u različitim metaboličkim putevima. Alternativno, u citoplazmi ćelija koje predstavljaju „ušće“ asimilata, uneta saharoza može biti razložena citoplazmatskom saharoznom sintazom (SuSy citoplazme) tako da nastaju Fru i UDP-Glukozu. SuSy plazmaleme i SuSy apoplasta mogu svojom katalitičkom aktivnošću generisati UDP-Glukozu koja je supstrat za sintezu celuloze (glavne strukturne komponente ćelijskog zida), ali i kaloze, polisaharida (β -1,3-glukan, sa malim brojem β -1,6-„grana“), sa važnom ulogom u formiranju i modifikaciji plazmodezmi, naročito kod specijalizovanih biljnih ćelija tokom određenih faza razvika (**Sl. 1.68**).

Razgradnja saharoze i sinteza skroba u plastidima organa za skladištenje kontrolišu se preko regulatornih signala kao odgovor na dostupnost saharoze (i kiseonika). Dostupnost saharoze kontrolisana je invertazama (INVs) i saharoznom sintezom (SuSy), enzimima koji su uzajamno koordinisani u svojoj aktivnosti: smanjenje aktivnosti invertaze dovodi do smanjenja kvantitativnog odnosa heksoza u odnosu na saharozu u heksoznom depou, što će usloviti povećanje aktivnosti saharozne sintaze (SuSy) i veću konverziju saharoze u fruktozu i uridin-difosfat glukozu (UDP-Glukozu). Količina/dostupnost saharoze dovodi do koordinisane regulacije enzima *saharozne sintaze* i *ADP-glukozne pirofosforilaze* na transkripcionom i post-transkripcionom nivou. Regulacija transkripcije ADP-glukozne pirofosforilaze dovodi do brzih promena na nivou transkripta, ali relativno sporih promena u sintezi samog proteina (enzima). Sa druge strane, brza regulacija ekspresije i sinteze *ADP-glukozne pirofosforilaze* kao odgovor na sadržaj saharoze su posredovani i drugim mehanizmom, koji uključuje redoks-aktivaciju gena. Ovaj regulatorni mehanizam u prenosu signala se dešava u početku faze skladištenja (akumulacijom skroba i rezervnih proteina), a biohemijski i genetički dokazi sugerišu da je aktivnost enzima saharozne sintaze u pozitivnoj korelaciji sa vitalnošću („snagom“) organa za deponovanje („ušća“ asimilata).

Nefotosintetički plastidi (amiloplasti, hromoplasti) imaju transportere koji posreduju pri transportu heksoza-fosfata. Ukoliko se sinteza skroba dešava u amiloplastima, ona je u potpunosti zavisna od translokacije metabolita iz citoplazme (primarno, G6P, G1P i ADP-Glukoze) kroz omotač amiloplasta. Asimilovani ugljenik za sintezu skroba ulazi u amiloplast u obliku specifičnog glukoznog translokatora koji se nalazi u unutrašnjoj membrani amiloplasta. Nakon usvajanja G6P, ili G1P u amiloplast, sinteza skroba se odvija preko već opisanog biohemijskog puta polimerizacije glukoze i formiranja glikanskih lanaca amiloze i amilopektina.

Put biosinteze skroba u endospermu žitarica (raž, ječam, pirinač i sl.) sličan je ranije opisanom mehanizmu sinteze skroba u amiloplastima organa za deponovanje, kao što je krtola krompira. Nalivanje zrna je metabolički proces preraspodele asimilata od izvora (fotosintetički organi – listovi) do ušća (organi za deponovanje – zrna u klasu) i odnosi se na sintezu skroba u zrnu od saharoze preko serije enzimski kontrolisanih reakcija. Brojni ključni enzimi: *ADP-glukozna pirofosforilaza*, rastvorljive *skrobne sintaze* (SSs), od kojih je veoma važan enzim *skrobna sintaza vezana za granule* (GBSS), zatim *enzimi grananja* (SBEs), kao i *enzimi koji cepaju i odvajaju glukanske lance na mestima grananja* (DBE), učestvuju u sintezi skroba u endospermu žitarica. Enzimi koji katališu sintezu skroba najčešće su prisutni kao izoenzimske familije (izozimi), razlikuju se u aminokiselinskim sekvencama iako katališu iste reakcije (izoenzimi, izozimi), istovremeno, mogu formirati multienzimске katalitičke komplekse sa drugim izoenzimima.

Zrna u klasu žitarica snabdevaju se saharozom preko floema, u procesu koji se naziva „nalivanje zrna“, što

je ključno za preraspodelu asimilata i ekonomski prinos (količinu asimilata u organima za skladištenje). Saharoza-protonski simport i aktivnost apoplastne invertaze (INV ćelijskog zida) su od ključnog značaja za ovu fazu razvića biljaka.

Količina saharoze koja floemom dolazi u zrno klasa ima ulogu molekuskog signala, utiče pozitivno na sintezu skroba u zrnu i na povećanje prinosa.

1.5.6. Transport (translokacija) asimilata

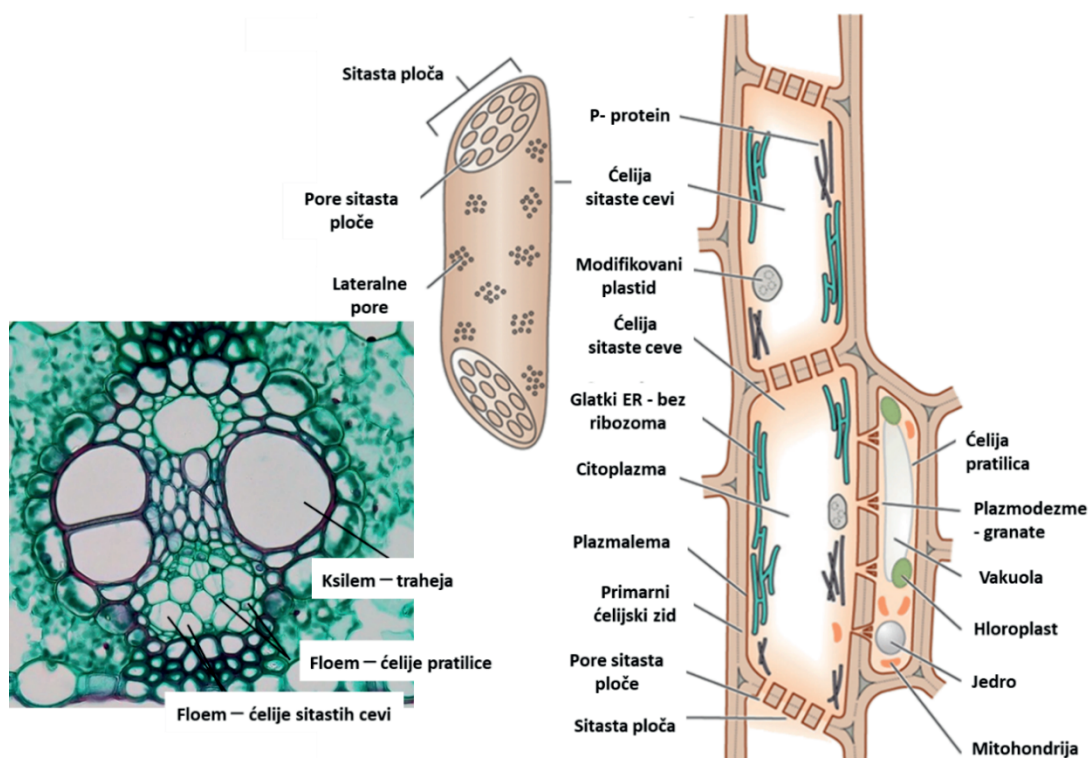
Transport, ili preraspodela fotosintetičkih asimilata od mesta njihove sinteze („izvor“) do mesta iskorištavanja za metaboličke potrebe i skladištenja („ušće“), određuje preraspodelu asimilata, odnosno, organsku produkciju: vegetativni i generativni prinos.

Postoje dva glavna vaskularna transportna puta vode i rastvorenih materija na veće udaljenosti, to su ksilemski i floemski. *Ksilem* predstavlja tkivo specifične strukture sa ulogom u transportu vode i mineralnih materija-nutrijenata od korena ka nadzemnom delu biljke. Sastoji se od traheidnih elemenata koji tokom diferencijacije gube plazmalemu i ćelijske organele, dolazi do lignifikacije sekundarnih ćelijskih zidova i kao rezultat nastaju nežive cevaste strukture visoko adaptirane na održavanje pozitivnog hidrostatskog pritiska neophodanog za transport vode i neorganskih materija na veće udaljenosti.

Za razliku od ksilemskih neživih struktura (traheidnih elemenata), *floem* čine žive ćelije (floemski elementi), organizovane u tkivo prilagođeno funkciji translokacije produkata fotosinteteze, pre svega ugljenih hidrata od izvora asimilata (fotosintetičkih organa – listova) do mesta njihovog iskorištavanja za potrebe metabolizma, odnosno, do mesta njihovog skladištenja. U vodenom toku kroz floem, zajedno sa ugljenim hidratima, ostvaruje se (re)distribucija različitih supstanci i metabolita, te signalnih molekula u biljnim tkivima i organima čime je obezbeđena transmisija signala između izvora i ušća asimilata i koordinisano rastenje i razviće biljaka. Stoga su žive ćelije floema i njihov metabolizam od ključne važnosti za funkcionisanje mehanizma translokacije supstanci kroz biljku.

Floem sadrži četiri specijalizovana tipa ćelija za obavljanje svoje specifične funkcije transporta organskih materija, to su:

- Sitaste cevi - neprekidni nizovi živih ćelija sa ključnom ulogom u translokaciji amino-kiselina i šećera (asimilata). U bliskom kontaktu su sa ćelijama pratilacama;
- Ćelije pratilice – žive ćelije preko kojih se odvija transport asimilata „u“ i „iz“ sitastih cevi;
- Floemska vlakna – nežive sklerenhimske ćelije, koje pružaju strukturnu potporu provodnim elementima;
- Parenhimske ćelije floema (floemski parenhim) – kompaktno raspoređene ćelije oko provodnog snopića, snabdevaju floem asimilatima (šećerima) i daju metaboličku podršku ćelijama pratilicama i sitastim cevima (**Sl. 1.69**).



Sl. 1.69. Poprečni presek provodnog snopića sa ksilemskim i floemskim elementima (Elektronski izvori slika, str. 97); Šematski prikaz floemskih elemenata, sitastih cevi i čelija pratileca. Adaptirano prema Taiz i sar., (2018); Elektronski izvori slika, str. 102.

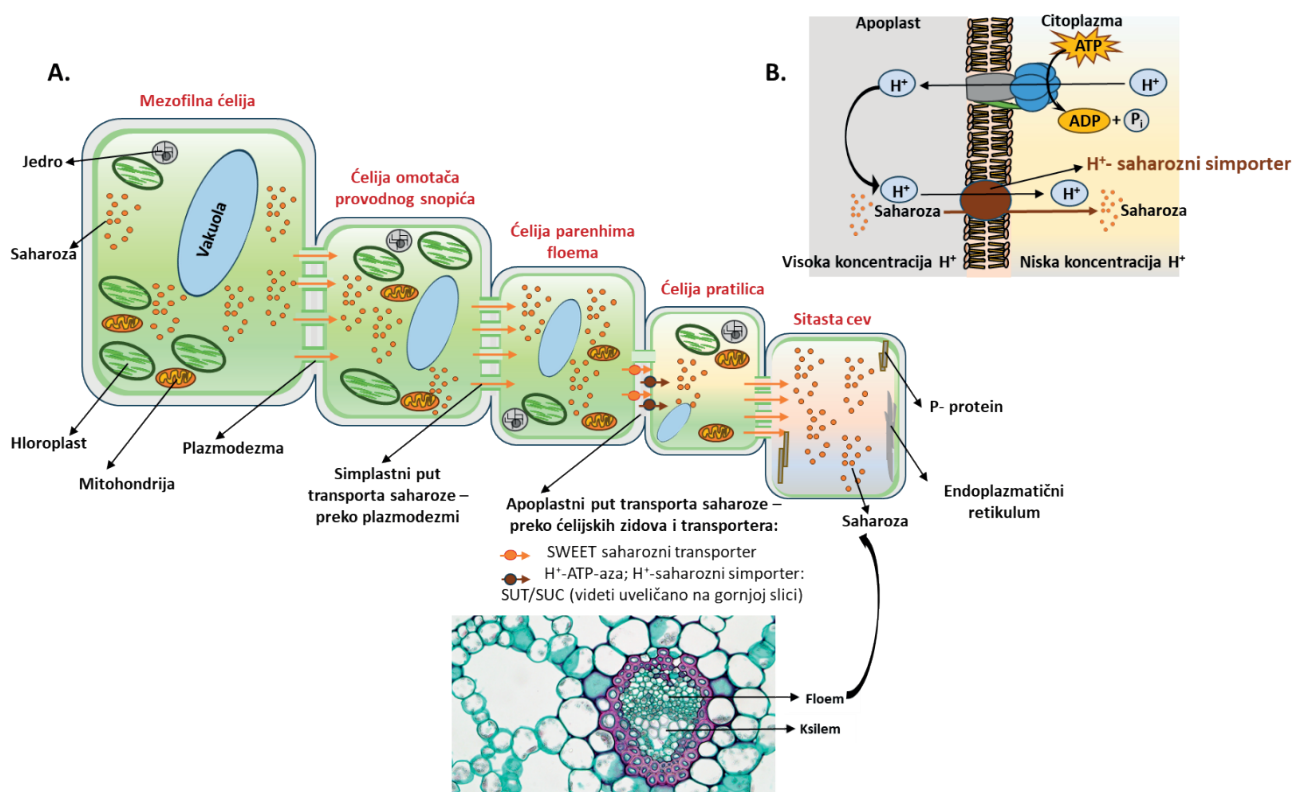
Specifične ćelijske adaptacije sitastih cevi i čelija pratileca koje su isključivo karakteristične za angiosperme (više biljke, skrivenosemenice) omogućavaju efikasan transport u vodi rastvorenih metabolita.

Sitaste cevi sačinjene su od longitudinalnih nizova ćelija koje su povezane preko poprečno postavljenih *sitastih ploča*, koje predstavljaju otvorene kanale između ćelija. Preko poprečno postavljenih sitastih ploča na distalnim krajevima ćelijskih nizova sitastih cevi, njihovi protoplasti su povezani i asimilati (šećeri, amino-kiseline) se kreću od ćelije do ćelije simplastno (preko citoplazmi). Čelije koje grade sitaste cevi nemaju jedro, vakuole (tonoplast) i imaju značajno redukovani broj organela (manje i od nediferenciranih ćelija od kojih su postale), čime je omogućeno maksimalno uvećavanje zapremine ovih ćelijskih asocijacija za transport asimilata. Njihovi debeli i čvrsti ćelijski zidovi obezbeđuju im održavanje visokog hidrostatičkog pritiska tokom translokacije čemu svakako doprinosi i potpora od strane floemskih sklerenhimskih vlakana (**Sl. 1.69**). Treba istaći da se u sitastim cevima, odnosno u floemskom soku nalaze strukturni proteini, tzv. P-proteini koji imaju veoma važnu funkciju sprečavanja izlivanja soka floema kada dođe do mehaničkih povreda, jer gubitak floemskog sadržaja (eksudacijom/suzenjem) predstavlja energetska gubitak za biljku. P-proteini, koji kod potpuno razvijenog floema tubularnog (cevastog), odnosno, fibrilarnog izgleda imaju važnu funkciju zarastanja povređenog floemskog tkiva i sprečavanje oticanja floemskog soka. Pored P-proteina, koji brzo nakon povrede zatvaraju otvoreni floem, i glukozni polimer, kaloza u ćelijskom zidu ima važnu ulogu u zarastanju oštećenog tkiva (floema).

Čelije pratilece imaju važnu ulogu u translokaciji organskih materija, jer pune sitaste cevi asimilatima (na nivou izvora asimilata), a istovremeno i apsorbuju asimilate iz sitastih cevi i prenose ih u organe za skladištenje (na nivou ušća asimilata). One sadrže veći broj mitohondrija za proizvodnju ATP-a neophodnog za ATP-aze i aktivni transport asimilata. Sadrže takođe i brojne ribosome neophodne za sintezu proteina-enzima (**Sl. 1.69**).

1.5.6.1. Punjenje floema: snabdevanje floema asimilatima iz izvora asimilata – fotosintetičkog tkiva

Inicijalni transport fotosintata na kratke udaljenosti od ćelija mezofila do floema (u provodnom snopiću lista) može se odvijati apoplastnim ili simplastnim putem. Simplastni put transporta šećera postoji u slučaju kada je ceo transport asimilata ostvaren simplastno – kroz jedinstveni funkcionalni prostor protoplasta spojenih preko plazmodezmi (Sl. 1.70A), dok je apoplastni put uvek samo delom ostvaren kada se šećeri (asimilati) primarno od mezofilnih ćelija transportuju kroz simplast, ali ulaze u apoplast ćelija omotača provodnih sudova (parenhim floema) pre nego će se transportovati u ćelije pratilice, iz kojih se opet, simplastom preko plazmodezmi, „ulivaju“ u sitaste cevi (Sl. 1.70B).



Sl. 1.70. Transport saharoze (asimilata) od mezofilnih ćelija lista (izvor) preko floemskih elemenata do sitastih cevi (A); Apoplastni put transporta saharoze: sekundarni aktivni transport preko saharoznog H⁺ simportera (B). Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 102.

Prema tome, može se zaključiti da je transport asimilata od mezofilnih ćelija do floema (provodnih snopića) najvećim delom ostvaren simplastom, preko plazmodezmi, a da se apoplastni put transporta (kroz ćelijske zidove i prostore između ćelijskih zidova i plazmalema) dešava na mestu ulaska šećera u ćelije pratilice iz floemskog parenhima (ćelija omotača provodnih snopića). Plazmodezme imaju ključnu ulogu u ćelijskoj komunikaciji, jer se preko njih simplastno, transportuju i brojni signalni molekuli.

Količina saharoze koja je na raspolaganju biljci za izvoz u floem, rezultat je uspostavljene ravnoteže između procesa skladištenja u vakuolama i nagomilavanje u obliku skroba u hloroplastima ćelija mezofila. Iz mezofilnih ćelija (izvora fotoasimilata), saharoza dospeva u ćelije parenhima floema preko plazmodezmi. U ćelijama pratilicama, saharoza može da se u različitom obimu, prevodi u veće molekule, najčešće rafinozu, uzastopnim dodavanjem galaktozilnih ostataka (rafinoza je trisaharid: glukoza+fruktoza+galaktoza), čime

je onemogućeno vraćanje ovih većih molekula u ćelije parenhima floema, već se oni transportuju prema sitastim cevima). Punjenje floema aktivnim transportom je neophodno zbog postojanja koncentracijskog gradijenta gde je značajno viša koncentracija rastvorenih materija u floemu (kompleksu sitaste cevi/ćelije prtilice) nego u parenhimu floema, odnosno u mezofilnim ćelijama okolnog tkiva. Kod brojnih biljnih vrsta dokazano je da mehanizam aktivnog punjenja floema iz apoplasta pored jonskih/protonskih pumpi (H^+ -ATP-aza), uključuje transportere saharoze (i većih molekula šećera, kao i šećernih alkohola – poliola). Ovi transporteri mogu da koncentrišu šećere u floemskom kompleksu (sitaste cevi i ćelije prtilice) iskorištavanjem protonskog gradijenta nastalog aktivnošću H^+ -ATP-aze i potom u simportu H^+ i saharoze, što predstavlja sekundarni aktivni transport. Oslobođanje saharoze u apoplastu u blizini sitastih cevi i ćelija prtilica može biti ostvareno i preko drugih jonskih transportera, odnosno kanala (nedavno otkriveni kompleks za olakšani transport šećera SWEET). Drugi mehanizam za aktivno punjenje floema je *simplastno* prenošenje polimera, pri čemu se saharoza pretvara u rafinozu ili veće molekule šećera u parenhimu floema. Mora se napomenuti da aktivno punjenje floema nije isključivo i univerzalno, jer postoje eksperimentalni dokazi da se u punjenje floema mogu uključiti i mehanizmi pasivnog transporta, što se postiže metaboličkim održavanjem visokih koncentracija rastvorenih materija u ćelijama mezofila (izvora asimilata). Koncentracija saharoze u sitastim cevima i ćelijama prtilicama je veća od njene koncentracije u okolnim ćelijama, što ukazuje da je za translokacija saharoze nasuprot koncentracijskom (hemijskom) gradijentu ostvarena *aktivnim transportom*, aktivnošću enzima ATP-aza (**Sl. 1.70B**).

1.5.6.2. Pražnjenje floema: odavanje asimilata iz floema u tkiva/ organe za deponovanje (ušće asimilata)

Saharoza se iz sitastih cevi uz pomoć specifičnih proteinskih prenosioca (transportera – SUT1/SUC2), unosi u ćelije prtilice, odnosno u parenhimske ćelije floema ili se konvertuje u heksoze pomoću invertaza ćelijskog zida (INV) (**Sl. 1.70A**). U ćelijama organa za deponovanje asimilata, heksoze se uz pomoć specifičnih prenosioca lociranih u plazmalemi i/ili tonoplastu nakupljaju u specifičnim organelama (vakuolama, plastidima – amiloplastima i dr.). Saharoza u ćelijama ušća asimilata može biti iskorišćena kao supstrat za ćelijsko disanje i produkciju ATP-a, čime je omogućen rast organa, zatim može biti deponovana kao skrob u amiloplastima, ili dalje prevedena u heksoze pomoću vakuolarne invertaze i deponovana u vakuolama.

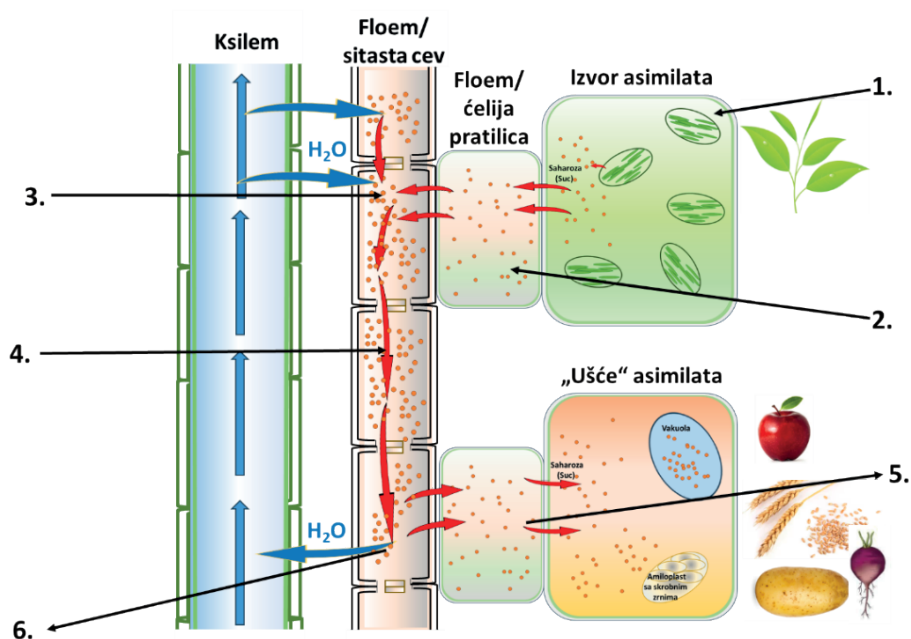
Preraspodela asimilata od njihovog izvora do ušća preko floemskog toka zavisi od ćelijskog metabolizma i hidrostatičkog pritiska u provodnim elementima, tako da se može reći da je translokacija floemom pod uticajem ćelijskog metabolizma i faktora spoljašnje sredine. Takođe, treba istaći da se floemom ne transportuju rastvorene materije isključivo descendentno (od nadzemnog izdanka ka korenu), niti postoji uticaj gravitacije. Stoga je najispravnije reći da se *materije u floemskom soku premeštaju iz biljnih delova u kojima se stvaraju (izvora asimilata – fotosintetičkih organa) u nefotosintetičke biljne delove u kojima postoji metabolička potreba za njima, ili se deponuju (ušće asimilata)*.

Hemijska analiza floemskog soka pokazuje specifičnost zavisno od biljne vrste, starosti (faze ontogenetskog razvića), ekoloških činilaca i dr., ali generalno, najzastupljenije supstance koje se kreću sitastim cevima rastvorene u vodi su: ugljeni hidrati, amino-kiseline, organske kiseline, proteini, neki mineralni elementi i njihove soli (kalijum, magnezijum, fosfati, hloridi). Od azotnih jedinjenja u floemskom soku su najzastupljenije amino-kiseline, posebno glutamat i aspartat, kao i njihovi amidi. Već je pomenuto da se u sitastim cevima, odnosno, u floemskom soku nalaze strukturni P-proteini. U malim količinama tu su i molekuli RNK (informacione RNK, patogene RNK, kao i mali regulatorni RNK molekuli), zatim, nukleotidni fosfati, kao i fitohormoni (auksini, giberelini, citokinini, ABA).

Transport asimilata po modelu „protoka mase“ (engl. Mass-Flow, ili Pressure-Flow):

Translokacija rastvorenih supstanci u floemskom soku koja uključuje povezano funkcionisanje sitastih cevi i ćelija pratilica, te usvajanje vode u floem iz ksilemskih elemenata pasivno, duž vodnog gradijenta, odnosno osmotskog i turgorskog potencijala, je najšire prihvaćeni model mehanizma transporta asimilata od njihovog izvora (mesta sinteze) do ušća (mesta korišćenja, odnosno skladištenja). Ova hipoteza floemskog transporta, prvi put predložena od strane istraživača Ernesta Minha (nem. Ernest Münch) još 1930. godine, je prilagođena na osnovu rezultata brojnih istraživanja, ali su njene osnovne postavke, ostale iste. Naime, kretanje rastvorenih materija u floemskom soku podstiče razliku u osmotskom potencijalu između izvora i ušća asimilata, što izaziva usvajanje vode u floem (iz ksilema), stvaranje razlike u hidrostatičkom pritisku između izvora i ušća asimilata i posledično, protok mase kroz floem duž gradijenta ukupnog vodnog potencijala.

Ksilem i floem su ćelijske strukture koje zajedno čine provodni (vaskularni) snopić. Ksilem uglavnom transportuje vodu i rastvorene mineralne elemente (nutrijente), ascendentno, od korena do listova biljke. Kretanje vode pokreće transpiracija, tako što odavanje vode sa površine listova generiše snižavanje vodnog/osmotskog potencijala u vršnim delovima biljke, a to je pumpa za kontinuirano usvajanje vode korenom. Nekompresibilnost vode omogućava transport duž gradijenata hidrostatičkog pritiska (**Sl. 1.71**). Rastvorene organske supstance u soku floema se translociraju na ovaj način do tkiva i organa koji predstavljaju ušće asimilata, gde se izbacuju iz sitastih cevi (gore opisano pražnjenje floema). Kada organi za deponovanje usvoje saharozu (i ostale organske supstance iz floemskog soka), vodni potencijal floemskog soka (Ψ_w) raste (postaje manje negativan), i voda osmozom izlazi iz floema i vraća se u ksilem. Povećani hidrostatički pritisak u ksilemu na nivou ušća asimilata omogućava zajedno sa delovanjem transpiracione pumpe, da se voda kreće ascendentno ksilemom ka izvoru asimilata, gde će opet biti osmotski usvojena u floem. Na ovaj način se održava razlika u hidrostatičkim potencijalima (Ψ_p) između soka ksilema i soka floema i stvara se gradijent ukupnog vodnog potencijala (Ψ_w) u oba provodna sistema od izvora do ušća asimilata, što sve obezbeđuje translokaciju asimilata od njihovog izvora do ušća po modelu „protoka mase“.



Sl. 1.71. Transport asimilata prema hipotezi „Protoka mase“. Nastanak hidrostatičkog pritiska (turgorskog potencijala Ψ_p) u floemu (sitastim cevima floema) sa ulaskom vode iz ksilema i nakon toga protok mase (engl. „mass flow“, ili „pressure flow“) – strujanje vode kroz sitaste cevi duž gradijenta hidrostatičkog pritiska (turgora) u njima.

Oznake na slici odgovaraju sledećim ključnim procesima:

1. Na nivou izvora asimilata, sinteza saharoze snižava osmotski potencijal u mezofilnim ćelijama, što omogućava pasivnu apsorpciju vode iz okolnih ćelija (duž gradijenta Ψ_w). Istovremeno, saharoza se transportuje aktivno, u simportu u floem (nasuprot koncentracijskog gradijenta);
2. Nakupljanje šećera/saharoze u ćelijama pratilicama koje su glavni dobavljači saharoze za sitaste cevi; transport saharoze simplastno i apoplastno, aktivnim transportom (u simportu preko H^+ -saharoznih transportera) u sitaste cevi;
3. Nakupljanje rastvorene saharoze snižava Ψ_π , odnosno, ukupni Ψ_w floemskog soka, što omogućava „uvlačenje“ vode u floem iz susednog ksilema (pasivno osmotsko kretanje);
4. Voda koja je ušla u floem stvara veliki hidrostatski pritisak, odnosno, veliki turgorski potencijal floemskog soka ($+\Psi_p$) u regionu izvora asimilata, što je pokretač njegovog toka sa mesta višeg, ka mestu nižeg turgorskog potencijala u procesu koji se naziva „**protok mase**“;
5. Šećeri rastvoreni u soku floema se u regionu „ušća“ asimilata uklanjaju i uglavnom, simplatno, duž gradijenta Ψ_π odlaze u ćelije pratilice, a potom u ćelije tkiva i organa za deponovanje organskih materija, gde se transformišu u skrob (ili druge organske materije). Skrob nije osmotski aktivna supstanca, te se stoga u ovakvom biohemijskom putu održava gradijent Ψ_π , od soka floema do ćelija za deponovanje asimilata;
6. Uklanjanje šećera dovodi do povećanja hidrostatskog pritiska floemskog soka u regionu „ušća“ asimilata ($+\Psi_p$), što opet, uzrokuje da voda napusti floem i vrati se u ksilem (pasivno kretanje vode duž gradijenta potencijala). Odlazak vode iz floema u ksilem smanjuje turgor ($+\Psi_p$) floemskog soka na nivou organa za deponovanje, tako da se na taj način održava gradijent hidrostatskog pritiska u floemskom soku neophodan za „protok mase“ između izvora i ušća asimilata

Kretanje vode iz ksilema u floem je pasivno, omogućeno gradijentom vodnog/osmotskog potencijala između ksilema i sitastih cevi floema: saharoza sintetisana u citoplazmi fotosintetičkih ćelija transportuje se aktivno (sekundarno aktivno) i simportno, u ćelije pratilice (pomoćne ćelije), a zatim na isti način i u sitaste cevi floema. Akumulisana osmotski aktivna saharoza izaziva snižavanje osmotskog potencijala rastvora u sitastim cevima u odnosu na rastvor u ksilemu, što je pokretač pasivnog transporta vode duž gradijenta osmotskog potencijala: iz ksilema (viši Ψ_π) u floem (niži Ψ_π).

Kao što se može zaključiti iz gore navedenog, fizičko-hemijski procesi koji uključuju stvaranje osmotskog (Ψ_π), turgorskog (Ψ_p), odnosno, ukupnog vodnog potencijala (Ψ_w), te njihove promene i odnos (balans) u provodnim elementima, ksilemu i floemu, određuju transport asimilata od izvora do ušća. Da bi se održao stalni tok (propulzija) floemskog soka u sitastim cevima, gradijent Ψ_w u ksilemskim sudovima zahteva srazmerno povećanje koncentracije floemskog soka. Hidraulični gradijent pritiska neophodan za maseni protok, ostvaruje se uzajamnim odnosom vodnih potencijala u ksilemskim i floemskim ćelijskim elementima, tako da voda cirkuliše pasivno između njih i nosi asimilate.

1.5.7. Fotosinteza i prinos

Fotosinteza je proces koji obezbeđuje kiseonik aerobnim organizmima, utiče na klimu i pokreće biološke procese, uključujući sintezu organske materije i prinos biomase biljnih populacija. Biljna proizvodnja, odnosno stvaranje organske materije (za hranu, ogrev i dr.) je zavisna od brojnih procesa, kompleksnih i međusobno uslovljenih, koji se dešavaju na različitim nivoima, počev od molekulskog i subćelijskog (pigmenti, proteini/enzimi, membrane, hloroplasti i dr.), na nivou tkiva i organa, kao i na nivou biljne populacije. Poboljšanje efikasnosti, odnosno, produktivnosti fotosinteze u biljnim zajednicama (poljoprivrednim usevima,

šumama, makrofitskim vodenim populacijama i dr.), je ključno za povećanje organske produkcije – prinosa, kao i za unapređenje proizvodnje hrane i energenata. Stoga programi oplemenjivanja i selekcije biljaka za veću organsku produkciju u svom središtu imaju manipulacije fotosinteze na genetičkom, metaboličkom i fenotipskom nivou. Međutim, jasnu nedvosmislenu korelaciju između intenziteta fotosinteze na ćelijskom nivou (po jedinici lisne površine ili mase), prinosa organske materije cele biljke i prinosa cele biljne zajednice, često teško naučno dokazati. Ovo se dešava zbog kompleksnosti samog procesa fotosinteze i uticaja povratne sprege koju na fotosintezu/metabolizam imaju preovlađujući uslovi spoljašnje sredine i dinamika rasta i razvića biljaka.

I pored pomenutih ograničenja, važan i očigledan izazov u cilju pravljenja strategija za poboljšanje organske produkcije i prinosa useva je rešavanje ključnog pitanja: da li je regulacija fotosinteze u usevima podložna poboljšanju i kako se to može uraditi.

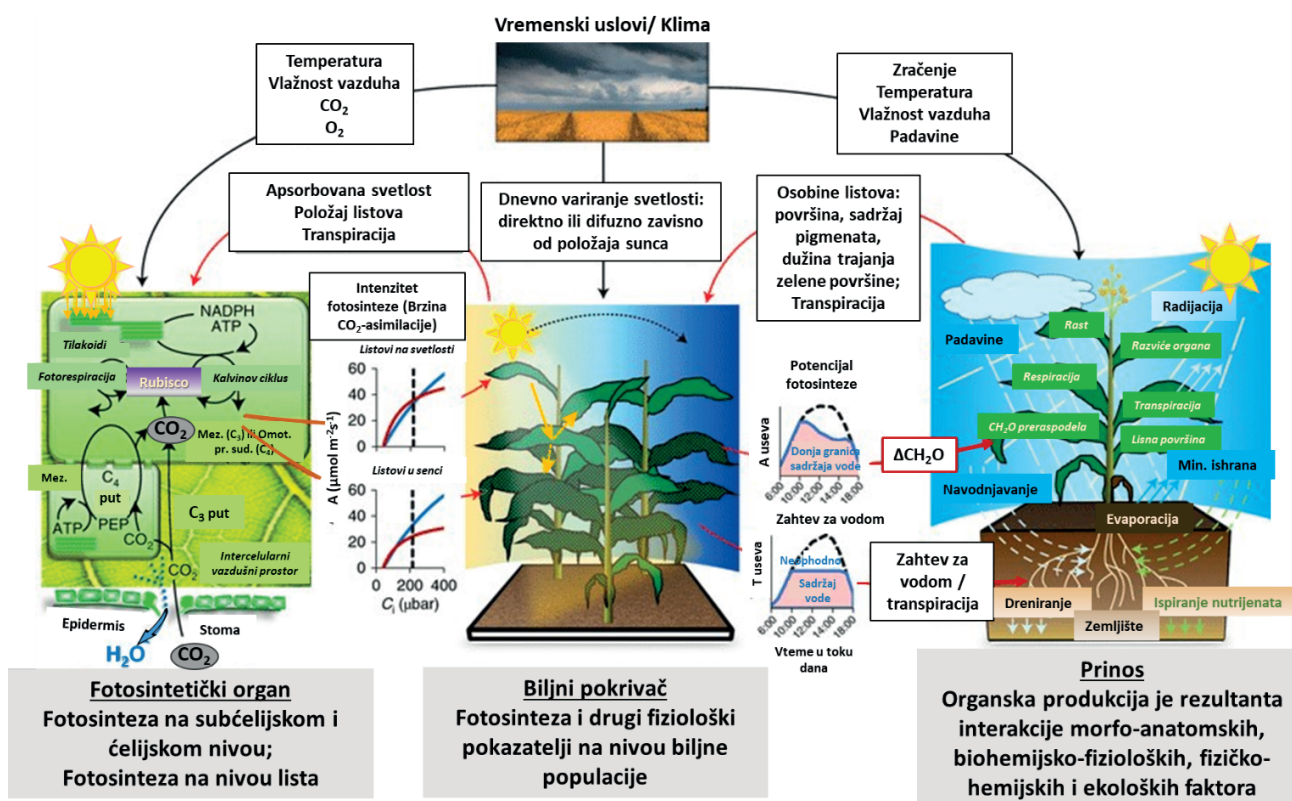
Šta određuje ukupnu biljnu produkciju i prinos?

Prinos se odnosi na sintetisanu organsku materiju u procesu fotosinteze koja je akumulisana u organima za deponovanje (ono što se požanje, ili ubere) i predstavlja izvor energije za metaboličke potrebe samih biljaka, kao i heterotrofnih organizama. Kada se govori o prinosu, najčešće se referiše na tzv. žetveni prinos, koji predstavlja količinu deponovane organske materije u jestivim delovima biljaka, kao što su semena i plodovi (kukuruz, suncokret, žitarice, mahunarke i sl.), zatim korenu i podzemnim organima (šargarepa, peršun, celer, krompir i sl.), te listovima (salata, spanać, kupus i dr.). Stoga se žetveni prinos najčešće izražava u kg/ha useva. Najvažniji generalni zaključak brojnih istraživanja je da *produkcija biomase, odnosno prinos useva, najviše zavisi od kumulativnog efekta fotosintetičke aktivnosti tokom celog perioda razvića biljaka, odnosno, od dužine trajanja fotosinteze (vegetativne sezone) tokom životnog ciklusa biljaka.*

Centralna uloga fotosinteze u proizvodnji organske materije dobro je proučena, tako da je na osnovu brojnih rezultata istraživanja omogućeno modelovanje fotosintetičkog odgovora specifične biljne vrste u konkretnim ekološkim uslovima, kao i projekcija prinosa u zavisnosti od limitirajućih faktora koji utiču na fotosintezu.

Najvažniji parametri, koji su istovremeno i pouzdani fiziološki markeri za prinos su:

- Intenzitet fotosinteze, odnosno, fotosintetička brzina razmene gasova po jedinici lisne površine i u jedinici vremena ($\mu\text{mol usvojenog CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} / \mu\text{mol izdvojenog O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$);
- Efikasnost fotosinteze – efikasnost apsorpcije svetlosne energije za fotosintetičke svetlosne reakcije. Biljke prevode svega 0,1 do 2% svetlosne energije preko fotosinteze u hemijsku energiju, što je veoma nisko i brojna biohemijska i molekularna istraživanja na nivou svetle faze fotosinteze: apsorpcija svetlosti od strane pigmenata, transport elektrona, sinteza ATP i NADPH, kao i na nivou karboksilacije: sinteza i aktivnost Rubisco, sinteza produkata i dr. vođena su idejom o povećanju ove granice;
- Efikasnost prevođenja svetlosne energije u biomasu i žetveni prinos – udeo energije akumulisane u žetvenim delovima biljke, u odnosu na ukupnu akumulisanu energiju u fotosintezi, što predstavlja količnik između poljoprivrednog i biološkog prinosa, ili žetveni indeks: odnos mase semena/ plodova i mase cele biljke;
- Dužina vegetacionog perioda, odnosno, dužina trajanja fotosintetičke asimilacije u usevu;
- Osobine biljne zajednice/useva: broj biljaka i njihov raspored u usevu, što utiče na dostupnost svetlosti, vode, nutrijenata i u vezi s tim, stepen adaptabilnosti biljaka na uslove sredine (fenotipsku plastičnost) (**Sl. 1. 72**).



Sl. 1.72. Fotosintetički parametri – biološki/fiziološki markeri za procenu organske produkcije na nivou ćelije, lista, fotosintetičkog organa i u biljnoj populaciji – usevu, koji se najčešće uzimaju kao okvir za modelovanje odnosa fotosinteza – prinos, odnosno za procenu (žetvenog) prinosa useva u konkretnim uslovima sredine. Adaptirano prema Wu i sar., (2019) Elektronski izvori slika, str. 102.

Efikasnost fotosinteze je parametar kome se intenzivno posvećuje pažnja u brojnim istraživanjima zbog toga što je efikasnost prevođenja svetlosti u hemijsku energiju procesom fotosinteze izuzetno niska, oko 2%, odnosno maksimalno 2% ukupnog sunčevog zračenja koje padne na Zemlju se iskorišćava za stvaranje organske materije. Zbog toga su biofizička, biohemijska, molekularna i genetička ispitivanja procesa apsorpcije, transporta i prevođenja svetlosne energije na nivou fotosintetičkih jedinica (PS I i PS II) izuzetno zastupljena, a rezultati predstavljaju pouzdane indikatore fotosintetičke efikasnosti iskorišćavanja svetlosne energije i njeno prevođenje u hemijsku energiju sadržanu u ATP i NADPH. Za definisanje efikasnosti fotosinteze najznačajnije je ispitati efekat različitih abiotičkih faktora, posebno kada imaju ekstremne vrednosti i predstavljaju stresore metabolizma.

Biljke su sesilni organizmi izloženi konstantnom uticaju brojnih abiotičkih činilaca, koji često zbog svojih ekstremnih vrednosti deluju kao stresori, sa štetnim efektima na strukturu i funkciju fotosintetičkog aparata. Preveliki intenziteti svetlosti kojima su izložene biljke, dovode do pojave *fotoinhibicije* – (trajnog) smanjenja efikasnosti prevođenja sunčeve energije u fotosintetičke produkte i smanjenja ukupnog fotosintetičkog kapaciteta/efikasnosti. Pored visokih svetlosnih intenziteta, nepovoljni faktori sredine, kao što su nedostatak vode i/ili nutrijenata, visoka i niska temperatura, toksičnost teških metala i zagađenje vazduha, mogu da odrede u kom trenutku svetlost koju apsorbuju pigmenti hlorofila fotosintetskih jedinica, postaje prekomerna za potrebe samog procesa fotosinteze.

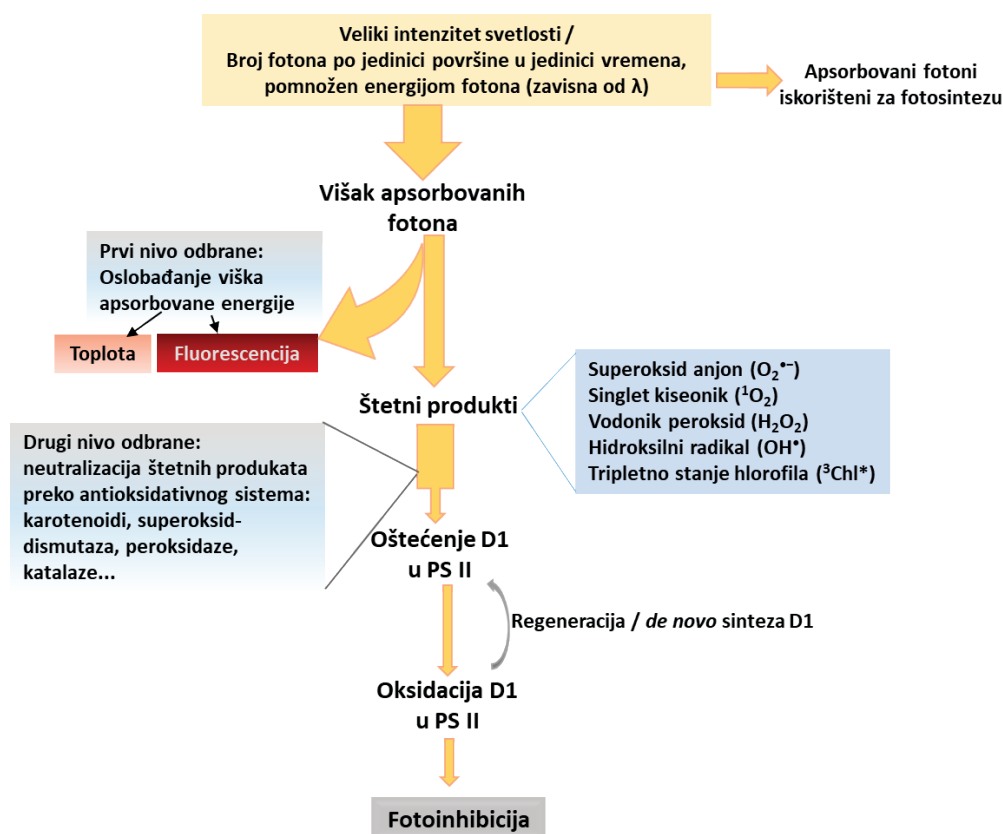
1.5.8. Fotoinhibicija

Fotoinhibicija je široko rasprostranjena pojava kod fotosintetičkih organizama koja za posledicu ima smanjenje fotosintetičkih brzina razmene gasova, odnosno, smanjenje efikasnosti i produktivnosti fotosinteze pod uticajem prekomerne svetlosti (po svom intenzitetu, kvalitetu i dužini trajanja). U najširem kontekstu, fotoinhibicija se može definisati kao svetlošću-indukovano smanjenje asimilacije CO_2 /zdvajanja O_2 , što je posledica stvaranja slobodnih radikala (reaktivnih kiseoničnih molekulskih vrsta, ROS) i fotooksidativnog oštećenja komponenti fotosintetskog aparata. Zbog toga je fotoinhibicija stanje fiziološkog stresa u kome se nalazi biljka izložena prekomernoj radijaciji. Rezultati brojnih istraživanja izdvajaju PSII kao podložniji fotoinhibiciji u odnosu na PSI, a primarno oštećenje fotosintetičkog aparata se dešava na nivou reakcionog centra fotosistema II (RC PS II) kada količina apsorbirane svetlosti od strane antena pigmenata prevazilazi količinu svetlosne energije (broja fotona po jedinici površine) koji se može iskoristiti za ekscitaciju ostalih komponenti transporta elektrona do terminalnog akceptora.

Fotoinhibicija u listovima biljaka kao fiziološki odgovor, često se izjednačava sa fotooštećenjem i smatra se odgovornom za smanjen rast i produktivnost biljaka. Stepenn fotoinhibicije zavisi od ravnoteže između fotooštećenja i mehanizama adaptacije u smislu obnavljanja PSII fotosintetičkih jedinica.

Opšta molekularna šema fotoinhibitornog delovanja svetlosti u središtu ima stvaranje reaktivnih kiseoničnih molekulskih vrsta (ROS), gde dominantno spadaju slobodni radikali: $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{OH}^{\cdot}$ i neradikalne molekulske forme: H_2O_2 i $^1\text{O}_2$. Izuzetno reaktivni kiseonični radikali su odgovorni za oštećenje reakcionih centara u fotosistemima, prvenstveno u PSII. Nastanak slobodnih kiseoničnih radikala, za posledicu ima izmenu naboja između akceptorske i donorske strane PSII i prekomernu redukciju, odnosno, prekomerno nakupljanje elektrona u primarnom akceptoru PSII, a to je feofitin i potom, plastohinon (PQ). Mnoge studije sprovedene u cilju tumačenja molekularnih mehanizama fotoinhibicije, potvrdile su destruktivno delovanje ROS u samom procesu, ali ne direktno, već preko inhibicije sinteze proteina, čime se smanjuje regeneracija PSII. Na taj način, do fotooštećenja PSII dolazi zbog poremećaja u sintezi Mn-klastera za oslobađanje O_2 i poremećaja u sintezi proteina samog PS II (pre svega, D1 proteinske subjedinice). Istovremeno, generisani slobodni radikali kao signalni molekuli u sintezi proteina-enzima, dovode do poremećaja u sintezi pigmenata i elektronskih transportera naophodnih za funkcionisanje svetle faze fotosinteze (**Sl. 1.73**).

Zaštita od fotooštećenja je proces na više nivoa. Prvi nivo odbrane je suzbijanje oštećenja fotosistema preko gašenja ekscitacije – rasipanja viška apsorbiranih fotona, kao toplote. Ako ovaj nivo odbrane nije dovoljan, dolazi do stvaranja toksičnih fotoproizvoda – slobodnih kiseoničnih radikala (ROS), što uslovljava aktivaciju različitih fiziološko-biohemijskih mehanizama za njihovu neutralizaciju. Ako i ovaj drugi nivo odbrane ne rezultira neutralizacijom fotoproizvoda (ROS), dolazi do oštećenja D1 proteinskih subjedinica PS II, što se ispoljava kao fotoinhibicija – fiziološko stanje poremećaja fotosintetičke aktivnosti usled prevelike radijacije. U procesu regeneracije, D1 protein se izdvaja iz reakcionog centra PS II i razgrađuje, dolazi do sinteze novih proteinskih subjedinica koje se ponovo ugrađuju u RC PS II da bi se formirala funkcionalna fotosintetička jedinica – PS II (**Sl. 1.73**).



Sl. 1.73. Fotoinhibicija i mehanizmi zaštite od fotooštećenja PS II.

Kako je u proteklih nekoliko decenija ustanovljeno da je suštinska karakteristika fotosintetskog aparata, smanjenje (kvantne) efikasnosti fotosinteze izazvano prevelikom radijacijom, fenomen fotoinhibicije je izuzetno proučavan korišćenjem biohemijskih, biofizičkih, molekularnih i genetičkih pristupa. Fluorescencija hlorofila je jedna od najkorišćenijih eko-fizioloških i bio-fizičkih tehnika za proučavanje efikasnosti fotosintetičkog prevođenja svetlosti u hemijsku energiju stvorenih asimilata. Izučavanje/merenje *fluorescencije hlorofila* je izuzetno korišćeno u izučavanju fotosinteze biljaka, posebno u uslovima sredine koji nisu optimalni.

Tako npr. u definisanju fotosintetičke efikasnosti, veoma značajne informacije pružaju podaci dobijeni merenjem *fluorescencije hlorofila*, a parametar *Fv/Fm* (*odnos varijabilne i maksimalne fluorescencije hlorofila*) se često ispituje, jer je izuzetno senzitivni indikator efikasnosti fotosinteze i ukazuje na stres kome su biljke potencijalno izložene tokom celog vegetacionog perioda.

Šta je *fluorescencija hlorofila* i parametar: „Kvantni prinos fotosinteze (*Fv/Fm*)“?

Nakon apsorpcije svetlosti od strane PS II – antena molekula hlorofila, stvorena energija ekscitacije u PS II troši se na energiju koja obezbeđuje fotohemijsku aktivnost samog PS II, toplotnu energiju i fluorescenciju (daleka crvena svetlost). U fotosintetički aktivnom listu, u uslovima stabilnog stanja fotosinteze, oko 80% apsorbirane energije ide na fotohemijsku komponentu (za obezbeđivanje karbonske asimilacije), oko 17% se oslobađa kao toplotna energija i vrlo mali deo, oko 3%, se reemituje kao fluorescencija hlorofila. Promena kvantitativnog odnosa ove tri komponente rasipanja energije ekscitacije ukazuje na poremećaj u toku fotosinteze. Korišćenje fluorescencije hlorofila kao indikatora fotosintetičke aktivnosti moguće je zbog činjenice da ona potiče iz istih ekscitiranih molekula koji se alternativno mogu koristiti za fotohemijsko prevođenje energije. Osim toga, u *in vivo* uslovima, promene fluorescencije potiču gotovo isključivo od molekula hlorofila a koji se nalaze u PS II (uključujući i „antena“ pigmente), tako da se preko fluorescencije *in vivo*,

brzo i lako dobijaju informacije o korišćenju energije ekscitacije u PS II: fotohemijska efikasnost PS II i fluorescencija obrnuto su proporcionalne. U uslovima slabije svetlosti reakcioni centri fotosistema II se dovoljno brzo reoksiduju, tako da putevi u transportu elektrona ostaju slobodni, što znači da veći deo ukupne energije ide za fotohemijsku aktivnost, a samo mali deo se gubi u obliku fluorescencije. U uslovima svetlosnog zasićenja veliki deo reakcionih centara fotosistema II je redukovani i značajni deo energije ekscitacije se rasipa kao fluorescencija, istovremeno raste i odavanje energije ekscitacije u obliku toplote. Prema tome, parametri fluorescencije hlorofila emitovane iz PS II mogu da se koriste kao kvantitativni indikatori fotohemijske aktivnosti/efikasnosti PS II, tako da svaka promena u fluorescenciji ukazuje na inhibiciju, odnosno oštećenja u transportu elektrona.

Veza između fluorescencije hlorofila i fotohemijske aktivnosti PS II (kvantnog prinosa) može se sagledati preko sledećih parametara indukcije fluorescencije: F_0 (početna – u listovima adaptiranim na mrak), F_m (maksimalna, odmah nakon osvetljavanja zasićujućom svetlošću – u kratkom periodu indukcije fotosinteze), F_v ($F_m - F_0$), F_v/F_m (kvantni prinos PS II – fotohemijska efikasnost).

Fotohemijska efikasnost PS II u uslovima kada se zanemaruje gašenje (prvenstveno zbog ΔpH), tj. u brznoj fazi indukcije fluorescencije, proporcionalna je parametru F_v/F_m . Ovaj parametar je u velikoj meri stabilan u optimalnim životnim uslovima bez obzira na taksonomsku grupu, ekološko poreklo, ili životnu formu biljaka i vrednost mu se kreće oko 0.8. Stoga se F_v/F_m koristi kao parametar u detektovanju oštećenja u PS II izazvanih nepovoljnim životnim uslovima biljaka (visoke i niske temperature, fotoinhibicija, suša itd.).

Biotehnološki pristup u programima istraživanja u cilju izrade strategija za poboljšanje fotosintetičke efikasnosti odnosi se na prikupljanje pouzdanih naučnih rezultata koji omogućavaju definisanje zavisnosti prinosa od fotosintetičkih parametara, te izradu modela korelacija za predviđanje prinosa u konkretnim agro-ekološkim uslovima. Istraživanja koja obezbeđuju podatke za ovo modelovanje uticaja fotosinteze na prinos, sprovode se na različitim genotipovima, kao i na nivou specifičnih komponenti/ segmenata kompleksnog mehanizma fotosinteze, to su:

- *Istraživanja na nivou svetlih reakcija* - ispituju se parametri povezani sa transportom elektrona (već pomenuto ispitivanje kvantnog prinosa F_v/F_m ; fotohemijsko i nefotohemijsko gašenje fluorescencije i dr.), kao i molekularna organizacija i funkcionisanje fotosistema, uključujući i antenske pigmentne komplekse;
- *Istraživanja na nivou usvajanja CO_2* – ispituju se procesi na nivou stomatalne/mezofilne provodljivosti za gasove (CO_2 , O_2 , H_2O), morfo-anatomska svojstva fotosintetičkih organa i dr;
- *Istraživanja na nivou tamnih reakcija* – ispituju se intermedijeri i enzimi Calvin-Bensonovog ciklusa, mehanizmi aktivacije, kinetike aktivnosti i regeneracije enzima Rubisco i dr;
- *Istraživanja fotorespiracije* – ispituje se uticaj ekoloških/ klimatskih činilaca na celokupni metabolizam i potencijalne energetske gubitke u vezi sa fluktuacijom gasova u atmosferi; adaptacije;
- *Istraživanja na nivou uticaja mineralne ishrane* – ispituje se zavisnost fotosinteze od sadržaja nutrijenata i zagađivača, posebno se ispituje efikasnost iskorištavanja azota (NUE, engl. Nitrogen Use Efficiency) u sintezi proteina, kao i efikasnost iskorištavanja vode (WUE, engl. Water Use Efficiency) u sintezi asimilata;
- *Istraživanja na nivou transporta i preraspodele fotoasimilata* – ispituju se brojni biotički i abiotički faktori koji određuju akumulaciju organske materije u žetvenim organima (organima za deponovanje).

Biotehnološki pristup u različitim, a istovremeno povezanim segmentima istraživanja podrazumeva fiziološka, biohemijska, molekularna i posebno, genetička istraživanja ekspresije gena za sintezu proteina/ enzima koji upravljaju celokupnim metabolizmom i fotosintetičkom produkcijom.

Ova molekularno-genetička istraživanja u novije vreme zauzimaju centralno mesto u svim programima selekcije genotipova visokog i kvalitetnog (žetvenog) prinosa. Tako se npr. ispituje uticaj faktora sredine na sintezu karboksilaze, fosforilaze, fosfataze, ATP-aze itd. Otkrivanje gena za određena svojstva, te specifičnih faktora koji utiču na njihovu ekspresiju, epigenetičko nasleđivanje svojstava itd. imaju primarni značaj za genske manipulacije, introdukovanje određenih gena u specifične genotipove, kreiranje transgenih biljaka da bi se dobili poželjni prinosi.

1.6 Literatura

- Alboresi A, Storti M, Morosinotto T. (2019): Balancing protection and efficiency in theregulation of photosynthetic electron transport across plant evolution. *New Phytologist*, 221: 105–109. <https://doi.org/10.1111/nph.15372>
- Allen JF, Forsberg J. (2001): Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends in Plant Science*, 6(7): 317–326. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02010-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02010-6)
- Anderson JM. (1992): Cytochrome b₆f complex: Dynamic molecular organization, function and acclimation. *Photosynthesis Research*, 34: 341–357. <https://doi.org/10.1007/BF00029810>
- Arnon ID, Chain KR. (1975): Regulation of ferredoxin-catalyzed photosynthetic phosphorylations. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(12): 4961–4965. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.12.4961>
- Badger MR, von Caemmerer S, Ruuska S, Nakano H. (2000): Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1402): 1433–1446. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0704>
- Bag P, Shutova T, Shevela D, Lihavainen J, Nanda S, Ivanov A, Messinger J, Jansson S. (2023): Flavodiiron-mediated O₂ photoreduction at photosystem I acceptor-side provides photoprotection to conifer thylakoids in early spring. *Nature Communications*, 1: 3210. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38938-z>
- Baker NR. (1996). Photoinhibition of Photosynthesis. In: Jennings, R.C., Zucchelli, G., Ghatti, F., Colombetti, G. (Eds.). *Light as an Energy Source and Information Carrier in Plant Physiology*. NATO ASI Series, vol 287. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0409-8_7
- Balmer Y, Vensel WH, Cai N, Manieri W, Schürmann P, Hurkman WJ, Buchanan BB. (2006): A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8): 2988–2993. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511040103>
- Baniulis D, Yamashita E, Zhang H, Hasan SS, Cramer WA. (2008): Structure–Function of the Cytochrome b₆f Complex. *Photochemistry and Photobiology*, 84: 1349–1358. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00444.x>
- Barber J, Archer MD. (2001): P680, the primary electron donor of photosystem II. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 142(2–3): 97–106. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(01\)00503-2](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00503-2)
- Barber J. (2002): P680: what is it and where is it? *Bioelectrochemistry*, 55(1–2): 135–138. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00141-4)
- Barrera Zambrano VA, Lawson T, Olmos E, Fernández-García N, Borland AM. (2014): Leaf anatomical traits which accommodate the facultative engagement of crassulacean acid metabolism in tropical trees of the genus *Clusia*. *Journal of Experimental Botany*, 65(13): 3513–3523. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru022>
- Bhaduri, S., Singh, S.K., Cohn, W., Hasan, S.S., Whitelegge, J.P., Cramer, W.A. (2020): A novel chloroplast super-complex consisting of the ATP synthase and photosystem I reaction center. *PloS ONE* 15(8): e0237569. <https://doi.org/10.1371/>
- Bhatla SC, Lal MA. (2023): Source-to-Sink Translocation of Photoassimilates. In: *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer, Singapore. pp. 155–171 https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1_6
- Biology Teach. Pristupljeno 15. marta 2024. <https://biologyteach.com/pigments-in-plants/>
- Bojović M, Nikolić N, Borišev M, Pajević S, Župunski M, Horak R, Pilipović A, Orlović S, Stojnić S. (2017): The diurnal time course of leaf gas exchange parameters of pedunculated oak seedlings to experimental drought conditions. *Baltic Forestry*, 23(3): 584–594.
- Buchanan BB. (1994): The Ferredoxin-Thioredoxin System: Update on its Role in the Regulation of Oxygenic Photosynthesis. *Advances in Molecular and Cell Biology*, 10: 337–354. [https://doi.org/10.1016/S1569-2558\(08\)60401-4](https://doi.org/10.1016/S1569-2558(08)60401-4)
- Chen XY Kim JY. (2009): Callose synthesis in higher plants. *Plant Signalling & Behavior*, 4(6): 489–492. <https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8359>
- Chikaraishi Y, Tanaka R, Tanaka A, Ohkouchi N. (2009): Fractionation of hydrogen isotopes during phytol biosynthesis. *Organic Geochemistry*, 40(5): 569–573. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.02.007>
- Dey P, Datta D, Pattnaik D, Dash D, Saha D, Panda D, Bhatta BB, Parida S, Mishra UN, Chauhan J, Pandey H, Singhal RK. (2022): Chapter 5 - Physiological, biochemical, and molecular adaptation mechanisms of photosynthesis and respiration under challenging environments. In: Tariq Aftab, Aryadeep Roychoudhury (Eds). *Plant Perspectives to*

- Global Climate Changes*. Academic Press, pp. 79-100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85665-2.00003-0>
- Fernie AR, Willmitzer L, Trethowey RN. (2002): Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *Trends in Plant Science*, 7(1): 35–41. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02183-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02183-5)
- Ferreira K, Iverson T, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S. (2004): Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving centre. *Science*, 303: 1831–1838. <https://doi.org/10.1126/science.1093087>
- Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J. (2012): Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 63(4): 1637–1661. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers013>
- Fromme P, Jordan P, Krauß N. (2001): Structure of photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1507(1-3): 5–31. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00195-5)
- Geigenberger P. (2003): Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *Journal of Experimental Botany*, 54(382): 457–465. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg074>
- Ghildiyal MC, Sharma-Natu P. (2000): Photosynthetic acclimation to rising atmospheric carbon dioxide concentration. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38(10): 961–966.
- Govindjee Shevela D, Björn, LO. (2017): Evolution of the Z-scheme of photosynthesis: a perspective. *Photosynthesis Research*, 133: 5–15. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0333-z>
- Guidi L, Piccolo EL, Landi M. (2019): Chlorophyll Fluorescence, Photoinhibition and Abiotic Stress: Does it Make Any Difference the Fact to Be a C3 or C4 Species? *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00174>
- Gutbrod K, Romer J, Dörmann P. (2019): Phytol metabolism in plants. *Progress in Lipid Research*, 74: 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.002>
- Hahn A, Vonck J, Mills DJ, Meier T, Kühlbrandt W. (2018): Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase. *Science*, 360 (6389): eaat 4318. <https://doi.org/10.1126/science.aat4318>
- Hajirezaei MR, Takahata Y, Trethowey RN, Willmitzer L, Sonnewald U. (2000): Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. *Journal of Experimental Botany*, 51: 439–445. https://doi.org/10.1093/jexbot/51.suppl_1.439
- Hase R, Oikawa H, Sasao C, Morita M, Watanabe Y (2000): Photosynthetic production of microalgal biomass in a race-way system under greenhouse conditions in Sendai city. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(2): 157–163. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)88730-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88730-7)
- Hashida SN, Miyagi A, Nishiyama M, Yoshida K, Hisabori T, Kawai-Yamada M. (2018): Ferredoxin/thioredoxin system plays an important role in the chloroplastic NADP status of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 95, 947–960. <https://doi.org/10.1111/tpj.14000>
- Hatch MD, Slack CR. (1966): Photosynthesis by sugar-cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *The Biochemical Journal*, 101(1): 103–111. <https://doi.org/10.1042/bj1010103>
- Hatch MD. (2002): C4 photosynthesis: discovery and resolution. *Photosynthesis Research*, 73 (1-3): 251–256. <https://doi.org/10.1023/A:1020471718805>
- Heinemann IU, Jahn M, Jahn D. (2008): The biochemistry of heme biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 474(2): 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.015>
- Hisabori T, Sunamura E, Kim Y, Konno H. (2013): The chloroplast ATP synthase features the characteristic redox regulation machinery. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(15): 1846–1854. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.504>
- Hodson MJ, Bryant JA. (2012): Functional Biology of Plants. Ed: Wiley – Blackwell (A John Wiley & Sons, Ltd., Publication) UK, p. 326. ISBN: 978-0-470-69940-9 – ISBN: 978-0-470-69939-3
- Horak R, Župunski M, Pajević S, Borišev M, Arsenov D, Nikolic N, Orlović S. (2019): Carbon assimilation in oak (*Quercus spp.*) populations under acute and chronic high-temperature stress. *Photosynthetica*, 57(3): 875–889. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.090>
- Huang T, Tan H, Zhang C, Li Q, Liu Q. (2021): Starch biosynthesis in cereal endosperms: An updated review over the last decade. *Plant Communications*, 2(5): 100237. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100237>
- Hultine KR, Cushman JC, Williams DG. (2019): New perspectives on crassulacean acid metabolism biology. *Journal of Experimental Botany*, 70(22): 6489–6493. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz465>

- Ignatova L, Rudenko N, Zhurikova E, Borisova-Mubarakshina M, Ivanov B. (2019): Carbonic Anhydrases in Photosynthesizing Cells of C₃ Higher Plants. *Metabolites*, 16; 9(4): 73. <https://doi.org/10.3390/metabo9040073>
- Jägerbrand AK, Kudo G. (2016): Short-Term Responses in Maximum Quantum Yield of PSII (Fv/Fm) to ex situ Temperature Treatment of Populations of Bryophytes Originating from Different Sites in Hokkaido, Northern Japan. *Plants*, 265(2): 22. <https://doi.org/10.3390/plants5020022>
- Jiang Z, Chen Q, Chen L, Yang H, Zhu M, Ding Y, Li W, Liu Z, Jiang Y, Li G. (2021): Efficiency of Sucrose to Starch Metabolism Is Related to the Initiation of Inferior Grain Filling in Large Panicle Rice. *Frontiers in Plant Science*, 12: 732867. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.732867>
- Kastori, R. (1998): Fiziologija biljaka. Feljton, Novi Sad, str. 527. ISBN 0943088399.
- Kazama T, Hayakawa K, Kuwahara VS, Shimotori K, Imai A, Komatsu K. (2021): Development of photosynthetic carbon fixation model using multi-excitation wavelength fast repetition rate fluorometry in Lake Biwa. *PLoS ONE*, 16(2): e0238013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238013>
- Kerena N, Krieger-Liszkay A. (2011): Photoinhibition: molecular mechanisms and physiological significance. *Physiologia Plantarum*, 142: 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01467.x>
- Kok B, Forbush B, McGloin M. (1970): Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochemistry and Photobiology*, 11(6): 457–475. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1970.tb06017.x>
- Kolling DR, Brown TS, Ananyev G, Dismukes GC. (2009): Photosynthetic oxygen evolution is not reversed at high oxygen pressures: Mechanistic consequences for the water-oxidizing complex. *Biochemistry*, 48(6): 1381–1389. <https://doi.org/10.1021/bi801774f>
- Lawlor DW. (1995): Photosynthesis, productivity and environment, *Journal of Experimental Botany*, 46: 1449–1461. https://doi.org/10.1093/jxb/46.special_issue.1449
- Lehmann M, Vamvaka E, Torrado A, Jahns P, Dann M, Rosenhammer L, Aziba A, Leister D, Rühle T. (2021): Introduction of the carotenoid biosynthesis α -branch into *Synechocystis* sp. PCC 6803 for lutein production. *Frontiers in Plant Science*, 12: 699424. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699424>
- Ludwig, M. (2016): The Roles of Organic Acids in C₄ Photosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 17 (7): 647. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00647>
- Ma M, Liu Y, Bai C, Yang Y, Sun Z, Liu X, Zhang S, Han X, Yong JWH. (2021): The Physiological Functionality of PGR5/PGRL1- Dependent Cyclic Electron Transport in Sustaining Photosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 12: 702196. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.702196>
- MacNeill G, Mehrpouyan S, Minow MAA, Patterson JA, Tetlow IJ, Emes MJ. (2017): Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. *Journal of Experimental Botany*, 68 (16): 4433–4453. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx291>
- Mai KKK, Peng G, Kang BH (2020): Electron Microscopy Views of Dimorphic Chloroplasts in C₄ Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01020>
- Majeran, W., van Wijk, K.J. (2009): Cell-type-specific differentiation of chloroplasts in C₄ plants. *Trends in Plant Science* 14 (2): 100–109. ISSN 1360-1385. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.006>
- Malone LA, Proctor MS, Hitchcock A, Hunter CN, Johnson MP. (2021): Cytochrome b6f – Orchestrator of photosynthetic electron transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1862(5): 148380. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148380>
- Mehler AH, Brown AH. (1952): Studies on reactions of illuminated chloroplasts. III. Simultaneous photoproduction and consumption of oxygen studied with oxygen isotopes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 38(1): 365–370. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(52\)90042-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(52)90042-8)
- Menon BRK, Hardman SJO, Scrutton NS, Heyes DJ. (2016): Multiple active site residues are important for photochemical efficiency in the light-activated enzyme protochlorophyllide oxidoreductase (POR). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 161: 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.05.029>
- Michelet L, Zaffagnini M, Morisse S, Sparla F, Pérez-Pérez ME, Francia F, Danon A, Marchand CH, Fermani S, Trost P, Lemaire SD. (2013): Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new. *Frontiers in Plant Science*, 4: 470. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00470>
- Mott KA, Woodrow IE. (2000): Modelling the role of Rubisco activase in limiting non-steady-state photosynthesis. *Jour-*

- nal of Experimental Botany*, 51(1): 399–406. https://doi.org/10.1093/jexbot/51.suppl_1.399
- Mula S, Savitsky A, Möbius K, Lubitz W, Golbeck JH, Mamedov MD, Semenov AY, Van der Est A. (2012): Incorporation of a high potential quinone reveals that electron transfer in Photosystem I becomes highly asymmetric at low temperature. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11: 946. <https://doi.org/10.1039/C2PP05340C>
- Mustila H, Paananen P, Battchikova N, Santana-Sánchez A, Muth-Pawlak D, Hagemann M, Aro EM, Allahverdiyeva Y. (2016): The Flavodiiron Protein Flv3 Functions as a Homo-Oligomer During Stress Acclimation and is Distinct from the Flv1/Flv3 Hetero-Oligomer Specific to the O₂ Photoreduction Pathway. *Plant Cell Physiology*, 57(7): 1468–1483. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw047>
- Nagata R, Fujihashi M, Sato T, Atomi H, Miki K. (2018): Identification of a pyrophosphate-dependent kinase and its donor selectivity determinants. *Nature Communications*, 9: 1765. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04201-z>
- Najafpour MM, Allakhverdiev SI. (2012): Manganese compounds as water oxidizing catalysts for hydrogen production via water splitting: From manganese complexes to nano-sized manganese oxides. *International Journal of Hydrogen Energy* 37: 8753 e8764. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.075>
- Nelson EA, Sage TL, Sage RF. (2005): Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology*, 32(5): 409–419. <https://doi.org/10.1071/FP04195>
- Okegawa Y, Basso L, Shikanai T, Motohashi K. (2020): Cyclic Electron Transport around PSI Contributes to Photosynthetic Induction with Thioredoxin f. *Plant Physiology*, 184(3): 1291–1302. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00741>
- Oxborough K, Baker NR. (1997): Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv/Fm without measuring Fo. *Photosynthesis Research*, 54: 135–142. <https://doi.org/10.1023/A:1005936823310>
- Pajević S, Borišev M, Nikolić N, Krstić B, Pilipović A, Orlović S. (2009): Phytoremediation capacity of Poplar (*Populus* spp.) and Willow (*Salix* spp.) clones in relation to photosynthesis. *Archives of Biological Sciences*, 61(2): 239–247. <https://doi.org/10.2298/ABS0902239P>
- Pajević S, Borišev M, Orčić D, Boža P, Nikolić N. (2010): Photosynthetic and biochemical characteristics of invasive species (*Ambrosia artemisiifolia* L., *Ambrosia trifida* L. and *Iva xanthifolia* Nutt.) depending on soil humidity and phenological phase. *Russian Journal of Ecology*, 41(6): 498–505. <https://doi.org/10.1134/S1067413610060068>
- Pan X, Ma J, Su X, Cao P, Chang W, Liu Z, Zhang X, Li M. (2018): Structure of the maize photosystem I supercomplex with light-harvesting complexes I and II. *Science*, 360(6393): 1109–1113. <https://doi.org/10.1126/science.aat115>
- Paul S, Neese F, Pantazis DA. (2017): Structural models of the biological oxygen-evolving complex: achievements, insights, and challenges for biomimicry. *Green Chemistry*, 19: 2309–2325. <https://doi.org/10.1039/c7gc00425g>
- Plant Biochemistry. Chapter: The Calvin cycle catalyzes photosynthetic CO₂ assimilation. Besides the reductive pentose phosphate pathway there is also an oxidative pentose phosphate pathway. https://www.brainkart.com/subject/Plant-Biochemistry_257/ pristupljeno: 24. aprila 2024.
- Raines CA, Lloyd JC, Dyer TA. (1999): New insights into the structure and function of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; an important but neglected Calvin cycle enzyme. *Journal of Experimental Botany*, 50(330): 1–8. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.330.1>
- Sagun JV, Badger MR, Chow WS, Ghannoum O. (2021): Mehler reaction plays a role in C3 and C4 photosynthesis under shade and low CO₂. *Photosynthesis Research*, 149(1-2): 171–185. <https://doi.org/10.1007/s11120-021-00819-1>
- Sato R, Ito H, Tanaka A. (2015): Chlorophyll b degradation by chlorophyll b reductase under high-light conditions. *Photosynthesis Research*, 126: 249–259. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0145-6>
- Schürmann P, Buchanan BB. (2008): The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidants & Redox Signalling*, 10(7): 1235–1274. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1931>
- Scoffoni C, Chatelet DS, Pasquet-kok J, Rawls M, Donoghue MJ, Edwards EJ, Sack L. (2016): Hydraulic basis for the evolution of photosynthetic productivity. *Nature Plants*, 2: 16072. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.72>
- Seung D. (2020): Amylose in starch: towards an understanding of biosynthesis, structure and function. *New Phytologist*, 228: 1490–1504. <https://doi.org/10.1111/nph.16858>
- Shakya RA, Lal, M. (2018). Photoassimilate Translocation. In: *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer, Singapore. pp. 227–251. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_6
- Shen YH, Yang FY, Lu BG, Zhao WW, Jiang T, Feng L, Jing Cheng X, Ming R. (2019): Exploring the differential mecha-

- nisms of carotenoid biosynthesis in the yellow peel and red flesh of papaya. *BMC Genomics*, 20: 49. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5388-0>
- Shikanai T (2014): Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 26: 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.012>
- Shikanai T (2014): Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 26: 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.012>
- Shikanai T. (2016): Chloroplast NDH: A different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(7): 1015–1022. <https://doi.org/10.1016/j.bba-bio.2015.10.013>
- Shpilyova AV, Zinchenko VV, Shestakova SV, Grimm B, Lokstein, H. (2005): Inactivation of the geranylgeranyl reductase (ChlP) gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1706: 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.11.001>
- Sikolia S, Beck E, Onyango JC. (2009): Carbon Dioxide Compensation Points of Some Dicots of the Centrospermeae Species and Their Ecological Implications for Agroforestry. *International Journal of Botany*, 5: 67–75. <https://doi.org/10.3923/ijb.2009.67.75>
- Sirpiö S, Kanervo E, Aro E-M. (2013): Photosystem II: Assembly and Turnover of the D1 Protein. Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition), In: William J. Lennarz, M. Daniel Lane (Eds.). Academic Press, pp. 508–511. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786302002279>
- Slack CR, Hatch MD. (1967): Comparative studies on the activity of carboxylases and other enzymes in relation to the new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in tropical grasses. *The Biochemical Journal*, 103(3): 660–665. <https://doi.org/10.1042/bj1030660>
- Solymosi K, Mysliwa-Kurdziel B. (2021): The Role of Membranes and Lipid-Protein Interactions in the Mg-Branch of Tetrapyrrole Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.663309>
- Spreitzer RJ, Salvucci ME. (2002): Rubisco structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 449–475. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135233>
- Staehelin LA. (2003): Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* 76: 185–196. <https://doi.org/10.1023/a:1024994525586>
- Stata M, Sage TL, Hoffmann N, Covshoff S, Wong GKS, Sage RF. (2016): Mesophyll Chloroplast Investment in C3, C4 and C2 Species of the Genus *Flaveria*. *Plant and Cell Physiology*, 57(5): 904–918. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw015>
- Stein O, Granot D (2019): An Overview of Sucrose Synthases in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 10: 95. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00095>
- Streb S, Egli B, Eicke S, Zeeman SC. (2009): The debate on the pathway of starch synthesis: a closer look at low-starch mutants lacking plastidial phosphoglucomutase supports the chloroplast-localized pathway. *Plant Physiology*, 151(4): 1769–72. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144931>
- Suorsa M. (2015): Cyclic electron flow provides acclimatory plasticity for the photosynthetic machinery under various environmental conditions and developmental stages. Review article. *Frontiers in Plant Science*, 6: 800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00800>
- Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. (2018): *Plant Physiology and Development*. International Sixth Edition, Oxford University Press, New York, p. 761. ISBN 9781605357454.
- Takaichi S. (2011): Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine drugs*, 9(6): 1101–1118. <https://doi.org/10.3390/md9061101>
- Tanaka R, Tanaka A. (2011): Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(8): 968–976. <https://doi.org/10.1016/j.bba-bio.2011.01.002>
- Terentyev VV. (2022): Macromolecular conformational changes in photosystem II: interaction between structure and function. *Biophysical Reviews*, 14: 871–886. <https://doi.org/10.1007/s12551-022-00979-x>
- Tsutsumi K, Kawasaki M, Taniguchi M, Itani T, Maekawa M, Miyake H. (2007): Structural and Functional Differentiation of Bundle Sheath and Mesophyll Cells in the Lamina Joint of Rice Compared with that in the Corresponding Region of the Liguleless Genotype. *Plant Production Science*, 10(3): 346–356. <https://doi.org/10.1626/pps.10.346>

- Vinyard DJ, Badshah SL, Riggio MR, Kaur D, Fanguy AR, Gunner MR. (2019): Photosystem II oxygen-evolving complex photoassembly displays an inverse H/D solvent isotope effect under chloride-limiting conditions. *The Proceedings of the National Academy of Sciences: Biochemistry*, 116(38): 18917–18922. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910231116>
- Wang Q, Quan S, Xiao H. (2019): Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply. *Biore-sources and Bioprocessing*, 6: 6. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0242-z>
- Weber PMA, Bar-Even A. (2019): Update: Improving the Efficiency of Photosynthetic Carbon Reactions, *Plant Physiology*, 179(3): 803–812. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01521>
- Willenbrink J. (2002): Assimilate Transport in Phloem: Regulation and Mechanism. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49: 8–15. <https://doi.org/10.1023/A:1013738208994>
- Wu A, Hammer GL, Doherty A, von Caemmerer S, Graham F. (2019): Quantifying impacts of enhancing photosynthesis on crop yield. *Nature Plants*, 5: 380–388. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0398-8>
- Yong-Ling R, Jin Y, Yang YJ, Li GJ, Boyer JS. (2010): Sugar Input, Metabolism, and Signaling Mediated by Invertase: Roles in Development, Yield Potential, and Response to Drought and Heat. *Molecular Plant*, 3(6): 942–955. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq044>
- Zhang S, Zou B, Cao P, Su X, Xie F, Pan X, Li M. (2023): Structural insights into photosynthetic cyclic electron transport, *Molecular Plant*, 16(1): 187–205. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.12.014>
- Zharova TV, Grivennikova VG, Borisov VB. (2023): F1-Fo ATP Synthase/ATPase: Contemporary View on Unidirectional Catalysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6): 5417. <https://doi.org/10.3390/ijms24065417>
- Zhu XG, Long SP, Ort DR (2010): Improving Photosynthetic Efficiency for Greater Yield. *Annual Review of Plant Biology*, 61:1, 235–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112206>
- Župunski M, Arsenov D, Borišev M, Nikolić N, Pajević S. (2021): Should I GROW or should I SLOW: A meta-analysis of fast-growing tree-species grown in cadmium perturbed environment. *Physiologia Plantarum*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppl.13594>

1.6.1. Elektronski izvori slika

- Sl.1.3.** Adaptirano prema licenci: Adaptirano prema Creative Commons Attribution – Share Alike 2.5 Generic, 2.0 Generic and 1.0 Generic license license. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f6/Chlorophyll_Absorption_Spectrum.svg/2560px-Chlorophyll_Absorption_Spectrum.svg.png
- Sl. 1.4.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution – Share Alike 3.0 Unported license. Subject to dis-claimers. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EM_spectrum.svg
- Sl. 1.5.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported [https://commons.wikime-dia.org/wiki/File:Backlit_green_poinsettia_leaf.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Backlit_green_poinsettia_leaf.jpg)
- Sl. 1.6.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International license https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/79/Cross_section_of_leaf.png
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simple_plant_and_animal_cell.svg
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Features_of_a_chloroplast.jpg
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thylakoid_membrane_4.svg
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leaf_spongy_mesophyll.jpg
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chloroplast_in_leaf_of_Anemone_sp_TEM_12000x.png
Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported, 2.5 Generic, 2.0 Generic and 1.0 Generic license:
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chloroplast.svg>
Creative Commons Attribution-Share Alike 2.0 Generic license:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chloroplast_30000x_%283660656624%29.jpg
- Sl. 1.7.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International, 3.0 Unported, 2.5 Gener-ic, 2.0 Generic and 1.0 Generic license https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scheme_Chloroplast-en.svg
- Sl. 1.8.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported <https://vcbio.science.ru.nl/en/image-gallery/show/print/PL0337/>
- Sl. 1.9.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported https://digfir-published.macmillanusa.com/pol2e/asset/img_ch6/c06_fig19.html
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/33/Chlorophyll_a_structure.svg/2560px-Chloro-

phyll_a_structure.svg.png

- Sl. 1.18.** Staehelin, L.A., Paolillo, D.J. (2020): A brief history of how microscopic studies led to the elucidation of the 3D architecture and macromolecular organization of higher plant thylakoids. *Photosynth Res.* 145: 237–258. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00782-3> <https://link.springer.com/article/10.1007/s11120-020-00782-3/figures/3>
Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution 4.0 International License. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0302_Phospholipid_Bilayer.jpg
- Sl. 1.19.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 Unported <https://alevelbiologystudent.weebly.com/uploads/2/5/8/3/25831232/published/733003896.jpeg?1482855196>
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Funzionamento_di_un_fotosistema.png
- Sl. 1.24.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution License; Attribution 4.0 International- CC BY 4.0 <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7e/PhotosystemII.PNG>
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/49/LHCII.jpg>
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b5/Photosystem_I.jpg
https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0021925820648426-gr1_lrg.jpg
- Sl. 1.28.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution License; Attribution 4.0 International- CC BY 4.0 <https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0237569.g001>
- Sl. 1.29.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution 4.0 International License. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1e/Photosystem_II_-_multilingual.svg/2225px-Photosystem_II_-_multilingual.svg.png
- Sl. 1.30.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution 4.0 International License. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.ade7190>
- Sl. 1.33.** Adaptirano prema: https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S098194281300435X-gr2_lrg.jpg
- Sl. 1.35.** Adaptirano prema: Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. (2018): Plant Physiology and Development. International Sixth Edition, Oxford University Press, New York, p. 761. ISBN 9781605357454.
- Sl. 1.36.** Adaptirano prema: Vlasov AV, Osipov SD, Bondarev NA, Uversky VN, Borshchevskiy VI, Yanyushin MF, Manukhov IV, Rogachev AV, Vlasova AD, Ilynsky NS, Kuklin AI, Dencher NA, Gordely VI. (2022): ATP synthase F_oF_1 structure, function, and structure-based drug design. *Cell. Mol. Life Sci.* 79: 179. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04153-0>
- Sl. 1.37.** Adaptirano prema: Zharova TV, Grivennikova VG, Borisov VB. (2023): F_1F_o ATP Synthase/ATPase: Contemporary View on Unidirectional Catalysis. *Int. J. Mol. Sci.* 24(6): 5417. <https://doi.org/10.3390/ijms24065417>
- Sl. 1.39.** Adaptirano prema: Alboresi A, Storti M, Morosinotto T. (2019): Balancing protection and efficiency in the regulation of photosynthetic electron transport across plant evolution. *New Phytol*, 221: 105-109. <https://doi.org/10.1111/nph.15372>
- 1.48.** Adaptirano prema: <https://www.encyclopedie-environnement.org/en/zoom/rubisco/>
- Sl. 1.51.** Michelet L, Zaffagnini M, Morisse S, Sparla F, Pérez-Pérez ME, Francia F, Danon A, Marchand CH, Fermani S, Trost P, Lemaire SD. (2013): Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new. *Front Plant Sci.* 4: 470. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00470> Adaptirano prema licenci: <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>
- Sl. 1.53.** Kreirano u: BioRender-u. Pajevic, S. (2025): <https://BioRender.com/f56y517>
- Sl. 1.54.** Adaptirano prema: <https://knowablemagazine.org/content/article/living-world/2022/how-to-make-corn-more-like-cactus>
A. Melissa Ha, Maria Morrow, and Kammy Algiers. Yuba College, College of the Redwoods, & Ventura College via ASCCC Open Educational Resources Initiative [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Botany/Botany_\(Ha_Morrow_and_Algiers\)/03%3A_Plant_Structure/3.04%3A_Leaves/3.4.02%3A_Internal_Leaf_Structure](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Botany/Botany_(Ha_Morrow_and_Algiers)/03%3A_Plant_Structure/3.04%3A_Leaves/3.4.02%3A_Internal_Leaf_Structure),
B Adaptirano prema licenci .Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International license. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8b/Zea_mays_leaf.jpg
- Sl. 1.55.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution 4.0 International License. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Corn_silk_in_a_field_by_Myrstigen_1.jpg
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sorghum_bicolor_-_geograph.org.uk_-_1070429.jpg

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amaranthus_retroflexus_kz10.jpg

- Sl. 1.56.** Adaptirano prema: Wojciech Majeran, W, van Wijk, K.J. (2009): Cell-type specific differentiation of chloroplasts in C_4 plants. Trends Plant Sci14 (2). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.006>
<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1360138509000235-gr1b1.jpg>
- Sl. 1.59.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 and 4.0 International license
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:AnanasComosusOnPlant.jpg>
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agave_chrysantha_in_Christchurch_Botanic_Gardens.jpg
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kroenleinia_grusonii_2014-10-12_02.jpg
- Sl. 1.60.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International license https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c1/Species_of_sunflower.jpg;
 Kreirano u BioRender-u. Pajević, S. (2025): <https://BioRender.com/c39f495>;
 Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0b/Zea_mays_003.JPG
 Adaptirano prema licenci: Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4c/Cross_section_of_maize%2C_a_C4_plant..jpg
- Sl. 1.61.** Krenirano u BioRender-u. Pajević, S. (2025): <https://BioRender.com/l95o630>
- Sl. 1.62.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons CC0 1.0 Universal Public Domain Dedication
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cc/Amylopectin_from_starch_granule.jpg
- Sl. 1.68.** Adaptirano prema: Stein O, Granot D. (2019). An Overview of Sucrose Synthases in Plants. Front Plant Sci. 10:95. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00095>
- Sl. 1.69.** Preuzeto iz Berkshire Community College Bioscience Image Library: <https://www.flickr.com/photos/146824358@N03/37215761790/in/album-72157680281173703/>
- Sl. 1.70.** Adaptirano prema licenci: Creative Commons licenca CC0 1.0 Universal Public Domain Dedication https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/67/Angiosperm_Leaf_Midrib_Vascular_Bundle_in_The_Hydrophyte_Potamogeton_%2836716448871%29.jpg
- Sl. 1.72.** Adaptirano prema: Wu A, Hammer G, Doherty A, Caemmerer S, Gragam F. (2019): Quantifying impacts of enhancing photosynthesis on crop yield. *Nat. Plants* 5: 380–388. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0398-8>

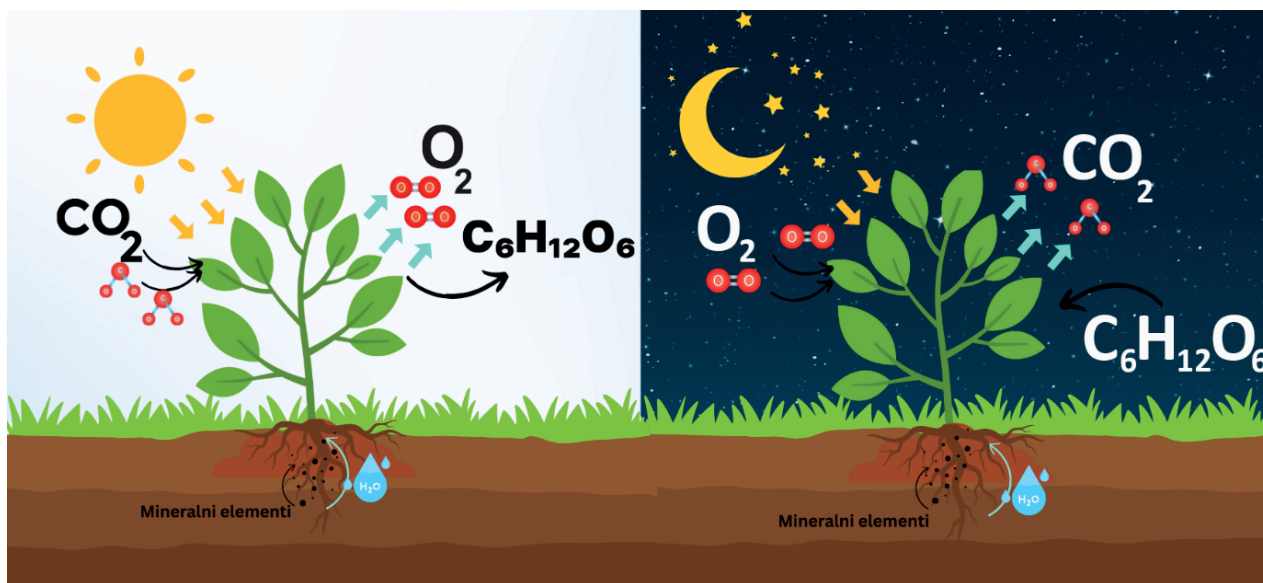
2. ĆELIJSKO DISANJE (RESPIRACIJA)

2.1. Bioenergetski i globalni značaj ćelijskog disanja biljaka

Biološki smisao: kontrolisana (oksidativna) razgradnja organskih molekula (fotoasimilata – primarno, saharoze/glukoze) i oslobađanje energije deponovane u njihovim hemijskim vezama za potrebe ćelijskog metabolizma. Produkti potpune oksidativne razgradnje glukoze u ćelijskom metabolizmu su: CO_2 , H_2O i **energija deponovana u ATP**, neophodna za rastenje i razviće biljaka. Na različitim nivoima ćelijskog disanja, obrazuju se **međuprodukti**, koji predstavljaju neophodne prekursore za sintezu biomolekula najrazličitijih funkcija u održavanju stabilnog ćelijskog metabolizma.

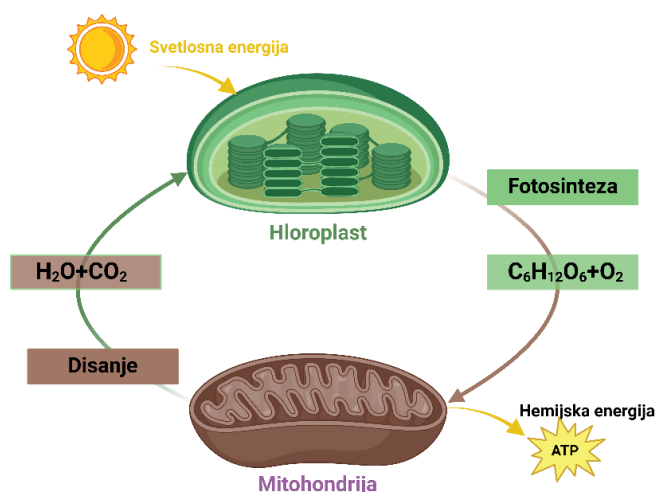
Aerobno ćelijsko disanje (uz potrošnju O_2) je karakteristično za sve eukariotske organizme i slično je kod biljaka, životinja i čoveka.

Procesom fotosinteze obezbeđuje se organska materija – hrana koja se preko procesa ćelijskog disanja iskorisćava za proizvodnju energije neophodne za održavanje metabolizma. Biljke, kao i svi živi organizmi, zadovoljavaju energetske potrebe tokom svog ontogenetskog razvića kroz proces ćelijskog disanja. Glukoza se kod biljnih organizama smatra osnovnim supstratom respiracije, koja se dešava kako danju, tako i noću, dok se proces fotosinteze dešava samo danju (Sl. 2.1).



Sl. 2.1. Fotosinteza i disanje

Ćelijsko disanje je niz enzimski kontrolisanih i koordinisanih hemijskih reakcija kojima se razgrađuje glukoza sa ciljem stvaranja ATP – energije za pokretanje i održavanje metabolizma živih organizma (Sl. 2.2).



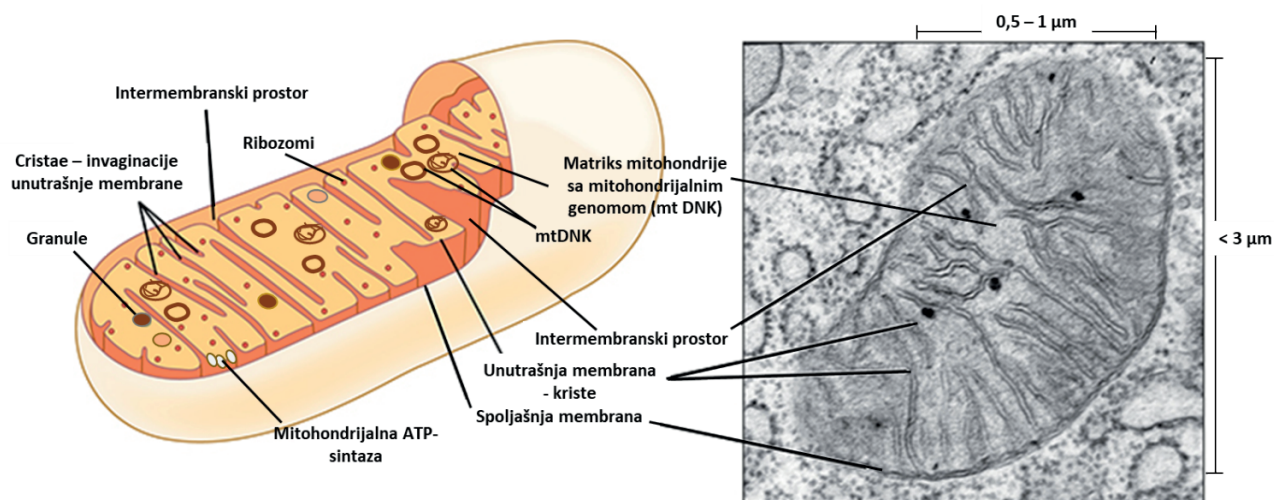
Sl. 2.2. Šematski prikaz povezanosti fotosinteze u kojoj se stvara organska materija (glukoza, $C_6H_{12}O_6$) i ćelijskog disanja u kome se razgrađuje organska materija i proizvodi neophodna energija (ATP) za održavanje metabolizma. Kreirano u: BioRender-u. Pajevic, S. (2025); Elektronski izvori slika, str. 159.

Ćelijsko disanje se javlja kako u eukariotskim, tako i u prokariotskim ćelijama, pri čemu se većina reakcija ćelijskog disanja kod prokariota odvija u citoplazmi, dok je kod eukariota najveći deo reakcija ćelijskog disanja smešten u mitohondrijama (**Sl. 2.3**). Može biti aerobno i anaerobno, pri čemu je *aerobno* disanje značajnije za zadovoljavanje energetskih potreba ćelijskog metabolizma (ima veći prinos ATP-a), jer rezultira potpunom oksidacijom (razgradnjom) saharoze/glukoze, a elektroni mitohondrijskog elektron-transportnog lanca se prenose na molekule kiseonika (O_2), stvarajući molekule vode i ATP-a. Molekul glukoze se potpuno oksiduje uz oslobađanje energije (ATP), ugljen-dioksida i vode, stoga se opšta jednačina aerobnog disanja može predstaviti kao:



2.2. Mitohondrije – semiautonomne organele: struktura i funkcija

To su ćelijske organele koje imaju glavnu ulogu u stvaranju energije neophodne za metabolizam eukariotskih ćelija, jer predstavljaju glavne „hemijske fabrike“ u kojima se stvaraju NADH($+H^+$) i ATP (preko Krebsovog ciklusa i respiratornog transporta elektrona). Mitohondrije biljnih ćelija su sfernog oblika, dimenzija od 0,5 do 3 μm i u strukturi imaju dvostruku membranu: spoljašnju, glatku, i unutrašnju, sa brojnim cevastim invaginacijama koje se nazivaju **kriste (cristae)** (**Sl. 2.3**). Ove invaginacije unutrašnje membrane značajno povećavaju njenu aktivnu površinu, tako da ona sadrži više od 50% ukupnih mitohondrijskih proteina. Broj i veličina mitohondrija u ćeliji varira zavisno od dinamike njihovih deoba i fuzija, koje su uslovljene životnom aktivnošću ćelije.



Sl. 2.3. Mitohondrija – osnovne strukturne komponente i TEM snimak. Adaptirano prema: Elektronski izvori slika, str. 159.

Spoljašnja membrana mitohondrija sadrži proteinske kanale – *porine*, kroz koje se prenose joni i molekuli, te je stoga ona permeabilna za većinu metabolita i jona, ali nije permeabilna za proteine. U njenom sastavu su mnogi proteini od kritičnog značaja za prenos signala, tako služi kao platforma za prenos signala. Unutrašnja membrana međutim, funkcionira kao osmotska barijera i kroz nju ne mogu slobodno difundovati joni i polarni molekuli. Lipidnu frakciju obe membrane čine najvećim delom (i do 80%) fosfolipidi (fosfatidil-holin i fosfatidiletanol-amin), dok manji deo čini difosfatidil-glicerol (do 15%), lipidna frakcija prisutna samo u unutrašnjoj membrani.

Region između dve mitohondrijske membrane je **međumembranski (intermembranski) prostor** koji ima specifičnu ulogu u ćelijskom disanju za generisanje transmembranskog elektrohemijškog gradijenta/ potencijala. Složeni rastvor koji je zatvoren unutrašnjom membranom je **mitohondrijski matriks** (stroma mitohondrije). Mitohondrijski matriks je sačinjen od rastvorenih makromolekula, koji čine i do 50% ukupne njegove mase. Zbog malog sadržaja vode u matriksu, rastvoreni biomolekuli matriksa su slabo pokretni, tako da najčešće funkcioniraju kao multienzimski kompleksi (metaboloni) kako bi došli u kontakt sa supstratima i ostvarili svoju katalitičku ulogu u brojnim reakcijama. Pored enzima rastvorenih u matriksu mitohondrija, mnoge reakcije aerobnog disanja kataliziraju i enzimi koji su vezani za mitohondrijske membrane, odnosno, predstavljaju njihove komponente.

2.2.1. Mitohondrijski genom (mitogenom):

Mitohondrije su kao i hloroplasti, *semi-autonomne organele*, zato što sadrže mitohondrijsku DNK (mtDNK), RNK (mtRNK) i ribosome, odnosno sadrže sopstveni – mitohondrijski genom (mitogenom) koji je smešten u matriksu (stromi) organele. Biljne mitohondrije su stoga sposobne da samostalno i u koordinaciji sa jedarnim i hloroplastnim genomom sprovode sintezu proteina.

Mitohondrijska DNK (mtDNK) smeštena je u matriksu mitohondrija, vanhromozomske strukture (ekstra-hromozomalno), u formi kružnih (cirkularnih), linearnih i razgranatih molekula. Generalno, mtDNK viših biljaka je veća od mtDNK animalnih/humanih ćelija i sadrži između 200 do 2500 kbp (kilobaznih parova). Mitohondrijska DNK sadrži gene koji kodiraju proteine neophodne za funkcionisanje elektron transportnog lanca, kao i gene koji kodiraju sintezu proteina tRNK, rRNK i ribozomski proteini. Elektronske mikrofografije mtDNK pokazuju da je genom vanhromozomskog tipa i da je fragmentaran, tj. postoje ne samo cirkularne (slič-

ne plazmidu), već i linearne, ali i razgranate forme mtDNK različitih veličina u složenim molekulima. Najčešće, biljna mtDNK ne postoji kao veliki kružni (cirkularni) molekul DNK, već uglavnom kao skup linearne DNK sa kombinacijama manjih kružnih i razgranatih molekula. Postoje tri različita tipa mitohondrijskog genoma u biljkama (i gljivama), to su:

- cirkularni (kružni) genom veličine od 19 do 1000 kbp, odnosno, od 20–1000 kbp, strukture slične plazmidu;
- linearni genom sastavljen od homogenih molekula DNK;
- razgranati genom.

Većina DNK koja se nalazi u biljnom mitohondrijskom genomu sastoji se od velikih introna (nekodirajućih intra-genskih regiona) – nukleotidnih sekvenci unutar gena koje nisu eksprimirane. Postojanje velikih introna u mtDNK sekvenci, ogleda se i u odgovarajućoj mtRNK sekvenci, odnosno u mtRNK transkriptima. Zbog toga, uprkos svojoj veličini, biljni mitohondrijski genomi ne sadrže značajno više gena od animalnih/ humanih mitogenoma.

Studije fragmentiranog biljnog mitohondrijskog genoma u velikoj meri ukazuju da je rekombinacija glavni mehanizam koji pokreće replikaciju biljne mtDNK, što je istovremeno i glavno ciljano mesto genomskog inženjeringa.

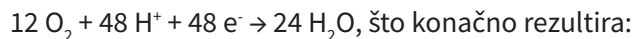
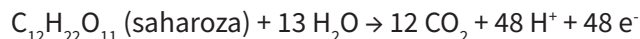
Veličina i organizacija biljnog mitohondrijskog genoma izuzetno variraju zavisno od biljne vrste. Neke biljne vrste mogu da sadrže izuzetno veliki broj baznih parova u mtDNK (npr. *Silene conica* L.), što zbog postojanja introna rezultira ne tako velikim brojem aktivnih gena. Mitohondrijski genom krastavca (*Cucumis sativus* L.) sadrži tri cirkularne mtDNK (1556, 84 i 45 kbp), koje su u najvećoj meri autonomne u procesu replikacije, odnosno, rekombinacije. Takođe, mtDNK slične plazmidu (kružni dvolančani molekuli) i dvolančane i jednolančane mtRNK pronađene su u nekim genotipovima kukuruza.

Mitohondrije sadrže enzime za replikaciju i transkripciju mtDNK. U matriksu organele se nalaze ribozomi, kao i mitohondrijske transportne RNK (mt tRNK) koje nose amino-kiseline za sintezu specifičnih proteina/enzima do mtRNK na mitohondrijskim ribozomima prema rasporedu nukleotida definisanom na mtRNK transkriptu.

Ribozomi mitohondrija se razlikuju od hloroplastnih i citoplazmatskih i koriste malo drugačiji genetički kod (sekvencu od tri baze) za kodiranje određenih amino-kiselina. Mitohondrijski genomi kodiraju sve ribozomalne RNK (rRNK) koje se nalaze u mitohondrijima i većinu tRNK i stvaraju samo mali broj proteina koji su potrebni za transport elektrona i produkciju ATP-a u procesu ćelijskog disanja. Ostali proteini potrebni u mitohondrijima su kodirani nuklearnom DNK i transportuju se u citoplazmu ćelije, a zatim u mitohondrije, pošto biljne mitohondrije ne kodiraju ceo set molekula tRNK neophodnih za sintezu specifičnih proteina/enzima, te se neki molekuli tRNK unose u mitohondrije iz citoplazme. Tako je na primer, mitohondrijski genom arabidopsisa (*Arabidopsis thaliana* L.) sekvenciran i otkriveno je da sadrži trideset dva gena za kodiranje proteina, dvadeset dva gena za tRNA i tri gena za (ribozomalnu) rRNK.

2.3. Stvaranje ATP-a iz glukoze/saharoze; Standardna Gibsova slobodna energija (ΔG^0)

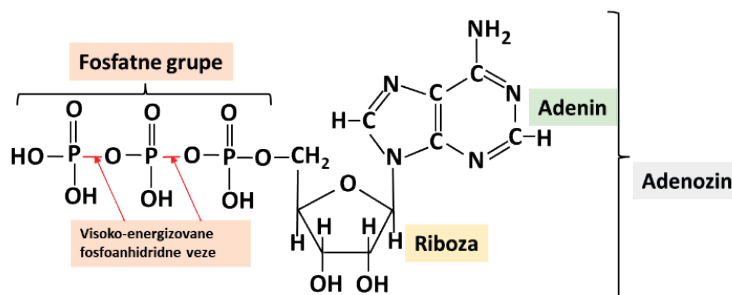
Disaharid, saharoza je kod biljaka glavna transportna forma fotosintetičkih asimilata, te stoga u organima za deponovanje (ušće asimilata) saharoza ulazi u ćelije radi iskorištavanja za metaboličke/ energetske potrebe biljnih ćelija i zbog toga se smatra glavnim supstratom ćelijskog disanja biljaka. Stoga se aerobno ćelijsko disanje može predstaviti i kao oksidacija molekula saharoze sa 12-C atoma, odnosno, kao redukcija 12 molekula O₂:



Sumarna reakcija ćelijskog disanja je obrnuta u odnosu na reakciju fotosinteze i predstavlja spregnutu redoks reakciju kojom se saharoza, odnosno, glukoza u potpunosti oksidiše (dekarboksiliše) do CO_2 , a konačni akceptor elektrona - O_2 , se redukuje u H_2O .

Razgradnja ugljenih hidrata je glavni izvor energije, za sve energetske potrebe ćelijskog metabolizma. Potpuna oksidativna razgradnja glukoze do CO_2 i H_2O može se predstaviti na sledeći način:

Oslobodena energija neophodna za održavanje metabolizma deponovana je u molekulima adenozin 5'-trifosfata (ATP), koji ima centralnu ulogu rezervoara i prenosioca slobodne energije (**Sl. 2.4**).

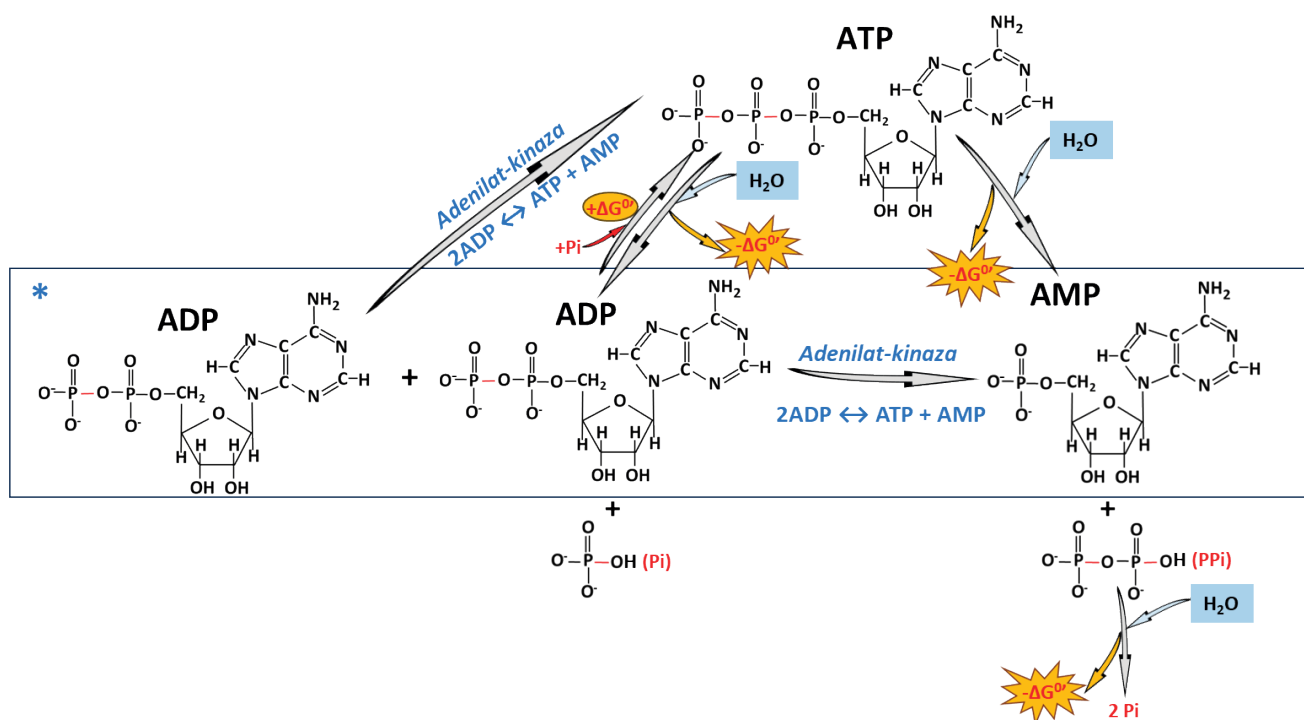


Sl.2.4. ATP – molekul u čijim fosfatnim vezama je deponovana standardna Gibsova slobodna energija (ΔG^0 ; slobodna entalpija); hidrolizom fosfatnih veza oslobađa se energija za metaboličke procese.

Veze između fosfata u ATP-u poznate su kao veze visoke energije jer je njihova hidroliza unutar ćelija praćena oslobađanjem relativno velike količine slobodne energije, koja se naziva Gibsova slobodna energija (IUPAC naziv: Gibbsova standardna energija ili Gibbsova funkcija). Gibsova slobodna energija se definiše kao slobodna entalpija, obeležava se sa ΔG^0 (ΔG^0), predstavlja meru slobodnog rada (izražava se u $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$, ili $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$), a može biti hemijski rad (anabolizam), transportni rad (usvajanje i transport nutrijenata i asimilata), ili pak mehanički rad. Gibsova slobodna energija se generiše iz termodinamičkog sistema (reakcije), odnosno, to je termodinamički/hemijski potencijal – energetska dobit koja se realizuje nekom reakcijom. Reakcioni sistemi u ravnoteži i pri normalnim uslovima (na konstantnom pritisku i temperaturi), generalno teže da dostignu stanje minimalne slobodne energije ΔG^0 . Usled ove opšte prirodne tendencije, negativna promena Gibbove slobodne energije ($(-)\Delta G^0$) je kvantitativna mera povoljnosti /spontanosti (potencijalne) hemijske reakcije, tako da nakupljena visoka negativna slobodna Gibbova energija nekog hemijskog jedinjenja (u hemijskoj reakciji) čini to jedinjenje reaktivnim, odnosno efikasnim u spontanijama reakcijama u kojima učestvuje. Oslobodena energija u spontanijama reakcijama jednaka je maksimalnoj količini rada koji se može izvesti hemijskom reakcijom.

Kada reaktanti imaju višu Gibbovu energiju od produkata, promena njihove Gibbove energije je negativna ($(-)\Delta G^0$), te će se zbog toga reakcija odvijati spontano do postizanja ravnoteže uz oslobađanje energije ($\Delta G^0 < 0 \rightarrow$ spontana reakcija). Ovakve reakcije su **egzergone** (npr. hidroliza ATP do ADP) (**Sl. 2.4**).

Reakcije u kojima reaktanti imaju nižu Gibbovu energiju od produkata i pozitivnu promenu energije ($(+)\Delta G^0$), te se zbog toga za postizanje ravnoteže energija mora dovoditi ($\Delta G^0 > 0 \rightarrow$ nije spontana reakcija), predstavljaju **endergone reakcije** (npr. stvaranje ATP iz ADP i Pi) (**Sl. 2.5**).



Sl.2.5. Kinetika cikličnog sistema reakcija kojim se održava neophodna količina, balans i promet ATP-ADP-AMP/Pi - PPi; ΔG° – Standardna Gibsova slobodna energija;

*Reakcija hidrolize ATP do AMP dešava se kao spregnuta reakcija, zajedno sa obrazovanjem ATP, u dva stepena.

$\Delta G^\circ \text{ ATP} = -32 \text{ kJ mol}^{-1}$ u standardnim eksperimentalnim uslovima (*in vitro*) do čak $-57 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ u životnoj ćeliji (*in vivo*); visoka negativna Gibsova slobodna energija ATP, omogućava efikasnu hidrolizu jednog mola ATP u ADP i Pi, te fosforilaciju supstrata. Ako se posmatraju pojedinačne reakcije hidrolize ATP, vidi se da je ΔG° različita:



Vrednost ΔG° ne treba uzimati kao apsolutno tačnu, već kao približno tačnu, pošto je izvedena iz reakcija sprovedenih eksperimentalno u standardnim *in vitro* uslovima, gde su koncentracije svih proizvoda i reaktanata preračunate na 1 mol supstance (1M). Stvarne unutarćelijske koncentracije Pi su približno 10^{-2} mola, dok su istovremeno, stvarne unutarćelijske koncentracije ATP-a veće od koncentracija ADP. Ove razlike između ćelijskih koncentracija i onih u *in vitro* uslovima merenja, ukazuju na *in vivo* povećanje obima hidrolize ATP-a i posledično, na veće vrednosti ΔG° unutar ćelija, tako da hidroliza ATP-a unutar ćelije, oslobađa ΔG° i do $-57 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (između -12 i $-14 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Alternativno, ATP može biti hidrolizovan u AMP i pirofosfat (PPi) (**Sl. 2.4**):



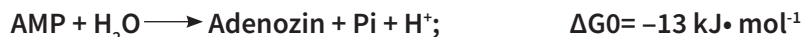
Ova reakcija daje približno istu količinu slobodne energije kao hidroliza ATP-a u ADP. Međutim, pirofosfat proizveden ovom reakcijom se brzo potom hidrolizuje, sa ΔG° koja je slična ΔG° dobijenoj iz hidrolize ATP-a, tako da je ukupna promena slobodne energije koja je rezultat hidrolize ATP-a u AMP i PPi približno dvostruko veća od one dobijene hidrolizom ATP-a u ADP (gore navedene apsolutne vrednosti su približne i zavise od standardnih i specifičnih uslova).

Treba istaći da se reakcija hidrolize ATP do AMP dešava kao spregnuta reakcija, zajedno sa obrazovanjem ATP, u dva stepena (**Sl. 2.5**; obeleženo sa *):



Adenilat-kinaza (AK) je široko rasprostranjen i izuzetno prisutan enzim koji katališe reakciju prenosa fosfatnih (fosforil) grupa između dva molekula ADP-a i nastanak jednog molekula ATP-a i 1 molekula AMP-a (**Sl. 2.5**, obeleženo sa *).

Hidroliza jednog molekula AMP do adenzina i Pi, daje ΔG° približno oko $-13 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$:



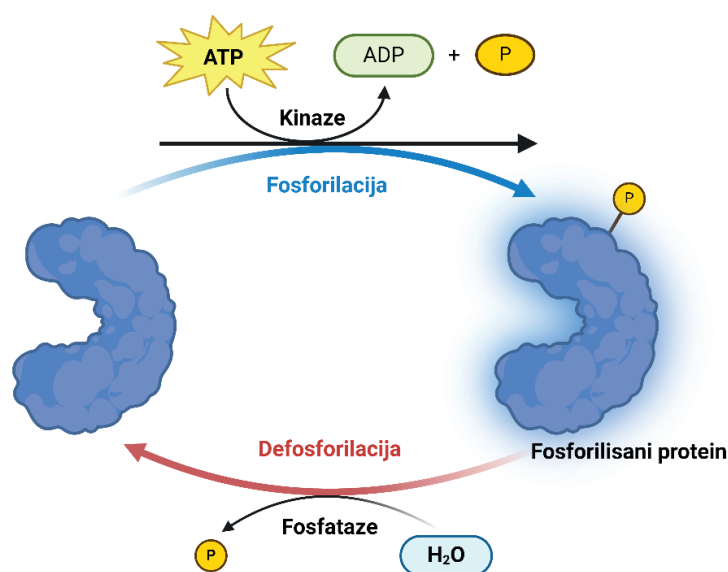
Enzim **ATP-sintaza** katališe sintezu ATP-a iz ADP-a i neorganskog fosfata (Pi) u procesu koji se naziva oksidativna fosforilacija (o čemu će biti više reči kasnije, a o fotosintetičkoj fosforilaciji je bilo reči u poglavlju Fotosinteza). **ATPaze** su klasa enzima koji katalizuju razgradnju ATP-a na ADP i slobodni fosfatni jon ili pak, inverznu reakciju.

Tokom evolucije su se razvili biohemijski mehanizmi stvaranja ATP-a iz ADP-a i AMP-a, koji su se modifikovali i grupisali u dve osnovne klase, a to su:

1. fosforilacija na nivou supstrata i
2. oksidativna fosforilacija.

Oba mehanizma se oslanjaju na biohemijske reakcije koje prenose energiju iz nekog izvora energije u ADP ili AMP, da bi se sintetizovao ATP u endergonoj reakciji. O oba ova načina generisanja ATP je već bilo reči, ali će se u nastavku o njima još govoriti.

Kinetika cikličnog sistema metaboličkih reakcija kojim se održava neophodna količina, balans i promet ATP-ADP-AMP uključuje aktivnost velikog broja enzima ATP-aza iz familije *kinaza* (*adenilat-kinaza*, *hekso-kinaza*, *fosfofruktozna kinaza*, *fosfoglicerinska kinaza*, *piruvatna kinaza* i dr.) koje katalizuju prenos fosfatnih grupa (PO_4^{3-}) sa visokoenergetskih molekula koji doniraju fosfate na specifične supstrate (**Sl. 2.6**). *Kinaze* se ubrajaju u veliku enzimsku familiju *fosfotransferaza* i ne treba ih poistovećivati sa fosforilazama, koje takođe imaju veliku ulogu u prometu fosfora, ali koje katalizuju dodavanje neorganskih fosfatnih grupa različitim akceptorima. Takođe, kada se govori o značaju prometa fosfora u biljnom metabolizmu enzimska grupa *fosfataza* je značajna jer one uklanjaju fosfatne grupe sa organskih fosforilisanih jedinjenja (katališu defosforilaciju).



Sl. 2.6. Enzimi **kinaze** katalizuju prenos fosfatnih grupa (PO_4^{3-}) sa visokoenergetskih (energizovanih) molekula – donora fosfata (ATP, GTP, UTP i dr.) na specifične supstrate. Kreirano u BioRender-u. Pajevic, S. (2025); (Elektronski izvori slika, str. 159).

Kada se, govori o *kinazama*, onda treba napomenuti da se one dele u dve velike podfamilije u odnosu na supstrat koji se fosforiliše preko ATP, tako da postoje kinaze koje su odgovorne za fosforilaciju lipida, šećera i drugih molekula, dok se kao posebna grupa od izuzetnog metaboličkog značaja izdvajaju *proteinske kinaze*. *Proteinske kinaze* (*protein-kinaze*) su enzimi koji koriste fosfatnu grupu iz ATP-a za fosforilaciju ostataka serina, treonina ili tirozina u proteinu/ enzimu, tako da su to kinaze koje selektivno modifikuju druge proteine kovalentnim dodavanjem fosfata u njih i razlikuju se od kinaza koje modifikuju lipide, ugljene hidrate ili druge molekule.

Stanje fosforilacije molekula, bilo da se radi o proteinima, lipidima ili ugljenim hidratima, utiče na njihovu aktivnost, reaktivnost i sposobnost da vezuju druge molekule. Stoga su enzimi kinaze od kritičnog značaja za metabolizam, jer učestvuju u regulaciji proteina/ enzima, ćelijskom signalingu, transportu metabolita i intermedijera, sekretornim procesima i mnogim drugim biohemijskim putevima.

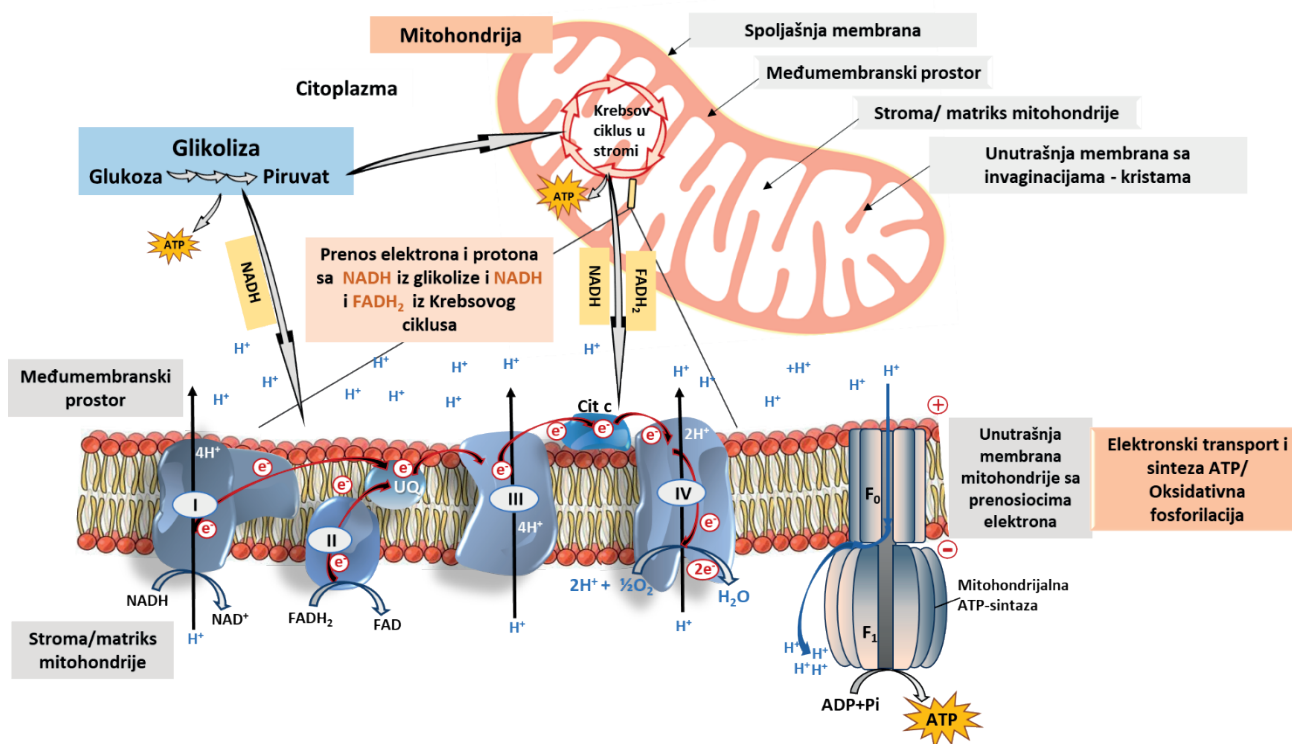
Osim ATP (ADP, AMP), **fosfoenol piruvat (PEP)** je zbog visoke negativnosti Gibsove slobodne energije – entalpije, ΔG^0 koja iznosi $-61,9 \text{ kJ mol}^{-1}$, izuzetno reaktivan i produktivan donor P_i za fosforilaciju supstrata, odnosno za sintezu ATP.

Nasuprot tome, pozitivna ΔG^0 vrednost ukazuje da je u pitanju endergona reakcija, te je neophodno dodati energiju reakcinom sistemu da bi se desila reakcija. Tako npr. vrednost ΔG^0 za fosforilaciju glukoze u glikolizi iznosi (oko) $+13,8 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Ako se posmatra sumarna jednačina ćelijskog disanja, odnosno potpuna oksidativna razgradnja (dekarboksilacija) saharoze (1 mol glukoze + 1 mol fruktoze) do CO_2 i H_2O , onda je neto promena standardne Gibsove slobodne energije ovog termodinamičkog sistema (sistema reakcija): $\Delta G^0 \approx -5760 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ saharoze (342 g saharoze). Ovako velika negativna vrednost ΔG^0 ukazuje na neophodnost metaboličke kontrole njenog oslobađanja kroz seriju sukcesivnih reakcija, tako da je i oslobađanje energije postepeno i primarno povezano sa sintezom ATP, jer bi u protivnom došlo do oštećenja ćelije.

Reakcije kompleksnog procesa ćelijskog disanja mogu se grupisati u pet glavnih faza ćelijskog disanja, to su (**Sl. 2.7**):

1. glikoliza,
2. oksidativni pentozno-fosfatni ciklis,
3. formiranje Acetil-CoA,
4. Ciklus limunske kiseline (ili Ciklus trikarboksilne kiseline, ili Krebsov ciklus) i
5. transport elektrona i oksidativna fosforilacija – sinteza ATP.



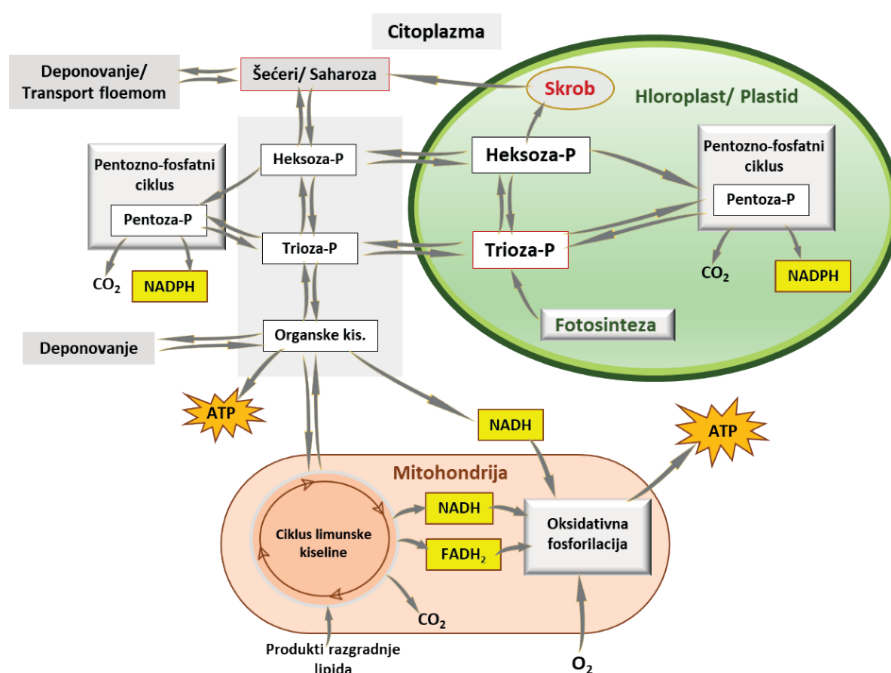
Sl. 2.7. Opšta shema ćelijskog disanja: glikoliza u citoplazmi, Krebsov ciklus u stromi mitohondrije i transport elektrona kroz unutrašnju membranu mitohondrije; oksidativna fosforilacija i sinteza ATP.

2.4. Organske materije – supstrati ćelijskog disanja

Glavni supstrat ćelijskog disanja je šećer – saharoza/glukoza, koja se kod autotrofnih organizama sintetizira u procesu fotosinteze, međutim, kako je proces disanja kompleksan i dešava se na različitim nivoima ćelijske organizacije, različiti međuprodukti generirani u ćelijskom metabolizmu (pre svega, amino-kiseline i masne kiseline), ulaze takođe kao supstrati u reakcije ćelijskog disanja (**Sl. 2.8**).

U životinjskim i humanim ćelijama, glukoza je supstrat ćelijskog disanja, međutim, kod biljaka je glavni transportni šećer saharoza (videti poglavlje Fotosinteza: Transport asimilata), tako da se u prvim reakcijama glikolize, saharoza enzimski konvertuje na svoje dve monosaharidne subjedinice – glukozu i fruktozu. Postoje dva puta razgradnje saharoze na glukozu i fruktozu vezana za aktivnost enzima *invertaze* i *saharozne sintaze* prilikom pražnjenja floema i ubacivanja saharoze u ćelije ušća asimilata (videti poglavlje Fotosinteza: Transport asimilata). Kod biljaka, zbog funkcije saharoze kao osnovnog supstrata ćelijskog disanja, postoji delimični glikolitički put u plastidima, paralelno sa onim u citoplazmi. Enzim *invertaza* (EC 3.2.7.26) hidrolizuje saharozu u ćelijskom zidu, vakuoli ili citoplazmi na glukozu i fruktozu, alternativno, enzim *saharozna sintaza* hidrolizuje saharozu koja je kombinovana sa UDP, tako da njenom aktivnošću nastaje fruktoza i UDP-glukoza u citoplazmi. Enzim *UDP-glukozna pirofosforilaza* zatim prevodi UDP-glukozu i pirofosfat (PPi) u UTP i glukozu-6-fosfat. Oba enzima, *invertaza* i *saharozna sintaza* razlažu saharozu na glukozu i fruktozu za potre-

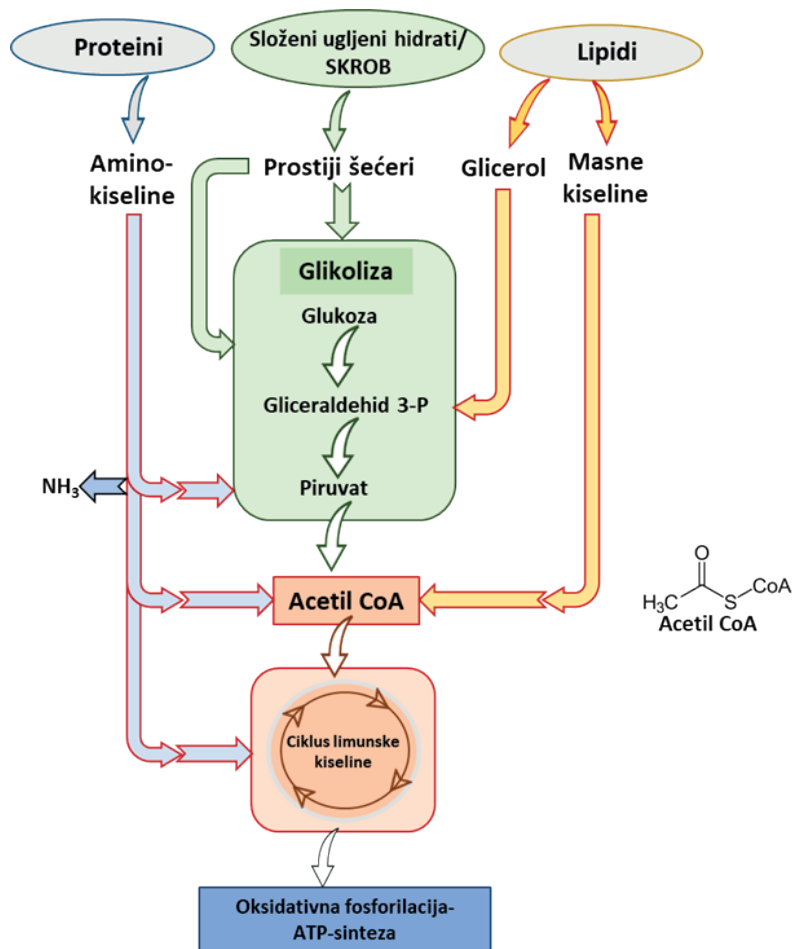
be glikolize, a njihove aktivnosti se često, zavisno od specifičnih uslova, dopunjavaju. Za biljni metabolizam je karakteristična česta pojava **metaboličke redundancije**, a to je upravo da različiti metabolički putevi imaju sličnu funkciju i mogu da zamene jedni druge. Tako npr., parcijalna glikoliza u plastidima rezultira stvaranjem metabolita (međuprodukata) koji su supstrati za plastidne biokemijske reakcije, kao što su sinteza masnih kiselina, tetrapirola, aromatičnih amino-kiselina itd. Ova različitost biokemijskih puteva koji rezultiraju istim produktima koji potom ulaze kao supstrati u glikolizu, vidi se i na primeru razgradnje skroba: sintetisani skrob u hloroplastima u procesu fotosinteze, se noću enzimski razlaže i ulazi u proces glikolize u citoplazmi uglavnom kao glukoza; na svetlosti pak, produkti fotosinteze mogu ući u proces glikolize direktno kao trioza fosfati (**Sl. 2.8**).



Sl. 2.8. Opšti pregled energetskog metabolizma u biljnoj ćeliji i supstrati ćelijskog disanja: sinteza fotoasimilata u hloroplastima i njihov transport u citoplazmu; delimična razgradnja šećera u citoplazmi (glikoliza), transport u mitohondrije, konačna razgradnja i proizvodnja ATP; alternativni metabolički putevi – pentozno-fosfatni ciklus u hloroplastima i/citoplazmi.

Glikolizom u citoplazmi i oksidativnim pentozno-fosfatnim ciklusom u citoplazmi i/citoplazmi i plastidima prevođe se šećeri u organske kiseline koji su glavni supstrati narednih etapa ćelijskog disanja u mitohondrijama. Produkti i intermedijeri različitih biokemijskih procesa mogu se kao supstrati, uključivati na različitim nivoima u proces ćelijskog disanja, što je regulisano specifičnošću ćelijskog metabolizma, ali i brojnim abiotičkim faktorima. Generalno, može se zaključiti da se kroz proces glikolize, kao inicijalne faze ćelijskog disanja, sakuplja ugljenik iz različitih ugljeno-hidratnih supstrata da bi se razgradnjom C-H veza u njima oslobodila energija ATP.

Proces ćelijskog disanja počinje formiranjem supstrata za disanje u samim ćelijama kroz brojne metaboličke procese katalisane enzimima. Sve četiri grupe biomolekula (ugljeni hidrati, lipidi, proteini i nukleinske kiseline) se razgrađuju u procesu ćelijskog disanja za proizvodnju energije. Proces metabolizma ugljenih hidrata je međutim, centralni proces, pošto se razgradnjom šećera obezbeđuju direktni supstrati za ćelijsko disanje koji se metabolišu da bi stvorili redukcione ekvivalente (NADH i FADH₂) i konačno, ATP. Lipidi, proteini i nukleinske kiseline se razgrađuju do svojih monomera koji se biokemijski modifikuju i kao intermedijeri ulaze na određenom nivou u proces oksidativne dekarboksilacije (**Sl. 2.9**).



Sl. 2.9. Supstrati ćelijskog disanja: direktni – ugljeni hidrati i indirektni – proteini i lipidi.

2.4.1. Hidroliza skroba u plastidu i eksport intermedijera – supstrata za glikolizu

Familija od nekoliko α -amilaza (EC 3.2.1.1) pokreće razlaganje skrobnih granula, stvarajući rastvorljive supstrate za druge enzime kao što su β -amilaze i α -glikozidaze. Enzimi α -amilaze su glikozidne hidrolaze (alternativni nazivi su: 1,4- α -D-glukan glukanohidrolaza; glikogenaza) i po svom sastavu su kalcijum-metaloenzimi. Delujući na nasumične (1 $\rightarrow$ 4)- α -glikozidne veze u lancima amiloze i amilopektina skrobnih granula, α -amilaza cepa dugačke lance na manje segmente, dajući na kraju ili maltotriozu i maltozu iz amiloze, odnosno, maltozu, glukozu i „granične dekstrine“ iz amilopektina. Pošto može da deluje bilo gde na supstratu, α -amilaza može da veoma brzo i efikasno oslobađa supstrate za glikolizu/ćelijsko disanje.

Alternativno, ovaj proces početne razgradnje skroba može da se odvija i delovanjem samo β -amilaze (EC 3.2.1.2), enzima sa sistematskim nazivom 1,4- α -D-glukan maltohidrolaza (alternativni nazivi su: saharogen amilaza, glikogenaza), koji hidrolizuje svaku drugu (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glikozidnu vezu u polisaharidima čime se uklanjaju uzastopne jedinice disaharida maltoze sa neredukujućih krajeva lanaca. Dok α -amilaza nasumično hidrolizuje (1 $\rightarrow$ 4)- α -glikozidne veze, β -amilaza razlaže svaku drugu vezu, odvajajući maltozu koja je često glavni eksportni oblik ugljenih hidrata iz plastida. Maltoza odlazi u citoplazmu preko maltoznog transportera, dok istovremeno, izvestan deo glukoze nastao parcijalnom hidrolizom skroba, odlazi u citosol preko glukoznih transportera. Aktivnošću β -amilaze, nakuplja se maltoza, što je naročito uočljivo tokom zrenja

plodova voća kada se pojačava njihov slatki ukus. U u animalnim/ humanim ćelijama nije konstatovano prisustvo β -amilaze.

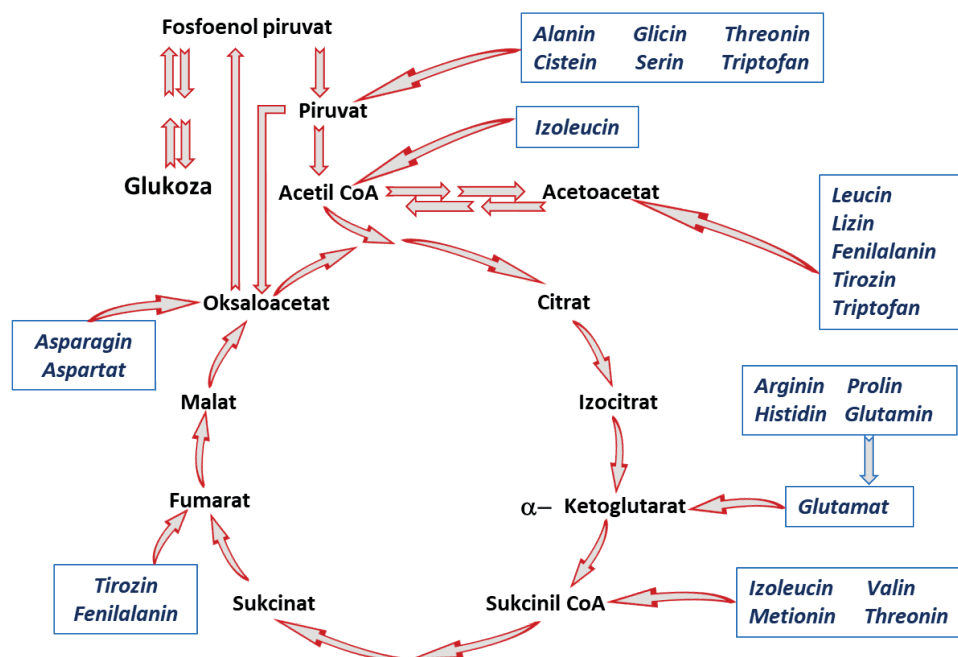
U enzimsku familiju amilaza, spadaju i enzimi iz klase γ -amilaza (EC 3.2.1.3) koji kao i α -, odnosno, β -amilaze razlažu specifične segmente dugih lanaca amiloze i amilopektina. Alternativna imena za ovu klasu amilaza su: glukan 1,4- α -glikozidaza; amiloglikozidaza; 1,4- α -D-glukan glikohidrolaza. Enzim γ -amilaza razgrađuje (1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glikozidne veze, kao i terminalne (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glikozidne veze na neredukujućem kraju amiloze i amilopektina, oslobađajući molekule glukoze (β -D-glukoze). γ -amilaza ima najkiseliji (pH $\approx$ 3) optimum sredine za aktivnost.

Enzim α -amilaza postoji kod mikroorganizama, biljaka, životinja i ljudi; β -amilaza se primarno nalazi u mikroorganizmima i biljkama; γ -amilaza se nalazi u biljkama i životinjama.

2.4.2. Hidroliza proteina i eksport intermedijera – supstrata za ćelijsko disanje

Proteini su kod biljaka zastupljeni kao indirektni supstrati ćelijskog disanja koji se moraju prvo razložiti na pojedinačne amino-kiseline, a zatim se nakon deaminacije (odvajanja amino-grupa), u zavisnosti od hemijskog sastava, uključuju u završne etape glikolize, ili u drugoj i trećoj etapi ćelijskog disanja u mitohondrijama: na nivou Acetil-CoA, odnosno, na nivou ciklusa limunske kiseline (Krebsovog ciklusa) (**Sl. 2.9**). Kada u procesu deaminacije, amino-kiselina ostane bez amino-grupe, njena hemijska svojstva određuju u koji će međuprodukt ćelijskog disanja biti prevedena i na kom će mestu/fazi ući u ćelijsko disanje (**Sl. 2.10**). Kada ovi molekuli/intermedijeri uđu u metabolizam, nema razlike odakle su došli: jednostavno će proći kroz preostale faze, dajući NADH, FADH₂ i ATP.

Enzimi – *proteaze*, razlažu proteine do amino-kiselina, koje mogu ući u proces ćelijskog disanja, ali isto tako, mogu i da se recikliraju u nove proteine, što je svakako energetske efikasnije za biljku, nego da se nakon njihove deaminacije preko ćelijskog disanja koriste za sintezu NADH, odnosno, ATP-a. Zbog toga su proteini indirektni supstrati ćelijskog disanja i koriste se tek kada se potroše direktni supstrati, tj. šećeri – glukoza. Energetska dobit za biljku (broj sintetisanih ATP) je veća kada se kao supstrati ćelijskog disanja koriste proteini/ amino-kiseline, nego ugljeni hidrati.



Sl. 2.10. Amono-kiseline (u plavim boksovima) nastale enzimskom razgradnjom proteina uključuju se kao intermedijeri u proces ćelijskog disanja u različitim etapama zavisno od hemijskog sastava.

Mnoga semena biljaka kao rezervne materije u semenima skladište proteine koji predstavljaju supstrate za ćelijsko disanje nakon hidrolize na amino-kiseline (soja, grašak, pasulj).

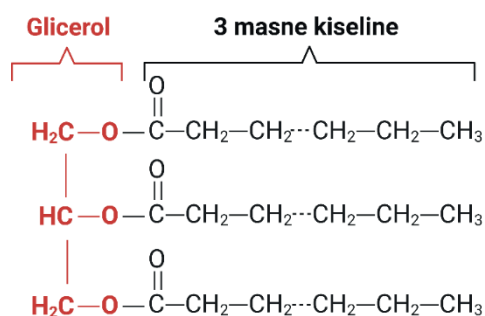
2.4.3. Hidroliza lipida i eksport intermedijera – supstrata za ćelijsko disanje

Lipidi su glavna komponenta bioloških membrana koji su zbog svojih hidrofobnih karakteristika neophodni za očuvanje integriteta ćelija i organela, a kao signalni molekuli, imaju i važnu ulogu u regulaciji ćelijskog metabolizma. Pored toga, lipidi se kod biljaka skladište u semenima/plodovima (posebno kod suncokreta, ricinusa, kikirikija, masline, avokada i sl.) i koriste se kao kompaktan izvor energije za ćelijsko disanje u fazi klijanja semena. Lipidi – trigliceridi su po hemijskom sastavu estri, gde su u molekulu, tri masne kiseline preko svojih karboksilnih grupa estarski vezane za tri hidroksilne grupe alkohola glicerola (**Sl. 2.11**). Glavni oblici lipida u biljkama su:

Polarni glicerolipidi (ili samo, **glicerolipidi**), koji su glavni strukturni lipidi biljnih ćelija, sa dve glavne grupe najzastupljenije u ćelijskim membranama:

1. *Gliceroglikolipidi (ili glikolipidi)*, gde šećeri čine polarnu grupu molekula i
2. *Glicerofosfolipidi (ili fosfolipidi)*, gde polarni deo molekula čini fosfatna grupa;

Triacilgliceroli, koji su najzastupljeniji oblik rezervnih lipida biljaka, gde su u molekulu, karboksilne grupe 3 masne kiseline estarski povezane sa hidroksilnim grupama alkohola glicerola (**Sl. 2.11**).



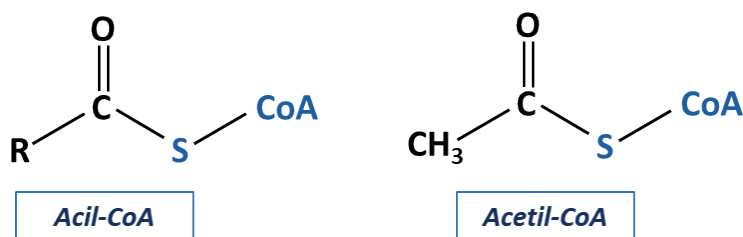
Sl. 2.11. Hemijska struktura triacilglicerola- glavnog rezervnog lipida. Kreirano u BioRender-u. Pajevic, S. (2025); Elektronski izvori slika, str. 159.

Masne kiseline biljaka su lanci sa parnim brojem CH_2 subjedinica, od 12 do 30 (ponekad i više), ali najčešće je to 16 ili 18. Mogu biti *zasićene* (nemaju dvostrukih kovalentnih veza između C atoma), gde spadaju npr. palmitinska (16 C atoma) i stearinska kiselina (18 C atoma), ili mogu biti *nezasićene*, sa jednom ili više dvostrukih $\text{C}=\text{C}$ kovalentnih veza, gde spadaju npr. oleinska (18 C atoma i 1 dvostruka veza), linolna (18 C atoma i 2 dvostruke veze) i linolenska kiselina (18 C atoma i 3 dvostruke veze). Lipidi mogu biti na sobnoj temperaturi u čvrstom agregatnom stanju, tada su to *masti* i sadrže veći udeo zasićenih masnih kiselina, dok su ulja na sobnoj temperaturi u tečnom agregatnom stanju i sadrže veći udeo dvostrukih veza, odnosno veći udeo nezasićenih masnih kiselina.

Treba istaći da hemijski sastav *polarnih glicerolipida*, koji su uglavnom strukturni lipidi, izuzetno utiče na funkcionisanje ćelijskih membrana, pa prema tome i na čitav metabolizam biljaka. Membranski lipidi su i prekursori važnih signalnih molekula na ćelijskom i međućelijskom nivou i u velikom stepenu mogu da utiču na promet nutrijenata, posebno Ca^{2+} , ili sintezu nekih biološki aktivnih materija – fitohormona (jasmonska kiselina).

Sinteza lipida odvija se u nekoliko organela u ćeliji: masne kiseline se sintetisu u hloroplastima (plastidima) i direktno se vezuju (esterifikuju) sa glicerolom pri čemu nastaju **glikolipidi** (ili **galaktolipidi**, ako je galaktoza šećer koji čini polarnu grupu molekula), glavne komponente membrane hloroplasta, takođe, masne kiseline se prenose i u citoplazmu, esterifikuju se sa glicerolom na nivou endoplazmatičnog retikuluma, gradeći **fosfolipide** najvažnije lipide ćelijskih membrana, ili pak, u endoplazmatičnom retikulu epidermalnih ćelija, masne kiseline mogu da se transformišu u komponente kutina i voska. U lipidne komponente biljnih ćelija ubrajaju se i **terpenoidi (izoprenoidi)**, gde spadaju karotenoidi i steroli koji su takođe komponente ćelijskih membrana.

Za razliku od gore pomenutih lipida sa nezamenljivom fiziološkom ulogom u biljkama, u ćelijama semena (endosperma ili kotiledona), sintetisu se i nagomilavaju **rezervni lipidi – triacilgliceroli**, u organelama koje se zovu **uljana tela**, ili **sferozomi**, odnosno, **oleozomi**. Membrana uljanog tela je jednoslojna sa dominantno zastupljenim fosfolipidima, čiji su polarni delovi molekula okrenuti ka citosolu, a masnokiselinski deo (nepolarni), prema unutrašnjosti. Membrana uljanog tela je poreklom od endoplazmatičnog retikuluma (ER) jer se lipidi sintetisu enzimima lociranim u/na ER i nakupljaju između dva sloja membrane ER. Kada se sakupi veća količina lipida na ER, odvaja se uljano telo sa rezervnim lipidima neophodnim supstratima za ćelijsko disanje, odnosno, za zadovoljenje energetske potrebe tokom klijanja semena. Razgradnjom lipida / triacilglicerola, glicerol može ući u glikolizu, dok se masne kiseline razlažu na subjedinice sa dva ugljenika gubitkom – OH iz karboksilne grupe, to su *lipidne acil-grupe*, koje mogu biti acilne i acetilne grupe (acetilna grupa je vrsta acil grupe, gde je R grupa uvek CH_3 (metil grupa). Lipidne-acil grupe se vezuju za CoA, gradeći acil-CoA, odnosno, acetil-CoA (**Sl. 2.12**).



Sl. 2.12. Lipidne acil-grupe: Acil-CoA i Acetil-CoA

Acetil-CoA može da se sintetiše u mitohondrijima u različitim reakcijama: oksidativnom dekarboksilacijom piruvata; razgradnjom nekih amino-kiselina, npr. leucina, lizina, fenilalanina, tirozina i triptofana, kao i **β-oksidacijom masnih kiselina**.

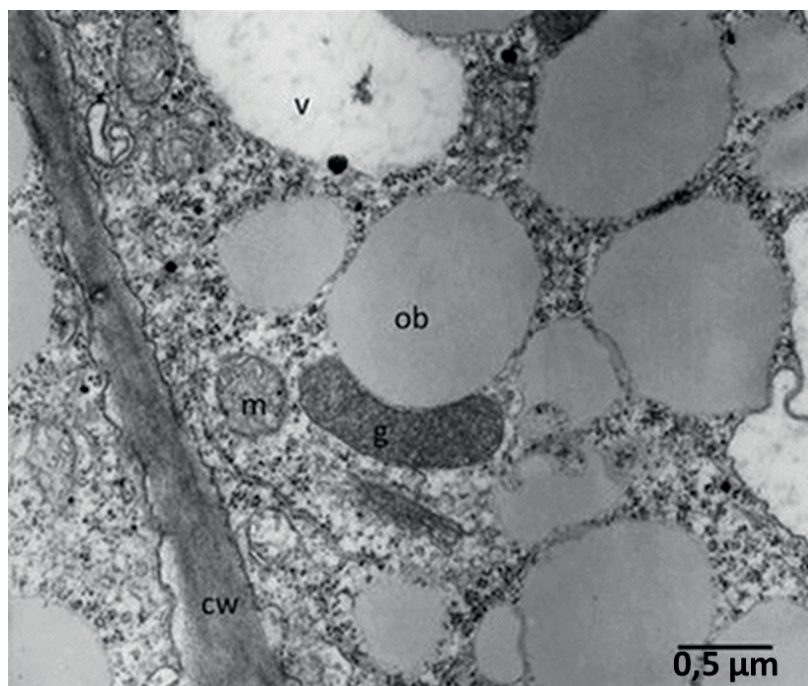
Kvalitativni i kvantitativni sastav rezervnih lipida, odnosno, udeo pojedinih masnih kiselina zavisi od biljne vrste, organa za deponovanje rezervnih materija, ali i od uslova gajenja. Tako na primer, prema nekim podacima, glavne masne kiseline triacilglicerola u ulju kikirikija su palmitinska, oleinska i linolna, dok je lino-lenska masna kiselina prisutna u tragovima. Kokosovo ulje se sastoji od oko 90% zasićenih masnih kiselina i 9% nezasićenih masnih kiselina.

Generalno, lipidi se koriste kao supstrat ćelijskog disanja prilikom klijanja semena, kada se ugljeni hidrati, a potom i proteini potroše, ili pak, nisu dostupni. Međutim, lipidi su „najbogatiji“ supstrat ćelijskog disanja, deponuju mnogo više energije, zato što predstavljaju molekule sa najviše redukovanih atoma ugljenika. Razgradnjom glukoze u procesu ćelijskog disanja, nastaju dva molekula acetil CoA, dok se iz jednog molekula masne kiseline može proizvesti mnogo više ATP-a, odnosno, potpunom oksidacijom 1 g skroba oslobodi se oko 15,9 kJ, dok se potpunom oksidacijom 1 g lipida (masti/ ulja) oslobodi približno 40 kJ energije.

2.4.3.1. Lipidni metabolizam: od rezervnih lipida do ugljenih hidrata – supstrata ćelijskog disanja

Kada počne proces klijanja, u semenima koja kao rezervne materije sadrže lipide, počinje razgradnja triacilglicerola i njihovo prevođenje u (među)produkte koji su rastvorljivi i prema tome mobilni u ćelijama i tkivima. Biljke ne mogu svojim provodnim sistemom da transportuju lipide (koji su hidrofobni) iz kotiledona/endosperma u druga tkiva i organe koji se formiraju tokom klijanja, stoga je potrebno da rezervni lipidi pretrpe biohemijsku transformaciju i da se prevedu u mobilne forme ugljenika, generalno, šećere. Proces mobilizacije lipida za potrebe ćelijskog disanja prilikom klijanja semena sastoji se od nekoliko faza/ biohemijskih puteva koji se dešavaju u različitim ćelijskim kompartmentima: najpre su to uljana tela, zatim, glioksizomi, mitohondrije i na kraju, citoplazma (Sl. 2.13).

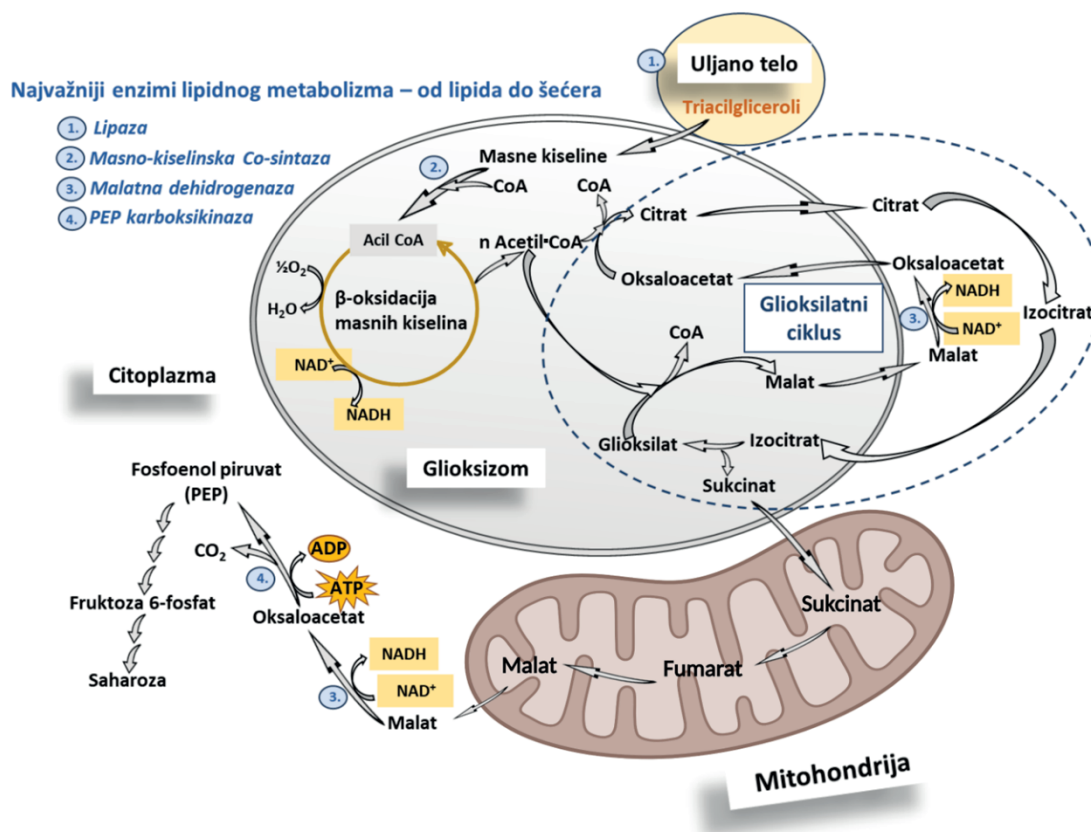
1. Hidroliza rezervnih lipida deponovanih u uljanim telima je inicijalna faza prevođenja lipida, dešava se katalitičkim dejstvom enzima *lipaze* (EC 3.1.1.3 - triacilglicerol lipaze) koja hidrolizuje estarske veze u triacilglicerolima i time ih razlaže na slobodne masne kiseline i glicerol. U ovoj fazi metabolizma lipida, uljana tela (sferozomi, ili oleozomi) i glioksizomi su u bliskom kontaktu što ukazuje na povezanost i uslovljenost procesa koji se odvijaju u njima (Sl. 2.13).



Sl. 2.13. Elektron-mikrografski snimak ćelije semena za deponovanje rezervnih lipida tokom klijanja: povezanost organela koje su uključene u metabolizam lipida i njihovu konverziju u ugljene hidrate – glavne supstrate ćelijskog disanja. vakuola (v); uljano telo (ob – engl. Oil body); gliksizom (g); mitohondrija (m), ćelijski zid (cw – engl. cell wall) Adaptirano prema Bewley i sar. (2013). Elektronski izvori slika, str. 159.

2. β -oksidacija masnih kiselina u gliksizomima (peroksizomima) – aktiviranje masnih kiselina koje su ušle u gliksizom (specifičan tip peroksizoma) tako što se prevode u masno-kiselinski CoA (fatty-acyl-CoA, ili samo, acil-CoA) enzimom masno-kiselinskom CoA sintazom (EC 2.3.1.86, engl. fatty-acyl-CoA synthase, ili acil-sintazom). Acil-CoA je početni supstrat za seriju reakcija koje podrazumevaju β -oksidaciju masnih kiselina do acetil-CoA, pri čemu se redukcije kiseonik ($\frac{1}{2} O_2$) do H_2O i formira NADH po svakom nastalom molekulu acetil-CoA (**Sl. 2.14**).

Masne kiseline se metabolišu procesom β -oksidacije do acetil-CoA u gliksizomima, organelama obavijenim jednostrukom membranom (sa lipidnim dvoslojem) koje predstavljaju specifični tip peroksizoma, a nalaze se u semenima koja deponuju lipide kao rezervne materije (**Sl. 2.14**). Gliksizomi nisu organle za rezervisanje, formiraju se *de novo* kada počne proces klijanja i u njima se nakupljaju enzimi neophodni za katabolizam masnih kiselina i nastanak intermedijera neophodnih za sintezu šećera u procesu glukoneogeneze. Šećeri sintetisani u procesu glukoneogeneze u semenima koja deponuju lipide kao rezervne materije služe kao supstrati ćelijskog disanja tokom klijanja dok ne počne sinteza hlorofila i proces fotosinteze. Prisustvo gliksizoma u ćelijama starijih biljnih organa ukazuje na mobilizaciju lipida u sastavu ćelijskih membrana i njihovo iskorištavanje u ćelijskom disanju. Gliksizomi takođe imaju funkciju u fotorespiraciji, o čemu je bilo reči ranije, kao i u azotnom metabolizmu (kod leguminoza).



Sl. 2.14. Metabolizam rezervnih lipida – triacil glicerola. Od uljanog tela do saharoze: β-oksidacija masnih kiselina i gliksilatni ciklus u gliksizomu; konverzija sukcinata do malata u mitohondriji; sinteza saharoze u citoplazmi od malata, preko oksaloacetata i fosfoenol piruvata. Kreirano u BioRender-u. Pajević, S. (2025); Elektronski izvori slika, str. 159.

Glavna funkcija acetil-CoA koji nastaje β-oksidacijom masnih kiselina u gliksizomima je prenos atoma ugljenika iz acetilne grupe do Krebsovog ciklusa. Pošto masne kiseline ulaze u ćelijsko disanje na nivou Krebsovog ciklusa, korišćenje lipida kao supstrata je moguće samo u aerobnim uslovima, dok je istovremeno, sam metabolički proces konverzije nastalog acetil CoA do sukcinata u gliksilatnom ciklusu anaeroban.

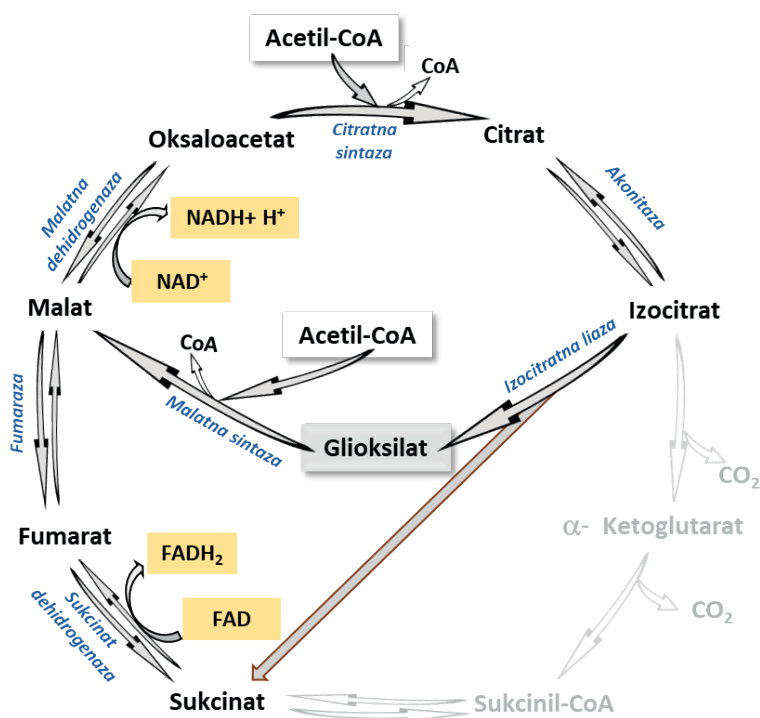
3. **Gliksilatni ciklus** (ili *Ciklus gliksilne kiseline*) obezbeđuje da se svaki par acetil-CoA molekula (nastalih β-oksidacijom masnih kiselina) prevodi u sukcinat (sukcinska, ili čilubarna kiselina) sa 4 C atoma (**Sl. 2.15**). Inicijalno, acetil-CoA reaguje sa oksaloacetatom (enzim: *citratna sintaza*), nastaje citrat koji se eksportuje u citoplazmu i izomerizuje enzimom *akonitazom* u izocitrat. Izocitrat se transportuje nazad u gliksizom i metaboliše do malata preko dve reakcije koje su jedinstvene za gliksilatni ciklus (**Sl. 2.15**):

- Izocitrat (6 C atoma) se razlaže na dva molekula (jedinjenja) enzimom *izocitratnom liazom*, pri čemu nastaje **sukcinat** (4 C atoma) i glioksilat (2 C atoma);
- Nastali glioksilat sa drugim molekulom acetil-CoA gradi **malat** (4 C atoma), što je katalisano enzimom *malatnom sintazom*.

Malat se potom eksportuje iz gliksizoma u citoplazmu i prevodi u oksaloacetat citoplazmatskim izoenzimom *malatnom dehidrogenazom*, a nastali oksaloacetat se transportuje u gliksizom, kombinuje sa molekulom acetil-CoA i uz katalitičko dejstvo enzima *citratne sintaze*, gradi citrat, čime započinje novi ciklus.

Uloga mitohondrija u metabolizmu lipida:

Stvoreni suksinat se iz glioksizoma transportuje u mitohondrije i uključuje u Krebsov ciklus. Glioksilatni metabolički proces (ciklus) predstavlja modifikaciju Krebsovog ciklusa, anaerobni je proces koji se dešava kod biljaka, nekih mikroorganizama i gljiva (nema ga kod životinja i čoveka), a njime je omogućeno iskorišćavanje malih molekula sa vezanim ugljenikom, kao što je acetil-CoA, za proizvodnju energije, naročito kada ćelija nema na raspolaganju dovoljno kompleksnih supstrata kao što su glukoza i saharoza (**Sl. 2.15**). Enzimi koji katališu iste reakcije u glioksilatnom i Krebsovom ciklusu su izoenzimi specifični za glioksizome, odnosno, za mitohondrije.

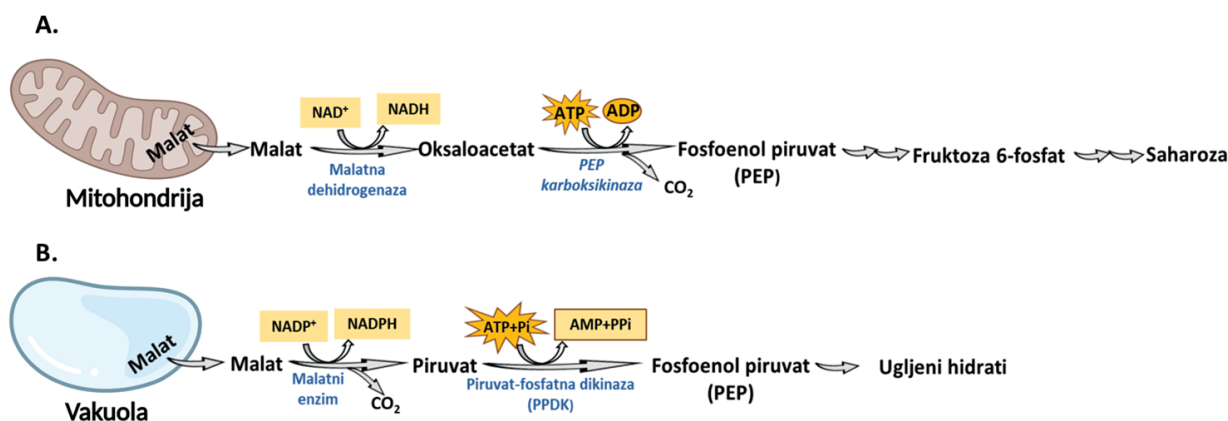


Sl. 2.15. Glioksilatni ciklus: glavne reakcije i enzimi (plavo obeleženi). U glioksilatnom metabolizmu dva molekula Acetil CoA se metabolišu do molekula suksinata (čilibarne kiseline sa 4 C atoma).

Suksinat iz glioksizoma ulazi u mitohondrije i konvertuje se preko fumarata u malat (jabučnu kiselinu) koji se potom eksportuje u citoplazmu u zamenu za suksinat preko specifičnog transportera lociranog u unutrašnjoj membrani mitohondrija. U citoplazmi se malat oksidiše u oksaloacetat aktivnošću enzima malatne dehidrogenaze i služi kao supstrat za sintezu glukoze u procesu obrnutom od glikolize, a to je *glukoneogeneza* (**Sl. 2.16**).

- 4. Glukoneogeneza u citoplazmi** – Glikolitičko razlaganje šećera do piruvata je opšti biohemijski put mobilizacije supstrata ćelijskog disanja, ali većina organizama može da sprovodi sličan metabolički put i *u obrnutom smeru*: od piruvata/organskih kiselina do šećera, što predstavlja biohemijski put glukoneogeneze. Glukoneogeneza se dešava kod biljaka, životinja i gljiva i predstavlja ključni proces kroz koji se vidi povezanost metaboličkih puteva organskih kiselina, amino-kiselina, lipida i ugljenih hidrata. Glukoneogenim metaboličkim putem se mobilizuju lipidi-triacilglicerola deponovani u semenima biljaka uljarica (ricinus, suncokret i sl.) i omogućava se njihovo prevođenje u saharozu, glavni supstrat ćelijskog disanja pogodan za translociranje iz semena koje klija (iz endosperma i kotoledona) u ćelije i tkiva nove biljke koja raste. Glukoneogeneza može da se odvija preko dva biohemijska puta: dominantno, to je biohemijski put predstavljen na **Sl. 2.16**, koji se još naziva i PEPCK glukoneogeni put (od naziva ključnog enzima, *PEP karboksikinaze*). Pored pomenutog, ovaj biohemijski put sinteze šećera,

uključuje i važan enzim – *malatnu dehidrogenazu*. Aktivnošću pomenutih (i drugih) enzima, u ovom najvažnijem glukoneogenom putu, malat koji je eksportovan iz mitohondrija u citoplazmu, oksidiše se malatnom dehidrogenazom do oksaloacetata, koji se potom fosforiliše sa ATP-om i dekarboksiliše aktivnošću enzima *PEP-karboksikinaze*, a nastali glavni intermedijer, fosfoenol piruvat ulazi u proces sinteze šećera (**Sl. 2.16A**).



Sl. 2.16. Glukoneogeneza: dominantan put koji uključuje enzime malatnu dehidrogenazu i PEP-karboksilazu (PEPCK) i stvaranje intermedijera fosfoenol piruvata (A); Deo malata, nastao u procesu mobilizacije lipida, može se privremeno deponovati u vakuolama, odakle se koristi u mnogo manje zastupljenom glukoneogenom metaboličkom putu koji uključuje malatne enzime i piruvat-fosfatnu dikinazu (PPDK) (B).

Kreirano u BioRender-u. Pajevic, S. (2025); Elektronski izvori slika, str. 159.

Moguće je, da se deo malata privremeno uskladišti u vakuolama, odakle će se koristiti u glukoneogenezi. Do nedavno se smatralo da se samo PEPCK glukoneogeni put (katalisan aktivnošću enzima *PEP-karboksikinaze*) koristi za mobilizaciju lipida za energetske potrebe biljaka pri klijanju semena, međutim, novija istraživanja ukazuju da može da postoji i alternativni put glukoneogeneze koji uključuje enzime *piruvat-(orto)fosfatnu dikinazu* (PPDK), kao i *malatni enzim* (**Sl. 2.16B**). Malatni enzim katališe oksidativnu dekarboksilaciju malata, prevodeći ga u piruvat, a potom enzim, *piruvat-fosfatna dikinaza* katališe među-prevodenje ATP-a, fosfata (Pi) i piruvata u AMP, pirofosfat (PPi) i fosfoenol piruvat (PEP). Ovaj (PPDK) glukoneogeni metabolički put je mnogo manje zastupljen u odnosu na prethodno pomenuti – PEPCK put, odvija se uglavnom u listovima/ fotosintetičkim organima i vezan je za specifični fotosintetički metabolizam C₃ i C₄ tipa (videti prethodno poglavlje koje se odnosi na fotosintezu). Brojna naučna istraživanja upućuju na to da je u semenu koje klija i u kome se lipidi koriste kao supstrati ćelijskog disanja, glukoneogeneza po tipu PEPCK dominantna, dok je PPDK glukoneogeni put najčešće zanemarljiv.

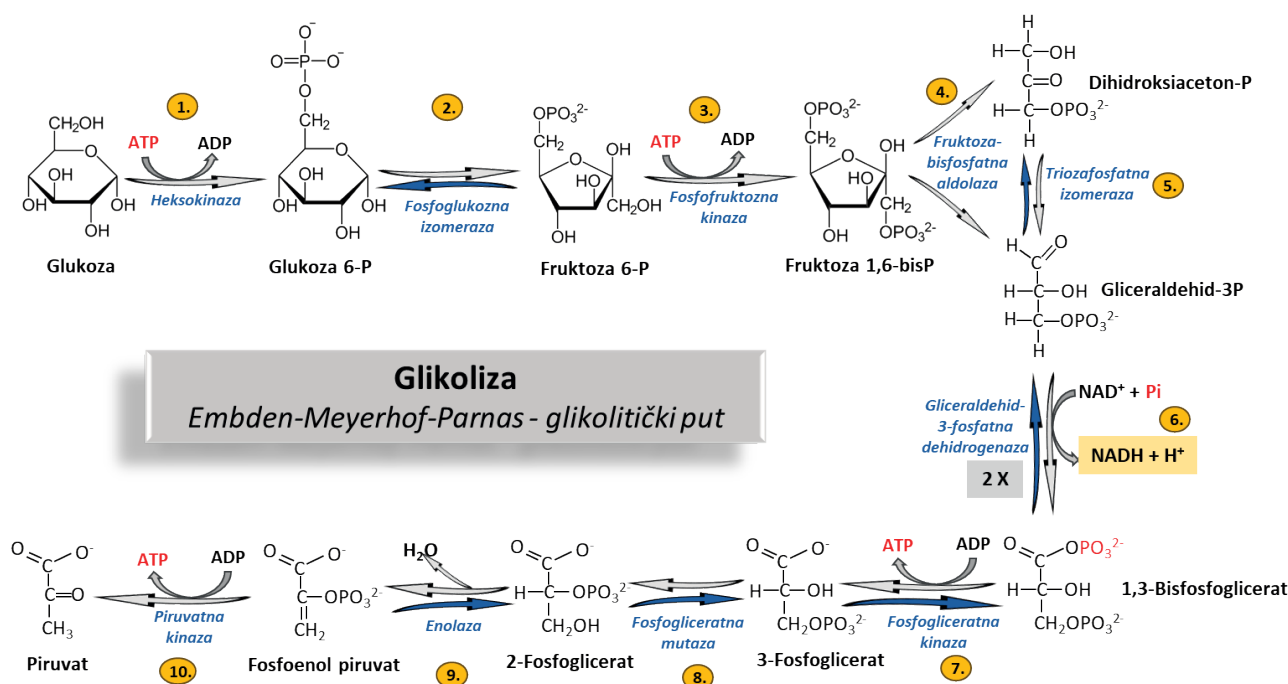
Posebno treba naglasiti da kod semena koja deponuju lipide, oko 30% acetil-CoA se pri klijanju iskorišćava u procesu ćelijskog disanja za proizvodnju ATP, dok se ostatak prevodi u saharozu glukoneogenezom.

2.5 Glikoliza

Glikoliza (od Grčkih reči: „γλυκός“ (glykos) – šećer i „λύση“ (lysis) – cepanje) je univerzalni put kojim se glukoza prevodi u piruvat (pirogroždanu kiselinu) zajedno sa stvaranjem nikotinamid-adenin dinukleotida (NADH) i adenozin trifosfata (ATP). Ovaj metabolički proces se odvija u svim živim organizmima (prokariotima i eukariotima), a principijelnih razlika između reakcija glikolize kod biljaka i životinja (čoveka), gotovo da nema. Međutim, glikolizu biljnih ćelija karakteriše i nekoliko jedinstvenih regulatornih mehanizama, to su: postojanje alternativnih enzimskih reakcija na nekoliko nivoa glikolize i paralelni delimični glikolitički put u plastidima.

Glikoliza se prvenstveno odvija u citoplazmi ćelija i predstavlja niz od 10 hemijskih reakcija kojima se razgrađuje molekul heksoze – glukoze, uz oslobađanje energije (ATP). Jedan molekul glukoze u procesu glikolize, zajedno sa 2 molekulima ATP i fosforom – neorganskim pirofosfatom (Pi, ili P_{Pi}), formira dva molekula piruvata (pirogroždane kiseline – 3C-jedinjenje), 2 molekula NADH i četiri molekula ATP-a. Piruvat potom u aerobnim uslovima, ulazi u proces oksidativne dekarboksilacije - Ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus) koji se odvija u stromi mitohondrija. Prema tome, glikoliza rezultira produkcijom ATP-a i različitih intermedijera, koji su istovremeno prekursori u sintezi brojnih biomolekula. U anaerobnim uslovima piruvat u citoplazmi fermentira u mlečnu kiselinu ili etanol, o čemu će biti reči kasnije.

Proces glikolize se naziva još i: Embden-Meyerhof-Parnas glikolitički put, ili samo, Embden-Meyerhoff-ov metabolički put, kontrolisan je brojnim enzimima i može se predstaviti na sledeći način (**Sl. 2.17**):



Nepovratne (ireverzibilne) reakcije: 1., 3., 10.

Sl. 2.17. Glavne reakcije glikolize (10) i enzimi koji ih katališu.

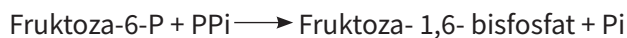
Kao što je već naglašeno, reakcije glikolize odvijaju se u citoplazmi, ali se neki od enzima (invertaza, saharozna sintaza) koji razlažu saharozu do glukoze i fruktoze, nalaze i u plastidima (hloroplastima), tako da se u biljnim ćelijama, početni segmenti glikolize mogu alternativno odvijati i u plastidima. U **tabeli 2.1**, navedeno je 10 reakcija glikolize počev od fosforilacije primarnog supstrata – glukoze, kao i enzimi koji ih katališu (u korelaciji sa **Sl. 2.17**).

Tabela 2.1. Reakcije glikolize i enzimi koji ih katališu.

Reakcija	Enzim	EC br. enz. (Enzyme Commission Number)
1. Fosforilacija glukoze. D(+)-Glukoza se fosforiliše sa ATP - nastaje glukoza-6-fosfat. (<i>Nepovratna reakcija</i>)	Heksokinaza	EC 2.7.1.1
2. Izomeracija glukoza-6-fosfata – nastaje fruktoza-6-fosfat	Glukoza-6-fosfatna izomeraza (<i>Fosfoglukozna izomeraza</i>)	EC 5.3.1.9
3. Fosforilacija fruktoza-6-fosfata sa ATP – nastaje fruktoza-1,6-bisfosfat. (<i>Nepovratna reakcija</i>)	6-P-Fruktokinaza (<i>Fosfofruktokinaza, ili ATP-zavisna fosfofruktokinaza</i>)	EC 2.7.1.11
4. Otvaranje prstena fruktoze-1,6-bisfosfata, koji se cepa u retro-aldolnoj reakciji u D-gliceraldehid-3-fosfat i dihidroksiaceton fosfat.	Fruktoza-bisfosfatna aldolaza	EC 4.1.2.13
5. Izomerizacija dihidroksiaceton-fosfata u gliceraldehid-3-fosfat. Grananje preko dihidroksiaceton-fosfata se usmerava nazad u gliceraldehid-3-fosfat izomerizacijom.	Triozafosfatna izomeraza	EC 5.3.1.9
6. Gliceraldehid-3-fosfat oksidacija (dehidrogenacija) i fosforilacija (neorganskim fosfatom, pirofosfatom-Pi) u 1,3-bisfosfoglicerat. Gliceraldehid-3-fosfat se oksiduje na poziciji C-1 u karboksilnu grupu (kiselinu) i zatim fosforiliše – nastaje 1,3-bisfosfoglicerat.	Gliceraldehid-3-fosfatna dehidrogenaza	EC 1.2.1.12
7. Nastanak ATP-a: Fosfatna grupa na poziciji C-1 se prenosi sa karboksilne grupe na ADP – nastaje 3-fosfoglicerat i ATP (fosforilacija na nivou supstrata).	Fosfogliceratna kinaza	EC 2.7.2.3
8. Izomerizacija 3-fosfoglicerata - nastaje 2-fosfoglicerat	Fosfogliceratna mutaza	EC 5.4.2.1
9. Dehidracija 2-fosfoglicerata – nastaje fosfoenol-piruvat (PEP).	Enolaza	EC 4.2.1.11
10. Nastanak ATP-a: prenos fosfatne grupe sa fosfoenol piruvata na ADP – nastaje piruvat (pirogroždana kiselina) i ATP (fosforilacija na nivou supstrata). (<i>Nepovratna reakcija</i>)	Piruvatna kinaza	EC 2.7.1.40

U početnim fazama glikolize, saharoza se cepa na dve monosaharidne subjedinice, glukozu i fruktozu, a kao što je već rečeno, dva biohemijska puta koordinišu ove reakcije, oba vezana za uključivanje saharoze iz floema u metabolizam ćelija, to su: biohemijski put razgradnje saharoze enzimom *invertazom* i drugi put je onaj u kome je razgradnja saharoze ostvarena enzimom *saharoznom sintazom* (videti poglavlje Fotosinteza, Transport asimilata). Oba enzima razgrađuju saharozu za potrebe glikolize i ako je jedan od njih odsutan, aktivnošću drugog se obezbeđuje supstrat za ćelijsko disanje. Prvi korak u glikolizi (**Sl. 2.17**) je fosforilacija glukoze preko ATP-a kao izvora fosfata, što je katalisano enzimom *heksokinazom*, a produkt je reaktivni oblik glukoze – glukoza-6-fosfat. Ovom reakcijom sprečava se dalja interakcija fosforilisanog molekula glukoze sa transportnim proteinom – glukoznim transporterom (GLUT) i dalja translokacija glukoze kroz ćelijsku membranu, jer negativno naelektrisani fosforilisani molekul glukoze (zbog fosfatnog anjona), ne može napustiti ćeliju i proći kroz negativno naelektrisanu (i hidrofobnu) unutrašnjost plazmaleme. U početnim reakcijama glikolize, svaka heksoza se dva puta fosforiliše, a zatim se razgrađuje, stvarajući dva molekula triozafosfata (reakcije 3 i 4: **Sl. 2.17; Tabela 2.1**). Za potrebe ovih reakcija neophodna su dva, odnosno četiri molekula ATP-a po molekulu saharoze, u zavisnosti od toga da li se ona razgrađuje na heksoze aktivnošću saharozne sintaze, ili invertaze. Enzimi koji katališu ove reakcije su *heksokinaza* i *fosfofruktozna kinaza*, pri čemu je aktivnost fosfofruktozne kinaze, veoma važna regulatorna tačka u procesu glikolize. Ovde treba napomenuti

da osim *ATP-zavisne fosfofruktokinaze*, koja katališe fosforilaciju fruktoza-6-fosfata u fruktoza-1,6-bisfosfat, kod biljaka postoji i citoplazmatski enzim *PPi-zavisna fosfofruktokinaza* (*pirofosfat: fruktoza-6-fosfat 1-fosfo-transferaza*), koja katališe reverzibilnu reakciju fosforilacije fruktoze 6-fosfata sa pirofosfatom:



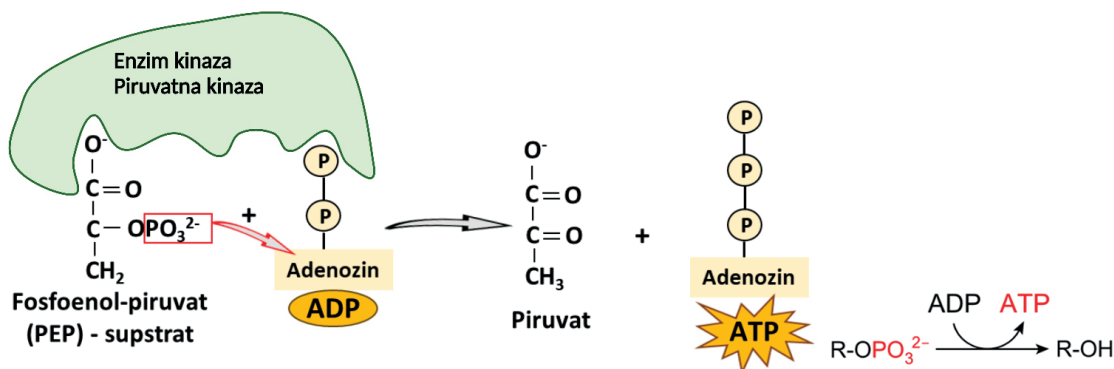
Enzim *PPi-zavisna fosfofruktokinaza* je u citoplazmi biljnih ćelija često prisutan u značajno većoj koncentraciji od *ATP-zavisne fosfofruktokinaze*, ali nema velikog udela u sintezi saharoze. Za regulaciju biljnog metabolizma u smislu očuvanja balansa između ćelijskog disanja (energetskih potreba) i sinteze asimilata (saharoze), aktivnost i međusobni odnos pomenuta tri enzima (*fosfofruktokinaze*, *ATP-zavisne fosfofruktokinaze*, *PPi-zavisne fosfofruktokinaze*) koji učestvuju u prevođenju fruktoza-6-fosfata i fruktoza-1,6-bisfosfata imaju poseban značaj.

Enzim *fruktoza-bisfosfatna aldolaza* katališe reakciju razlaganja fruktoze-1,6-bisfosfata na dva molekula tri-ozafosfata: gliceraldehid-3-fosfat i dihidroksiacetone fosfat koji se prevode jedan u drugi enzimom *triozafosfatnom izomerazom* (reakcija br. 5.; **Sl. 2.17; Tabela 2.1**).

Nastankom trioza-fosfata (gliceraldehid-3-fosfata, GA3-P), sledi faza oslobađanja energije i njeno prevođenje i nakupljanje u makroenergetska jedinjenja ATP i NADH. Enzim *gliceraldehid-3-fosfatna dehidrogenaza* katališe oksidaciju aldehida (GA3-P) u karboksilnu kiselinu (glicerat) pri čemu se NAD^+ redukuje u $\text{NADH} + \text{H}^+$. U ovoj reakciji oslobađa se dovoljno slobodne energije za fosforilaciju fosfoglicerata neorganskim fosfatom (Pi), tako da nastaje 1,3-bisfosfoglicerat, jedinjenje koje poseduje visoku energiju hidrolize i stoga je izuzetno snažan donor fosfatne grupe za fosforilaciju metabolita i enzima. Ova etapa glikolize predstavljena je na **slici 2.17** i u **tabeli 2.1**, pod brojem 6.

U sledećem koraku glikolize (obeleženo brojem 7) katalitičkim dejstvom enzima *fosfogliceratne kinaze* dolazi do stvaranja ATP-a (1 molekul po svakom trioza-fosfatu), tako što se fosfatna grupa sa pozicije C-1 (na karboksilnoj grupi, obeleženo crveno na **Sl. 2.17**) prenosi na ADP i na taj način se obrazuje 3-fosfoglicerat. Po svakom molekulu trioza-fosfata obrazuje se na ovom metaboličkom koraku jedan molekul ATP-a, što znači da po jednom molekulu heksoze nastaju dva molekula ATP-a.

Direktni transfer fosfatne grupe sa molekula supstrata (u ovom slučaju sa 1,3-bisfosfoglicerata) na ADP i formiranje ATP, naziva se **fosforilacija na nivou supstrata** (**Sl. 2.18**). Ovaj način obrazovanja ATP je biohemijski različit u odnosu na sintezu ATP katalisanu ATP-sintazom u hloroplastima (u procesu fotofosforilacije, što je opisano u poglavlju Fotosinteza), ili ATP-sintazom u mitohondrijama (u procesu oksidativne fosforilacije, o čemu će biti reči kasnije u ovom poglavlju).



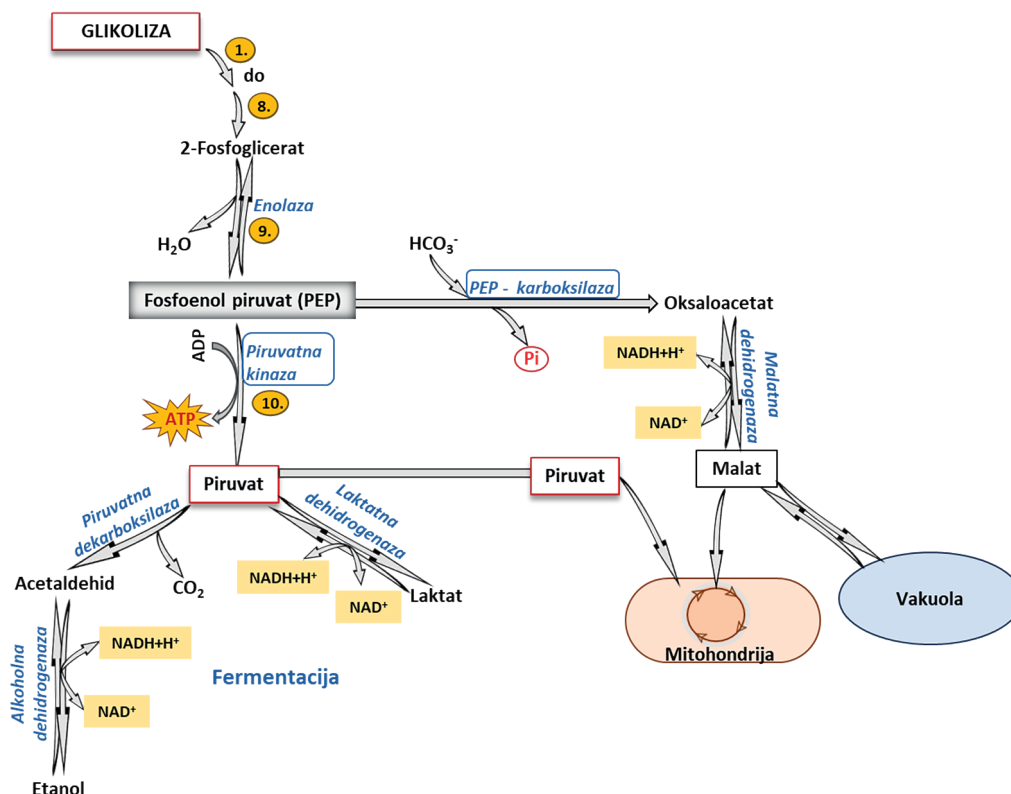
Sl. 2.18. Fosforilacija na nivou supstrata. Kreirano u BioRender-u. Pajevic, S. (2025); Elektronski izvori slika, str. 159.

U sledećoj glikolitičkoj reakciji (pod brojem 8), enzim fosfogliceratna mutaza katališe izomerizaciju 3-fosfoglicerata tako da fosfatna grupa sa pozicije C-3 prelazi na poziciju C-2 i time nastaje 2-fosfoglicerat. Nakon toga, u reakciji pod rednim brojem 9, dehidracijom 2-fosfoglicerinske kiseline, uz katalitičko dejstvo enzima enolaze, nastaje fosfoenol-piruvat (PEP), intermedijer izuzetnog značaja u metabolizmu koji se može uključiti u različite biohemijske puteve: može da se karboksiliše uz pomoć obilno prisutnog citoplazmatskog enzima PEP-karboksilaze, pri čemu može da nastane oksaloacetat, odnosno, nakon redukcije oksalacetata sa NADH, nastaje malat (jabučna kiselina), koji se deponuje u vakuoli i predstavlja rezervoar ugljenika za Kalvinov ciklus (C_4 i CAM metabolizam, o čemu je bilo reči u poglavlju Fotosinteza), ili pak, nastale organske kiseline (malat, oksaloacetat), mogu da se uključe u Krebsov ciklus ćelijskog disanja.

U konačnoj reakciji glikolize (trećoj nepovratnoj), koja je na **sl. 2.17** i u **tabeli 2.1**, obeležena pod rednim brojem 10, fosfatna grupa sa fosfoenol piruvata je donor fosfata za fosforilaciju ADP-a na nivou supstrata, tako da pod dejstvom enzima *piruvatne kinaze* nastaje piruvat (pirogroždana kiselina) i još jedan molekul ATP-a po svakom molekulu trioza-fosfata (**Sl. 2.17**).

2.5.1. Regulacija i energetika glikolize

Glikoliza je regulisana i koordinisana samim produktima (nastali produkti povratno regulišu i koordinišu ceo proces, brzinu i dinamiku reakcija, odnosno, aktivnost enzima – „bottom up“ (engl.) regulacija). Glikoliza ima tri ključna regulatorna koraka, a to su reakcije: 1, 3 i 10 koje su katalisane enzimima *heksokinazom*, *fosfofruktokinazom* i *piruvatnom kinazom* (**Sl. 2.17; Tabela 2.1**). Ovi regulatorni koraci, odnosno reakcije su ireverzibilne. Prema tome, primarne metaboličke reakcije od krucijalnog značaja za tok glikolize dešavaju se na nivou fruktoze 6-fosfata, kao i na nivou fosfoenol piruvata (PEP). PEP je moćan inhibitor enzima *fosfofruktokinaze* (ATP-zavisne *fosfofruktokinaze*, ili *6-P-Fruktokinaze*), istovremeno, aktivnost ovog enzima indukovana je povećanjem P_i , te je stoga odnos: PEP/ P_i u citoplazmi ključan u glikolitičkoj regulaciji. Kod biljaka je formiranje PEP i potom PEP metabolizam koji je kontrolisan enzimima *piruvatnom kinazom* (reakcija br. 10 glikolize) i *PEP-karboksilazom* (reakcija koja usmerava metabolizam prema C_4 /CAM tipu karboksilacije u fotosintezi, videti poglavlje Fotosinteza) od krucijalnog značaja za regulaciju glikolize (**Sl. 2.19**).



Sl. 2.19. Metabolička regulacija glikolize preko fosfoenol-piruvatnog (PEP) metabolizma koji je dominantno određen aktivnošću dva enzima: PEP-karboksilazom i piruvatnom kinazom.

Koristeći PEP kao supstrat, enzim *piruvat kinaza* katalizira drugu važnu fosforilaciju na nivou supstrata u glikolizi, tako da nastaje piruvat i ATP (reakcija br. 10).

Fosfoenol-piruvat (PEP) je od ključne važnosti za metaboličku regulaciju glikolize jer ima **visoku negativnu Gibsovu slobodnu energiju**, (ili energiju hidrolize) koja iznosi: $\Delta G_0' = -61,9 \text{ kJ mol}^{-1}$, što ga čini izuzetno efikasnim donatorom Pi za ATP sintezu i od suštinske je važnosti za pokretanje ukupnog metaboličkog toka ka formiranju piruvata.

Regulacija glikolize preko dinamike aktivnosti enzima i posledično, preko stvaranja intermedijera veoma je značajna u metabolizmu biljaka zbog toga što na taj način biljke kontrolišu kvalitativni i kvantitativni odnos ugljenih hidrata (saharoze, heksoza, trioza) u metabolizmu, njihovo fosforilisanje i snabdevanje preko floemskog fluksa. Već je napomenuto koliko su saharoza i glukoza/ fruktoza važni u prenošenju signala i regulaciji rasta i razvika biljaka. Tako npr. enzim *heksokinaza* je pored važne funkcije u glikolizi istovremeno i receptor glukoze, koji u prenosu signala učestvuje u ekspresiji specifičnih gena za enzime regulatore metabolizma ugljenih hidrata.

Energetika glikolize – energija skladištena u produktima glikolize:

Finalni neto produkti koji nastaju anaerobnom glikolitičkom razgradnjom jednog molekula glukoze u citoplazmi ćelija su:

- 2 molekula piruvata;
- 2 molekula NADH (jedan molekul po svakom nastalom trioza-fosfatu;
- 4 molekula ATP-a (dva molekula po svakom trioza-fosfatu nastaju fosforilacijom na nivou supstrata).

Na samom početku procesa, za fosforilaciju/ aktiviranje jednog molekula heksoze utrošeno je 2 molekula

ATP-a, tako da neto energetska dobit za ćeliju iznosi 2 molekula ATP.

Sumarna jednačina glikolize je:



ATP se hidrolizuje u ADP u egzergonoj reakciji:

$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADP} + \text{Pi} + \text{slobodna energija}$; izračunati ΔG za hidrolizu 1 mola ATP je -57 kJ/mol (kao što je već objašnjeno).

ADP se kombinuje sa fosfatom da bi se formirao ATP u endergonoj reakciji:



Ovim reakcijama su veoma bitne za kontinuirano održavanje rezervoara ATP/ADP za stabilni metabolizam ćelije.

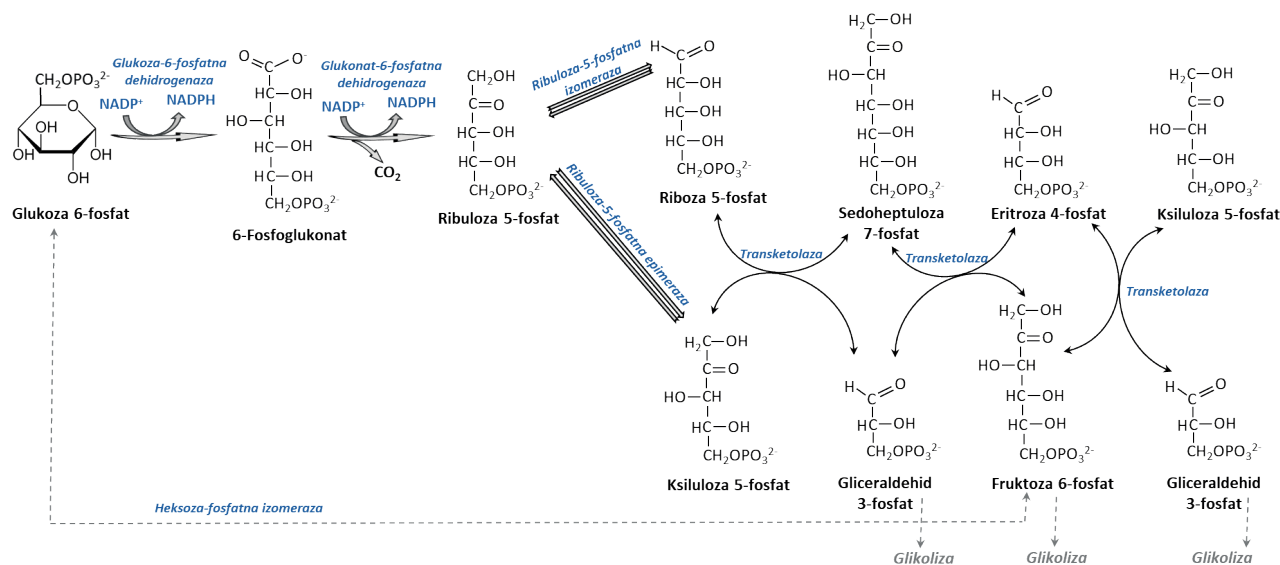
2.6. Oksidativni pentozno-fosfatni put (OPPP) – Ciklus oksidativne razgradnje glukoze u citoplazmi i hloroplastima – direktna oksidacija glukoze

U biljnim ćelijama postoje dva puta oksidacije ugljenih hidrata, to su glikoliza i oksidativni pentozno-fosfatni put (OPPP), koji predstavlja alternativni put za razgradnju glukoza-6-fosfata. Ovim biohemijskim putem stvara se reduktant NADPH, neophodan za brojne biosintetičke procese uključujući asimilaciju neorganskog azota i biosintezu masnih kiselina, kao i za održavanje redoks potencijala neophodnog u zaštiti od oksidativnog stresa. NADPH je redukujuća snaga potrebna za sintezu masnih kiselina, sterola, nukleotida i neesencijalnih amino-kiselina. Prevođenje oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovani glutation (GSH) preko NADPH (uz katalitičko dejstvo enzima glutation reduktaze) je važno za ćelijsku antioksidativnu odbranu; NADPH služi i kao supstrat enzimima *NADPH-oksidazama* koje proizvode reaktivne vrste kiseonika (ROS). Reverzibilni deo OPPP je izvor intermedijera za sintezu brojnih esencijalnih jedinjenja, kao što su nukleotidi, odnosno nukleinske kiseline RNK i DNK: riboza-5-fosfat (R5P) obezbeđuje ribozilni deo nukleotida i prekursor je za biosintezu purinskih skeleta i eritroza-4-fosfata, koji je prekursor za biosintezu aromatičnih amino kiselina. NADPH i R5P su dva metabolita od vitalnog značaja za vitalnost i deobu ćelija.

Oksidativni pentozno-fosfatni put (OPPP) dešava se u citoplazmi i plastidima biljnih ćelija, važan je deo metabolizma glukoze, u kome se glukoza, odnosno, glukoza-6-fosfat (G6P), oksidiše u pentozu: ribulozu 5-fosfat (Ru5P). Ugljenik se gubi u obliku CO_2 , a redukujuća energija se konzervira u NADPH (redukovani nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat). Ru5P se potom u seriji reakcija pentozno-fosfatnog biohemijskog puta, a koje se odvijaju u uslovima približnog energetskog ekvilibrijuma, konvertuje u fosfatne šećere koji sadrže od tri (troiza-fosfati) do sedam (sedoheptuloza-fosfati) ugljenikovih atoma (**Sl. 2.20**).

Pentozno-fosfatni biohemijski put (PPP) kojim se obezbeđuje generisanje pentoza-fosfata i održavanje njihovog rezervoara za potrebe metabolizma je od kritične važnosti za fotosintezu, što je polovinom XX veka otkrio istraživač Benson definišući redukcioni pentozno-fosfatni put (RPPP), tzv. Calvin-Bensonov ciklus, odnosno, tamnu fazu fotosinteze (videti poglavlje Fotosinteza), sa intermedijerima ribulozom (5-C) i sedoheptulozom (7-C). *Pentozno-fosfatni put (PPP) je podeljen na oksidativnu granu u kojoj se stvaraju pentoza-fosfati i neoksidativnu, u kojoj se troše pentoza fosfati* (**Sl. 2.20**).

U reakcijama oksidativne grane pentozno-fosfatnog ciklusa koje su katalisane i koordinisane rastvorljivim enzimima u citoplazmi i hloroplastima, ne troši se, niti proizvodi energija u obliku ATP-a (**Sl. 2.20**).



Sl. 2.20. Oksidativni pentozno-fosfatni metabolički put glukoze (OPPP) je glavni izvor redukcione energije (NADPH) i riboza 5-fosfata (R5P), te brojnih intermedijera koji se vraćaju u glikolizu, ili se pak, koriste u različitim metaboličkim putevima.

Metabolički put direktne oksidacije glukoze, ili oksidativni pentozno-fosfatni put (OPPP), naziva se još i **fosfoglukonatni put**, **heksoza-monofosfatno skretanje**, ili **heksoza-monofosfatni šant** (HMP šant, engl. „shunt“ – skretnica), paralelan je sa glikolizom, a njime se generišu NADPH i pentoze, kao što je riboza 5-fosfat, prekursor za sintezu nukleotida. Zavisno od uslova gajenja specifičnih biljnih vrsta, kao i od faze njihovog ontogenetskog razvića, razlikuju se metaboličke potrebe biljaka za određenim intermedijerima, tako da to određuje u velikoj meri udeo glikolitičkog, odnosno, oksidativnog pentozno-fosfatnog puta razgradnje glukoze u ćelijskom metabolizmu. Postoje eksperimentalni podaci koji ukazuju na dominaciju glikolize u početnim fazama razgradnje šećera (i do 80%), ali se ne mogu zanemariti ni rezultati koji ukazuju da je OPPP u hloroplastima često dominantan ne samo kod biljaka, već i kod drugih fotosintetičkih organizama, kao što su alge i fotosintetičke bakterije.

Prve dve reakcije u OPPP čine **oksidativnu fazu** i uključuju oksidativnu dekarboksilaciju heksoze, glukoze 6-fosfata u pentoze, ribulozu 5-fosfat uz nastanak 2 molekula NADPH (**Sl. 2.20**). Ove reakcije su nepovratne i njima se biljna ćelija snabdeva sa NADPH preko noći, u odsustvu fotosinteze, što je veoma bitno, jer kada sa svetlošću krene fotosinteza (svetla faza i aktiviranje enzima tamne faze), ima dovoljno NADPH za fazu redukcije u Calvin-Bensonovom ciklusu. Ostale reakcije OPPP su povratne (reverzibilne) i predstavljene su na slici dvosmernim strelicama, čime se omogućava kontinuirano snabdevanje hloroplasta sa pentoza, te sinteza fotoasimilata i kada su oksidativne reakcije OPPP-a inhibirane – na primer, u hloroplastima na svetlosti (**Sl. 2.20**).

Neoksidativna faza počinje reakcijom ribuloza-5-fosfata sa *ribuloza-5-fosfatnom izomerazom* ili *ribuloza-5-fosfatnom epimerazom*, nakon čega sledi niz reakcija katalisanih *transketolazom* i *transaldolazom*. Ove reakcije rezultiraju stvaranjem fruktoze 6-fosfata i gliceraldehid 3-fosfata, koji se potom mogu metabolisati u glikolizi i generisati piruvat. Alternativno, glukoza 6-fosfat se može regenerisati iz gliceraldehid 3-fosfata i fruktoze 6-fosfata glikolitičkim enzimima (**Sl. 2.20**).

Stoga se direktna oksidacija glukoze može predstaviti reakcijama koje se odvijaju u dve faze:

Prva faza je oksidacija glukoze 6-fosfata u pentozu-fosfat, dok drugu fazu čine reakcije koje rezultiraju regeneracijom glukoze 6-fosfata: šest obrta OPPP-a. Sumarna jednačina ovog metaboličkog puta je je:



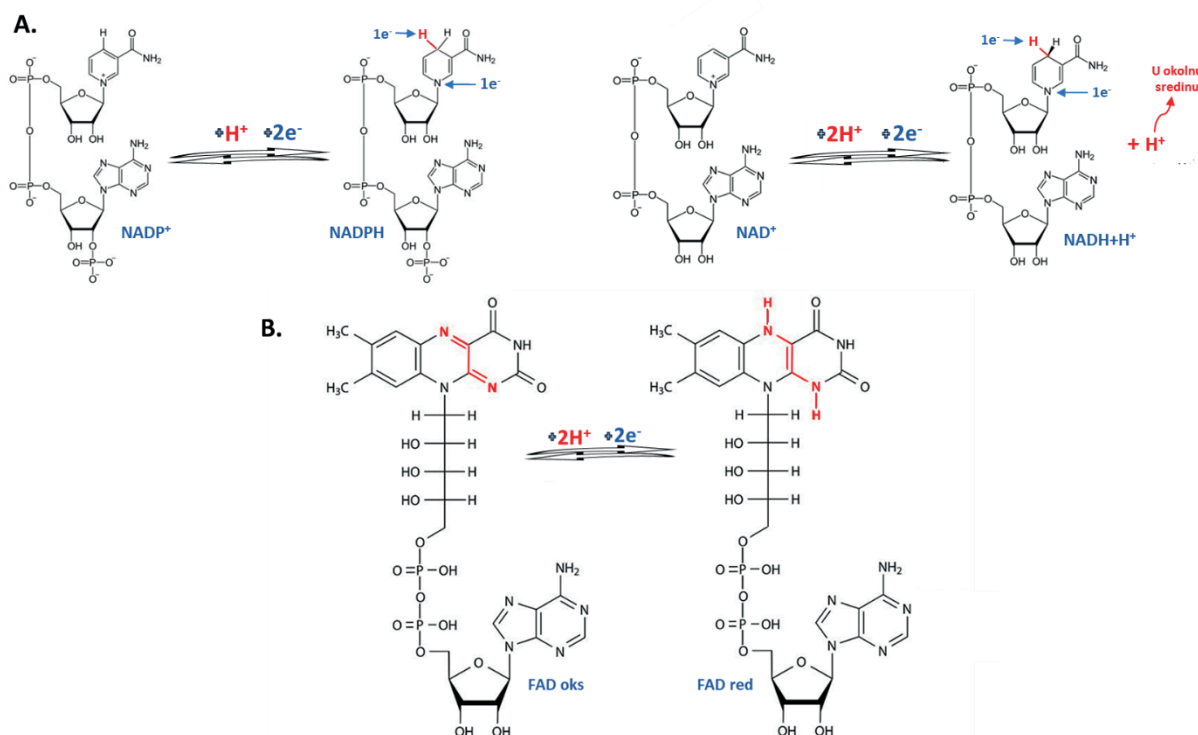
Konačni, neto učinak je potpuna oksidacija jednog molekula glukoze 6-fosfata do CO_2 (5 molekula se regeneriraju) i istovremeno, 12 molekula NADPH.

Kao i kod glikolize, reakcije OPPP su katalisane različitim izoformama enzima koji postoje u citosolu i/ili u plastidima. Iako *transketolaza* i *transaldolaza* mogu biti odsutne u citosolu nekih biljnih vrsta, njihova katalitička aktivnost za potrebe reakcija neoksidativne grane pentozno-fosfatnog metaboličkog puta se održava pomoću proteina-fosfatnih translokatora koji se nalaze u/namembranama unutrašnjeg omotača plastida i prenose ugljeno-hidratne (šećerne) fosfate.

2.7. Nastanak, prevođenje i promet NADP(H), NAD(H) i FAD(H₂) u biljoj ćeliji

Piridinski nukleotidi: nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat [NADP(H)] i nikotinamid adenin dinukleotid [NAD(H)] zauzimaju centralno mesto u ćelijskom metabolizmu delujući istovremeno kao energetska depoi i prenosioci energije, zatim kao signalni molekuli i redoks parovi ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$; NAD^+/NADH). Nedostatak ili disbalans između oksidovane i redukovane forme ovih redoks parova dovodi do poremećaja u metabolizmu i samim tim do ozbiljnih i patoloških promena tokom razvika biljaka, zbog toga što NAD i njegov derivat NADP predstavljaju metabolite sa centralnom i esencijalnom ulogom u upravljanju metaboličkim oksido-redukcionim procesima, te u održavanju ćelijske (redoks) homeostaze. Redukovane forme, NADPH i NADH su donori elektrona i protona i zbog toga su nezamenljivi u fotosintezi, disanju, redukciji nitrata, sintezi proteina i nukleinskih kiselina, sintezi lipida, sintezi antioksidantnih molekula (glutaciona) i dr.

NADPH/NADP⁺, kao i NADH/NAD⁺ su organski kofaktori (koenzimi) koji sa velikim brojem enzima katališu ćelijske redoks reakcije (Sl. 2.21).



Sl. 2.21. Molekularna struktura i reakcije glavnih nukleotida – prenosioca elektrona u ćelijskom disanju: A. redukcija NADP^+ u NADPH i NAD^+ u $\text{NADH} + \text{H}^+$; B. redukcija FAD u FADH_2 .

Enzimi *NAD(P)-kinaze* katališu fosforilaciju NAD(H) u NADP(H), preko ATP-a i imaju centralnu ulogu u regulaciji konverzije NAD(H)/ NADP(H).

NADH koristi slobodnu energiju nastalu u biološkim oksidativnim procesima za sintezu ATP-a (u procesu oksidativne fosforilacije), dok NADPH koristi deponovanu slobodnu energiju poreklom iz bioloških oksidacionih procesa za redukciju različitih metabolita u endergonim reakcijama biosinteze.

2.8. Standardni elektrohemijski (redukcionni) potencijal redoks polureakcija ($\mathcal{E}^0$) i Standardna Gibsova slobodna energija (ΔG^0) u oksido-redukcionim reakcijama ćelijskog metabolizma

Iako je ranije bilo reči o toku energije u metaboličkim oksido-redukcionim reakcijama, kao i o energetske transformaciji ATP/ADP/AMP, na ovom mestu ćemo se opet osvrnuti na pojam Standardne Gibsove slobodne energije, kao i na energersku transformaciju NADP⁺/NADPH, odnosno, NAD⁺/NADH i FAD/FADH.

Kako elektroni ne mogu postojati slobodno u nekoj sredini/rastvoru, već moraju biti vezani u atomima, odnosno, molekulima, svaka redoks reakcija se sastoji od dve spregnute polureakcije, gde jedna supstanca donira elektrone i tako postaje oksidovani proizvod dok druga supstanca prihvata elektrone i tako postaje redukovani proizvod. Konjugovani redoks par se stoga odnosi na akceptora i donora elektrona/protona jedne polureakcije. Redoks potencijal, ili standardni elektrohemijski redukcionni potencijal neke supstance, $\mathcal{E}^0$ (V) predstavlja njenu sposobnost da u oksido-redukcionom nizu spregnutih (polu)reakcija bude donor, ili akceptor elektrona: visok negativni redukcionni (redoks-) potencijal supstance ukazuje na lako otpuštanje elektrona, te je ta supstanca donor elektrona, odnosno redukujuće sredstvo; supstanca koja ima viši – pozitivniji (manje negativan, ili visok pozitivan) redukcionni potencijal lako prima elektrone, sama se redukuje, a predstavlja oksidaciono sredstvo.

U jednoj reakciji redukcije, nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat (NADP⁺/ NADPH) je prenosioc 2 elektrona ($2e^-$) i istovremeno 1 protona (H^+), dok je nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺/NADH) koenzim koji istovremeno u oksido-redukcionim reakcijama prenosi $2e^-$ i $2 H^+$ i u svojoj strukturi nema fosfatnu grupu (**Sl. 2.21A**). Sličnu funkciju imaju i flavoproteinski prenosioci elektrona i protona sa flavinskim kofaktorima: flavin-adenin-dinukleotidom (FAD/FADH) i flavin-mononukleotidom (FMN/FMNH) koji prenose po $2e^-$ i $2 H^+$ u jednoj oksido-redukcionoj reakciji (**Sl. 2.21B**):



Treba napomenuti da su apsolutne veličine $\mathcal{E}^0$, promenljive, izražene su kao približne vrednosti, a zavise od konkretnih uslova metabolizma (fotosinteza, disanje, redukcija nitrata i dr.).

Kako je $\mathcal{E}^0$, povezan sa ΔG^0 u oksido-redukcionom nizu spregnutih reakcija u ćeliji (transportu elektrona)?

Redukcionni potencijal $\mathcal{E}^0$ neke redoks-(polu)reakcije je povezan sa promenom slobodne Gibsove energije ΔG^0 u sistemu prema jednačini:

$\Delta G^0 = -n F \mathcal{E}^0$; gde je:

F – Faradejeva konstanta, koja iznosi 96500 C/mol, odnosno, 96,5 da bi vrednost bila izražena u kJ/mol;

n – broj elektrona koji se prenosi od donora do akceptora.

ΔG^0 i $\mathcal{E}^0$ u ćeliji (u spregnutim reakcijama ćelijskog metabolizma) imaju suprotne predznake, povezani su i za-

jednički ukazuju na povoljnost toka reakcija (spontanost).

Kada je $\varepsilon^0 > 0 \longrightarrow \Delta G^0 < 0$, reakcija je spontana, egzergona, odnosno termodinamički favorizovana, a ukoliko je obrnuto, $\varepsilon^0 < 0 \longrightarrow \Delta G^0 > 0$, reakcija je endergona, o čemu je već bilo reći.

ε^0 je više određena (limitirana) redoks reakcijama i ukazuje na energiju koja se oslobađa (za vršenje rada) kada se dešava redoks transport (transport elektrona).

Kada se enzimski kofaktor NAD(P)^+ redukuje u NAD(P)H , on prihvata elektrone i stoga je to reakcija redukcije, a istovremeno se apsorbira energija iz okoline kako bi se formirala veza koja vezuje jon vodonika za molekul, tako da je ovaj proces endergona reakcija. NADPH ima esencijalnu ulogu u anaboličkim-endergonim reakcijama, gde je neophodan kao redukciono sredstvo - donor elektrona i protona. U ovim reakcijama se apsorbira (iskorištava) energija za stvaranje složenijih/ većih molekula od manjih: primer anaboličke reakcije je sinteza proteina od amino-kiselina. $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ je neophodan u fotosintezi – NADPH je produkt svetlosne faze fotosinteze koji omogućava redukciju trioza fosfata u Calvin-Bensonovom ciklusu, takođe je neophodan u oksidativnom pentozno-fosfatnom ciklusu, tako da najčešće svoju aktivnost ispoljava u citoplazmi, ali se ne može zanemariti ni njegova uloga u mitohondrijskom metabolizmu.

Citoplazmatski NADPH ima ulogu u odbrani ćelije od oksidativnog stresa i predstavlja supstrat za reakcije u kojima se eliminišu reaktivne kiseonične vrste molekula (ROS). Kako mitohondrije biljnih ćelija imaju enzim NADP -dehidrogenazu koja je locirana na spoljašnjoj strani unutrašnje membrane mitohondrija, mitohondrijska oksidacija preko NADPH koji je poreklom iz OPPP, ima značajni uticaj na ukupni redukcionni potencijal ćelije jer elektroni sa NADPH (ne samo sa NADH) mogu redukovati konačni akceptor – O_2 i na taj način učestvovati u generisanju transmembranskog elektrohemijjskog gradijenta za sintezu ATP u procesu oksidativne fosforilacije.

Plastidni (hloroplastni, amiloplastni) NADPH koji nastaje u OPPP hloroplasta u toku noći, odnosno u amiloplastima ćelija korenova, plodova i dr., ima važnu ulogu u biosintetičkim putevima, kao što su asimilacija azota i sinteza lipida. NADPH koji je nastao direktnom oksidacijom glukoze 6-fosfata (u OPPP) ima i ulogu signalnog molekula za pokretanje i kontrolu sinteze skroba u amiloplastima (preko tioredoksinskog sistema, o čemu je bilo reći u poglavlju Fotosinteza).

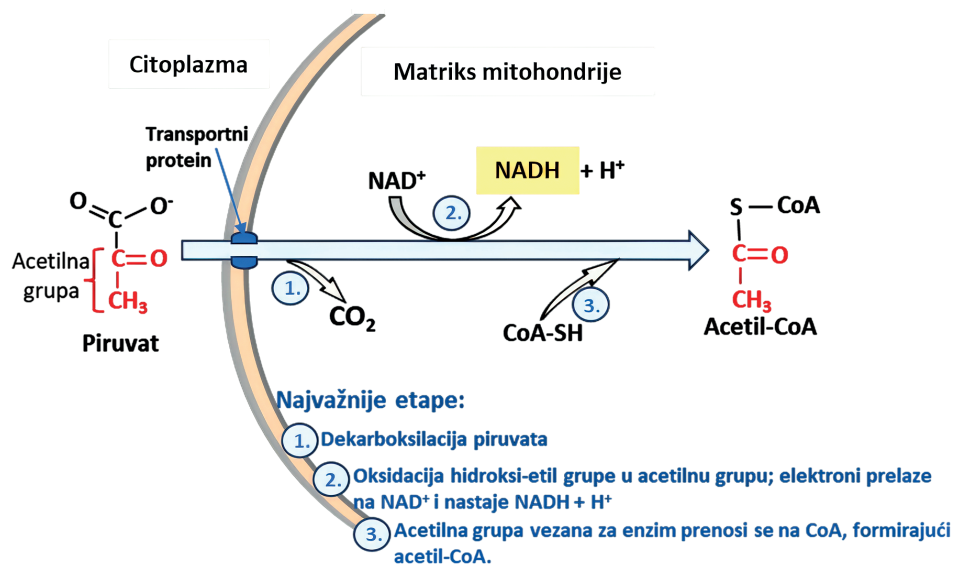
NAD^+/NADH je uglavnom metabolički aktivan u mitohondrijama, o čemu će biti više reći kada se bude govorilo o Krebsovom ciklusu (Ciklusu limunske kiseline) i o transportu elektrona i oksidativnoj fosforilaciji - sintezi ATP. NAD^+ je u kataboličkim-egzergonim reakcijama potreban kao oksidativno sredstvo. U ovim reakcijama, složeni molekuli se razlažu na manje jedinice i oslobađaju energiju. Primer kataboličke reakcije je razgradnja glukoze tokom ćelijskog disanja i oslobađanje energije.

Iz ovoga se jasno zaključuje da na nivou ćelije, ali i na nivou subćelijskih struktura/organela, postoji jasna kompartmentacija NAD(H) i NADP(H) , odnosno, razdvojenost signalnih puteva koordinisanih enzimima koji svoje katalitičko dejstvo ostvaruju koristeći ove kofaktore. Na ovaj način, omogućeno je normalno ćelijsko funkcionisanje i izbegavanje redoks stresa.

Oksidativni pentozno-fosfatni biohemijjski put je regulisan brojnim enzimima (familijama izoenzima) čija je zastupljenost i katalitička aktivnost zavisna od redoks potencijala spregnutih oksido-redukcionih reakcija i njihovih produkata/intermedijera u specifičnim tkivima/ organima. Redoks regulacija OPPP je naročito vidljiva u inicijalnoj reakciji direktne oksidacije (dehidrogenacije) glukoze 6-fosfata pomoću *glukoze 6-fosfat dehidrogenaze*, enzima čija je aktivnost inhibirana visokim odnosom $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. Na svetlosti je kod biljaka mali doprinos OPPP ukupnom metabolizmu: *glukoza 6-fosfat dehidrogenaza* je inhibirana *feredoksin-tioredoksin sistemom*, kao i redoks parom $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$.

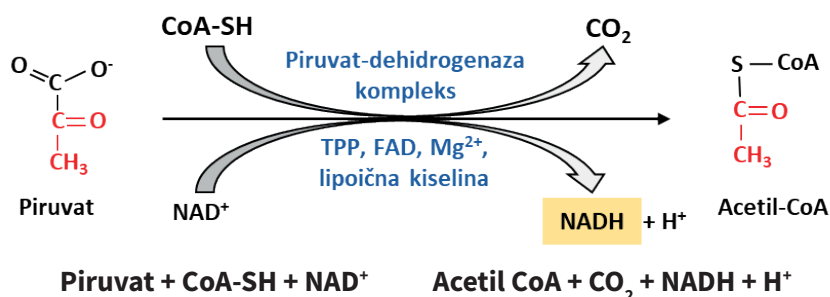
2.9. Formiranje Acetil-CoA u mitohondrijama

Nakon glikolize, nastali molekuli piruvata se u aerobnim uslovima transportuju u stromu (matriks) mitohondrija, gde se u procesu oksidativne dekarboksilacije katalisane enzimom piruvatnom dehidrogenazom, oslobađa CO_2 i nastaje jedinjenje sa 2 C atoma: acetil-CoA (Sl. 2.22).



Sl. 2.22. Oksidativna dekarboksilacija piruvata: svaki molekul piruvata gubi karboksilnu grupu oslobađajući CO_2 ; preostala dva ugljenika se zatim prenose na CoA da bi se proizveo acetil-CoA.

Piruvat iz glikolize, ali i iz drugih biohemijskih procesa ulazi iz citoplazme u mitohondrije preko specifičnog proteinskog transportera. U matriksu mitohondrija nalazi se enzimski sistem, odnosno, enzimski kompleks – **piruvat dehidrogenaza**, koji katališe prevođenje piruvata u ugljen-dioksid i acetilni deo molekula acetil-CoA. Karboksilna grupa se odvaja iz piruvata oslobađajući molekul CO_2 u okolni medijum, što predstavlja prvo oslobađanje ugljenika i početak oksidativne razgradnje glukoze u procesu ćelijskog disanja. Nakon dekarboksilacije piruvata, nastala hidroksi-etil grupa, se oksidiše u acetilnu grupu preko NAD^+ koji uzima elektrone, redukuje se i nastaje $\text{NADH} (+\text{H}^+)$. Visoko-energizovani elektroni iz NADH će biti iskorišćeni za sintezu ATP-a u procesu oksidativne fosforilacije. Enzimski vezana acetilna grupa se potom vezuje za SH-grupu (tiolnu grupu) molekula CoA, zbog čega se CoA često prikazuje u biohemijskim jednačinama kao CoA-SH . Pošto je CoA po hemijskom sastavu tiol (sumporni tiol, analog alkohola), acetil CoA je tio-estar, sa atomom sumpora koji zamenjuje kiseonik standardnog (uobičajenog) karboksilnog estera. Tio-estri su visokoenergetska jedinjenja i njihovom hidrolizom se oslobađa dovoljno energije za pokretanje drugih reakcija, što im daje izuzetnu ulogu u metabolizmu. Prelasku acetilne grupe iz piruvata na CoA prethodi reakcija oksidacije, a ceo proces uključuje nekoliko enzima, koji su svi deo piruvat dehidrogenaza kompleksa (Sl. 2.23).



Sl. 2.23. Oksidativna dekarboksilacija piruvata u matriksu mitohondrija

Ova reakcija je egzergona ($\Delta G^0 = -33,4 \text{ kJ mol}^{-1}$, odnosno, $-8,0 \text{ kcal mol}^{-1}$); NADH i H^+ se potom koriste u metabolizmu za generisanje ATP preko elektronskog transporta u unutrašnjoj membrani mitohondrija.

Enzimski kompleks *piruvatna dehidrogenaza* se kod eukariota sastoji od tri međusobno povezana enzima: piruvat-dehidrogenaza (E1 (EC 1.2.4.1)), dihidrolipoil-transacetilaza (E2 (EC 2.3.1.12)) i dihidrolipoil- dehidrogenaza (E3 (EC 1.8.1.4)), sa vezujućim proteinom - dihidrolipoil-dehidrogenaza-vezujući (binding) protein (E3BP). Aktivnost proteinskog kompleksa, odnosno, njegovih subjedinica ostvarena je preko kofaktora: tiamin pirofosfata (TPP), Mg^{2+} , lipoične kiseline (lipoat), NAD^+ , kao i FAD (**Sl. 2.23**). U nekoliko faza, međuprodukti reakcije formiraju kovalentne veze sa enzimskim kompleksom, odnosno, sa njegovim kofaktorima. Piruvat dehidrogenaza ima značajnu ulogu u regulaciji ćelijskog disanja, jer od njene aktivnosti zavisi količina acetil-CoA neophodnog za inicijalnu reakciju Krebsovog ciklusa, a to je sinteza limunske kiseline.

2.10. Ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus ili Ciklus trikarboksilne kiseline – TCA ciklus)

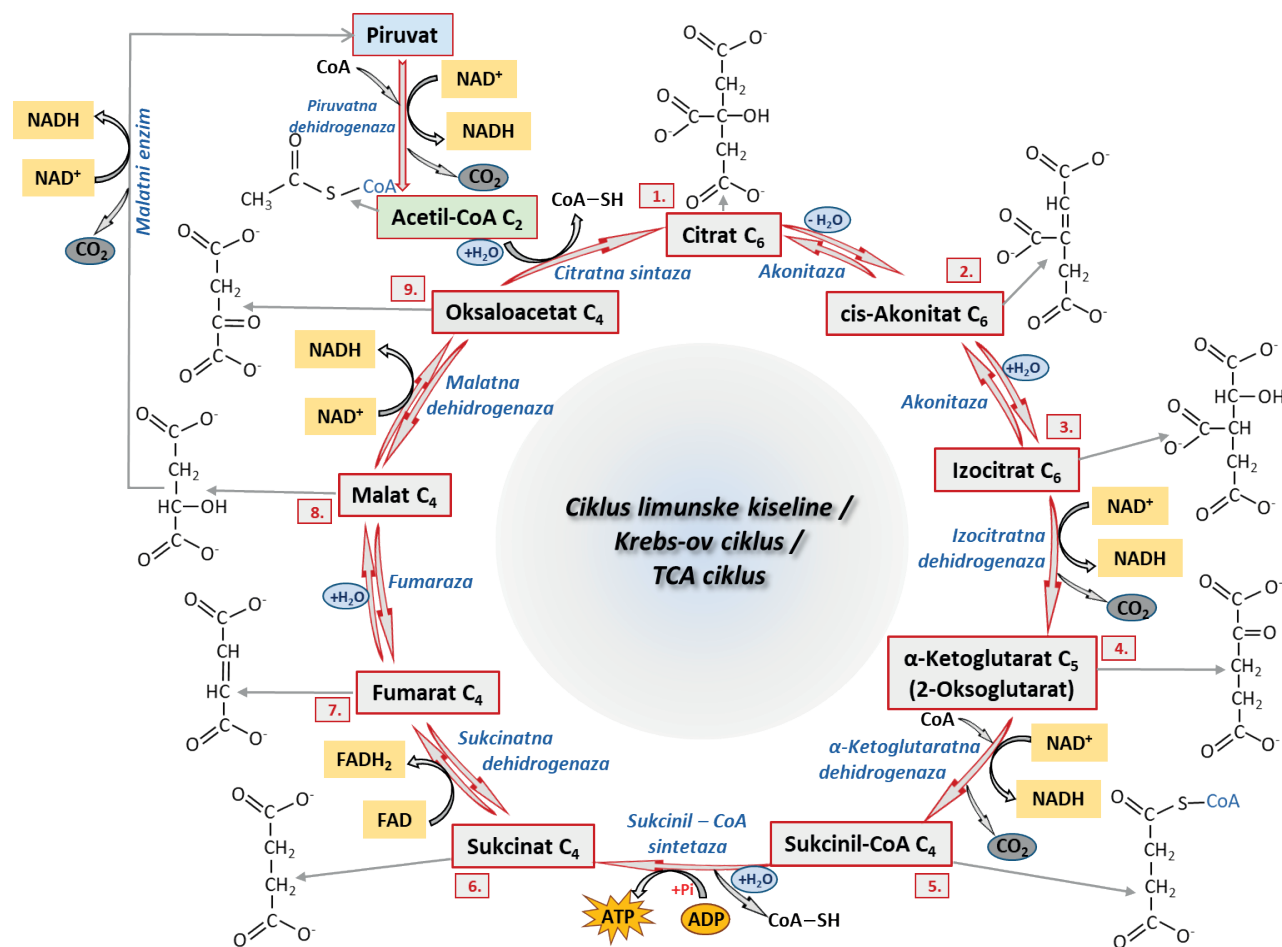
Nastankom piruvata manje od 25% energije deponovane u glukozi/saharozi je oslobođeno za metaboličke potrebe u formi ATP-a i $\text{NADH} + \text{H}^+$. Ciklus limunske kiseline je metabolički put koji se dešava u matriksu mitohondrija i kojim je omogućena konačna dekarboksilacija glukoze, odnosno piruvata nastalog u glikolizi.

Ciklus limunske kiseline su 1937. godine identifikovali nemački istraživač Hans Adolf Krebs i Vilijam Artur Džonson sa Univerziteta u Šefildu. Oni su dokazali postojanje niza hemijskih reakcija kojima se krajnji proizvod razgradnje šećera, za koji se kasnije pokazalo da je „aktivirani“ oblik sirćetne kiseline sa dva ugljenika (acetil-CoA), vezuje sa oksalosirćetnom kiselinom koja ima četiri ugljenika, pri čemu nastaje limunska kiselina. H. A. Krebs je za ovo otkriće dobio Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu 1953. godine, te se zbog toga ovaj ciklus naziva i Krebsov ciklus, pored naziva: Ciklus trikarboksilnih kiselina (TCA ciklus), odnosno, Ciklus limunske kiseline (po prvom produktu).

Nakon inicijalne oksidativne dekarboksilacije piruvata u mitohondrijama (**Sl. 2.24**), sa nastalog 2C– jedinjenja – acetil-CoA („aktivirani“ oblik sirćetne kiseline), prenosi se acetilna grupa na 4C – jedinjenje (oksaloacetat/oksalosirćetnu kiselinu) i stvara se 6C-jedinjenje (citrat/limunska kiselina). Na kraju ovog ciklusa, molekul glukoze je u potpunosti razložen, a C-atomi su oslobođeni u obliku CO_2 .

Acetil-CoA potreban za početak Krebsovog ciklusa nastaje oksidativnom dekarboksilacijom piruvata iz glikolize, ali može da vodi poreklo i od lipida/ masnih kiselina, odnosno od proteina/ amino-kiselina.

*U Krebsovom ciklusu, „izvlače“ se elektroni visoke energije iz molekula acetil-CoA i prenose se na nosače elektrona, kao što su nikotinamid-adenin dinukleotid (NAD^+) i flavin-adenin dinukleotid (FAD), koji se redukuju u NADH i FADH_2 . Ovi prenosioci (nosači) elektrona zatim učestvuju u oksidativnoj fosforilaciji i lančanim reakcijama transporta elektrona, što dovodi do proizvodnje ATP-a (**Sl. 2.24**).*



Sl. 2.24. Ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus) sa sintezom acetil-CoA i sintezom piruvata iz malata; reakcije i enzimi.

Piruvat koji ulazi u mitohondrijski matriks se pre samog TCA ciklusa dekarboksiliše u oksidativnoj reakciji katalisanoj enzimom piruvatnom dehidrogenazom, tako da nastaju produkti: NADH, CO₂ i acetil-CoA (acetilna grupa poreklom od piruvata je preko tioestarske veze vezana za kofaktor, koenzim A (CoA)).

Korak 1: Nastajanje citrata.

U prvom koraku ciklusa, acetilna grupa molekula acetil-CoA, sa dva atoma ugljenika, nakon oslobađanja CoA, reaguje sa molekulom koji ima četiri atoma ugljenika – oksaloacetatom, oslobađajući molekul sa šest ugljenikovih atoma – citrat (limunsku kiselinu, C₆H₈O₇) sa tri karboksilne grupe, od čega potiče i naziv ciklusa: Ciklus trikarboksilne kiseline, TCA) (**Sl. 2.24**). Ova inicijalna reakcija TCA ciklusa katalisana je enzimom *citratnom sintazom* (EC 2.3.3.1), koja se naziva još i *limunska sintaza*, *citrat-kondenzujući enzim* i *citrat-oksaloacetatna lijaza*. *Citratna sintaza* koristi slobodnu energiju tioestarske veze (SH) acetil-CoA za stvaranje C–C veze u molekulu limunske kiseline.

Koraci 2 i 3: Izomeracija citrata u izocitrat (preko intermedijera cis-akonitata).

Nastali citrat se na početku ove faze, oduzimanjem molekula H₂O uz katalitičko delovanje enzima *akonitaze* (EC 4.2.1.3), prevodi u cis-akonitat (cis-akonitatnu kiselinu), a zatim se u sledećem koraku delovanjem istog enzima i dodavanjem H₂O, cis-akonitat konvertuje u svoj izomer, izocitrat (izo-limunsku kiselinu). *Akonitaza* je gvožđe-sumporni enzim, [4Fe–4S]²⁺-klaster, naziva se još i *akonitatna hidrataza* (*akonitat-hidratiza*), koji katalizuje reverzibilne reakcije stereospecifične izomerizacije citrata, cis-akonitata i izocitrata u Krebsovom ciklusu.

Izomeracija citrata u izocitrat je proces koji se dešava u dva koraka, pri čemu nastaje međuprodukt cis-akonitat, tako da se često ciklus limunske kiseline opisuje kroz devet koraka (umesto u osam), gde se nastaje nje cis-akonitata, predstavlja kao poseban korak. Na **Sl. 2.24.** je stvaranje cis-akonitata predstavljeno kao posebna faza.

Korak 4: Oksidativna dekarboksilacija izocitrata i nastanak α -ketoglutarata (2-oksoglutarata).

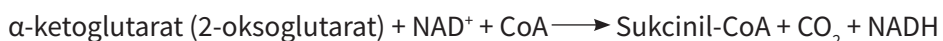
Nastali izocitrat se oksiduje preko NAD^+ i dekarboksiliše oslobađanjem molekula CO_2 , tako da od izocitrata koji ima 6 C-atoma nastaje molekul sa pet ugljenika, a to je α -ketoglutarat (2-oksoglutarat). Sumarna reakcija ovog procesa je:



Enzim koji katalizuje ovaj korak, *izocitratna dehidrogenaza* (EC 1.1.1.41), koji se naziva još i NAD^+ -zavisna *izocitratna dehidrogenaza* (postoji i NADP^+ -zavisna *isocitratna dehidrogenaza*), važan je u regulisanju brzine ciklusa limunske kiseline.

Korak 5: Oksidativna dekarboksilacija α -ketoglutarata (2-oksoglutarata) i nastanak sukcinil-CoA.

Ova faza Krebsovog ciklusa je slična prethodnoj i predstavlja oksidaciju nastalog α -ketoglutarata (2-oksoglutarata) preko NAD^+ i njegovu dekarboksilaciju – oslobađanje CO_2 , tako da nastaje jedinjenje sa 4 C-atoma koje preuzima CoA, formirajući nestabilni međuprodukt, sukcinil za CoA:



Nastanak sukcinil-CoA katališe *α -ketoglutaratna dehidrogenaza* (*oxoglutaratna dehidrogenaza*), najvažniji enzim koji formira enzimski kompleks sastavljen od tri komponente:

- α -ketoglutaratna dehidrogenaza (ili oxoglutaratna dehidrogenaza) (EC 1.2.4.2) sa kofaktorom tiamin-pirofosfatom (TPP);
- dihidrolipoil- sukcinil transferaza (EC 2.3.1.61), sa kofaktorima lipoičnom kiselinom i CoA;
- dihidrolipoil dehidrogenaza (EC 1.8.1.4) sa kofaktorima FAD i NAD.

Kompleks oksoglutaratne dehidrogenaze ima istu strukturu podjedinica i stoga koristi iste kofaktore kao kompleks piruvat dehidrogenaze (TPP, CoA, lipoat (lipoična kiselina), FAD i NAD).

Na ovom koraku Krebsovog ciklusa tri molekula CO_2 su nastala iz svakog molekula piruvata koji je ušao i mitohondrijski matriks (ili 6 CO_2 po molekulu glukoze, odnosno 12 CO_2 po molekulu saharoze).

Korak 6: Fosforilacija na nivou supstrata, stvaranje ATP i nastanak sukcinata (ćilibarne kiseline).

U ovoj fazi ciklusa slobodna energija koja je očuvana u tioestarskoj vezi sukcinil-CoA (a koja vodi poreklo od početnog jedinjenja, acetil-CoA) se oslobađanjem CoA prevodi u ATP procesom fosforilacije ADP na nivou supstrata ($\text{ADP} + \text{Pi} \longrightarrow \text{ATP}$). Enzim koji katališe ovaj proces u biljnim ćelijama je *sukcinil-CoA sintetaza* (ATP-zavisna), ili *sukcinat-tiokinaza* (ATP-zavisna), ili *sukcinat-CoA ligaza* (ATP-zavisna), koji katališe sintezu ATP-a (EC 6.2.1.5). Enzim sličnog delovanja u ciklusu limunske kiseline, ali prvenstveno nađen u animalnim i bakterijskim ćelijama, je *sukcinil-CoA sintetaza* (GDP-zavisna), ili *sukcinat-tiokinaza* (GDP-zavisna), ili *sukcinat-CoA ligaza* (GDP-zavisna), koji katališe sintezu GTP (EC 6.2.1.4).

Sumarna jednačina ovog reverzibilnog metaboličkog koraka TCA ciklusa je:



Jedinjenje koje nastaje u ovom koraku ciklusa je dikarboksilna ćilibarna kiselina, ili sukcinat, sa 4 C-atoma.

Korak 7: Oksidacija sukcinata preko FAD, nastanak fumarata (fumarne kiseline) i $FADH_2$.

Nastali sukcinat se u ovoj fazi ciklusa oksiduje u fumarat (fumarnu kiselinu), C-4 nezasićenu dikarboksilnu kiselinu u čijem molekulu su karboksilne grupe u trans položaju (izomerna forma je maleinska kiselina sa karboksilnim grupama u cis- konfiguraciji). Oksidacija sukcinata u fumarat se odvija uz katalitičko delovanje enzima *sukcinat-dehidrogenaze* (EC 1.3.99.1), čiji se aktivni redoks kofaktor FAD, redukuje u $FADH_2$ (Sl. 2.24).

Sukcinat-dehidrogenaza je enzim sa sistematskim imenom *sukcinat: akceptor oksidoreduktaza*, a naziva se još i *sukcinska dehidrogenaza*, *fumaratna reduktaza*, *fumarinska hidrogenaza*, i sl.), to je flavoprotein sa redoks aktivnim kofaktorom FAD i gvožđe-sumpornim centrima (Fe-S). Istovremeno je komponenta enzimskog kompleksa sukcinatne dehidrogenaze – ubihinona (EC 1.3.5.1). *Sukcinat dehidrogenaza* je jedini enzim Krebsovog ciklusa koji je vezan za unutrašnju membranu mitohondrija i predstavlja deo elektron transportnog sistema (ostali enzimi su rastvoreni u matriksu mitohondrija).

Elektroni i protoni se sa sukcinata prenose na flavin-adenin dinukleotid (FAD), enzimski kofaktor, kovalentno vezan za aktivnu stranu enzima *sukcinat-dehidrogenaze* koja katalizuje reverzibilni transport dva elektrona; višak elektrona usloviće vezivanje dva protona, tako da konačno nastaje $FADH_2$ koji nosi dalje elektrone u membranski elektronski transportni sistem (Sl. 2.21).

Korak 8: Hidratacija fumarata i nastanak malata (jabučne kiseline).

Hidratacijom fumarata, molekul vode raskida C=C dvostruku vezu u molekulu fumarata, tako da se u njegovu strukturu ugrađuju OH i H i nastaje C-4 (zasićena) dikarboksilna jabučna kiselina, ili malat (Sl. 2.24). Enzim koji katališe ovu reverzibilnu reakciju hidratacije/dehidratacije fumarata u malat je *fumaraza* (ili *fumaratna hidrataza*) (EC 4.2.1.2), koji je zbog svoje esencijalne uloge, široko rasprostranjen u metabolizmu biljaka, životinja i mikroorganizama. Fumaraza se javlja u dva oblika, mitohondrijskom i citoplazmatskom; mitohondrijski izoenzim je uključen u metabolizam fumarata u Krebsovom ciklusu, dok je citosolni izoenzim uključen u metabolizam fumarata i amino-kiselina u citoplazmi.

Korak 9: Dehidratacija malata u oksaloacetat (oksalo-sirćetnu kiselinu), nastanak NADH.

Poslednji korak je reakcija dehidrogenacije/oksidacije malata uz dejstvo *malatne dehidrogenaze* (EC 1.1.1.37), enzima koji reverzibilno katalizuje odavanje H_2O iz malata i regeneraciju oksaloacetata, početnog jedinjenja Krebsovog ciklusa. Pod dejstvom ovog enzima, H^+ joni koji su poreklom od malata, premeštaju se na NAD^+ , tako da nastaje NADH. Ovom reakcijom se završava jedan obrt ciklusa, a nastali oksaloacetat može ići ponovo u ciklus vezujući acetyl-CoA i formirajući limunsku kiselinu (Sl. 2.24).

2.10.1. Produkti Ciklusa limunske kiseline

Postepena oksidacija piruvata u mitohondrijama rezultira potpunom razgradnjom piruvata- njegovom dekarboksilacijom i oslobađanjem 3 molekula CO_2 , od čega 1 CO_2 nastaje pre samog Krebsovog ciklusa, pri formiranju acetyl-CoA, dok se u samom ciklusu oslobađaju 2 CO_2 poreklom iz 2-C jedinjenja – acetyl-CoA. Energija skladištena u vezama ugljenih hidrata koje se cepaju u procesu njihove sukcesivne oksidacije tokom Krebsovog ciklusa, konvertuje se i deponuje u molekule energetskih kofaktora: ATP, NADH i $FADH_2$. Kao što je već rečeno, u prvoj reakciji oksidativne dekarboksilacije piruvata u mitohondrijama, kada se formira acetyl-CoA, nastaje 1 molekul NADH, tako da u samom ciklusu limunske kiseline **po svakom molekulu piruvata nastaju:**

- 3 molekula NADH,
- 1 molekul $FADH_2$
- 1 molekul ATP.

Stoga se sumarna jednačina jednog obrta ciklusa limunske kiseline može predstaviti:



Kako svaki molekul glukoze u procesu glikolize daje dva molekula piruvata, produkte jednog obrta ciklusa limunske kiseline treba pomnožiti sa dva, kako bi se preračunala energetska dobit na molekul glukoze koji ulazi u proces ćelijskog disanja. Ukoliko se pak, računa stvaranje redukcionih energetskih ekvivalenata na molekul saharoze, onda se u mitohondrijama proizvodi 16 molekula NADH (4 NADH pri formiranju acetil-CoA + 12 molekula NADH u Krebsovom ciklusu), kao i 4 molekula FADH₂.

Intermedijeri Krebsovog ciklusa imaju nezamenljivu ulogu u brojnim metaboličkim putevima, od kojih su najznačajniji: sinteza amino-kiselina/proteina, lipidni metabolizam i glioksilatni ciklus, ekspresija gena (DNK metilacija, post-translacione modifikacije i dr.), te brojni fiziološki procesi katalisani specifičnim enzimima tokom ontogenetskog razvika biljaka i uticajem različitih faktora spoljašnje sredine.

2.10.2. Enzimi Ciklusa limunske kiseline

U eukariotskim ćelijama, enzimi koji katalizuju reakcije ciklusa limunske kiseline rastvoreni su u matriksu mitohondrija, izuzev sukcinat dehidrogenaze koja je sastavni deo unutrašnje mitohondrijske membrane.

I pored specifičnosti pojedinačnih enzima, brojna istraživanja ukazuju da je zajednička karakteristika svih, neophodnost jona Mg²⁺ kao važnog kofaktora za njihovu aktivaciju.

Glavni enzimi koji katalizuju specifične korake u ciklusu limunske kiseline su (**Sl. 2.24**):

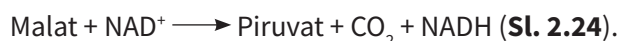
- *Citratna sintaza* (EC 2.3.3.1)
- *Akonitaza* (EC 4.2.1.3)
- *Izocitratna dehidrogenaza* (EC 1.1.1.41)
- *α-Ketoglutaratna dehidrogenaza* (2-Oksoglutaratna dehidrogenaza) (EC 1.2.4.2)
- *Sukcinil-CoA sintetaza* (EC 6.2. 1.5)
- *Sukcinatna dehidrogenaza* (EC 1.3.5.1)
- *Fumaraza* (EC 4.2.1.2)
- *Malatna dehidrogenaza* (EC 1.1.1.37)

2.10.3. Specifičnosti Ciklusa limunske kiseline biljnih ćelija

Iako se za Ciklus limunske kiseline može reći da je univerzalni put razgradnje organske materije i proizvodnje energije za održavanje metabolizma koji se dešava u mitohondrijama eukariotskih organizama, ipak je za biljnu ćeliju karakteristično nekoliko specifičnih svojstava:

U koraku 6 se kod biljaka dešava fosforilacija na nivou supstrata, kao i kod ostalih organizama, ali je produkt enzima sukcinil CoA-sintetaze, ATP, dok je u animalnim/humanim ćelijama supstrat fosforilacije GDP, tako da nastaje GTP.

U mitohondrijskom matriksu biljnih ćelija prisutan je *malatni enzim* (EC 1.1.1.39) koji katalizuje oksidativnu dekarboksilaciju malata, prema reakciji:



Ovaj enzim, koji spada u grupu malatnih dehidrogenaza (i dekarboksilaza), svojom aktivnošću omogućava

da se u mitohondrijama biljnih ćelija dešava alternativni metabolički put transformacije fosfoenol piruvata (PEP) koji nastaje u glikolizi. Kao što je ranije opisano (videti poglavlje Fotosinteza, C_4 /CAM metabolizam), malat se može sintetisati u citoplazmi katalitičkim delovanjem enzima PEP-karboksilaze i malatne dehidrogenaze. Razgradnja malata do piruvata se potom može dešavati u mitohondrijskom matriksu, aktivnošću malatnog enzima (**Sl. 2.24**).

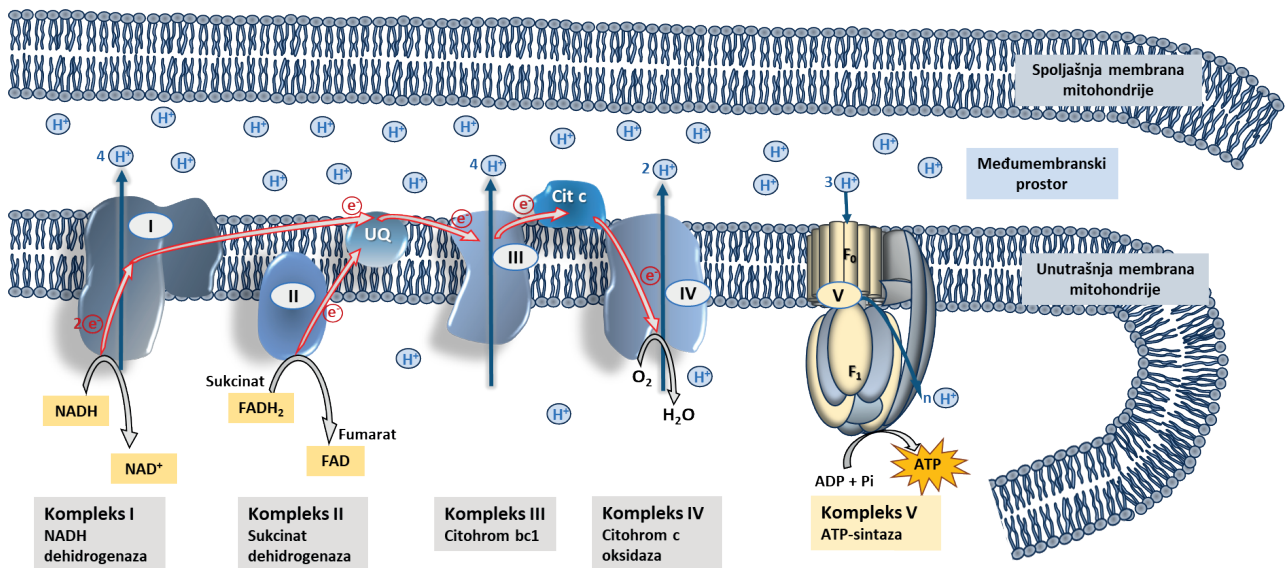
Za mnoge biljke koje akumuliraju malat u svojim vakuolama (naročito, ali ne isključivo C_4 i CAM) ovaj metabolički put njegove razgradnje u mitohondrijama, malatnim enzimom, je esencijalan za regulaciju nivoa organskih kiselina u biljnim ćelijama, što je posebno značajno tokom zrenja plodova. Ovome ide u prilog i činjenica da malat koji je nastao aktivnošću enzima PEP-karboksilaze, ne mora obavezno da se dekarboksiliše do piruvata, već može alternativno ući u Ciklus limunske kiseline na odgovarajućem koraku i „dopuniti“ količinu supstrata za završni korak i produkciju oksaloacetata.

2.11. Elektronski transportni lanac (ETC, engl. „electron-transport chain“)

U Krebsovom ciklusu stvoren je jedan molekul ATP-a po molekulu piruvata (u svakom obrtu ciklusa), dok je istovremeno veliki deo energije konvertovan u hemijske veze molekula NADH i $FADH_2$. Energija deponovana u ovim molekulima se prevodi u ATP kroz seriju spregnutih oksido-redukcionih reakcija: transporta elektrona kroz unutrašnju membranu mitohondrija i istovremeno, transporta protona iz mitohondrijskog matriksa (strome) u intermembranski prostor mitohondrija. U transportu elektrona i protona učestvuju prenosici koji funkcionišu kao donor/akceptor parovi. Rezultirajući elektrohemijski protonski gradijent na unutrašnjoj membrani (između unutrašnje strane – prema stromi mitohondrije i spoljašnje strane – prema međumembranskom prostoru) je električni napon koji omogućava rad enzima *mitohondrijske ATP-sintaze* i generisanje ATP. Ovo je aerobni proces (O_2 -zavisni), jer poslednji prenosilac, predaje elektrone na O_2 , a istovremeno se energija deponovana u hemijskim vezama NADH i $FADH_2$ prevodi u hemijsku energiju ATP-a, neophodnog energetskog kofaktora za održavanje metabolizma, te se stoga naziva **oksidativna fosforilacija** (**Sl. 2.6**). Prema tome, mitohondrijski lanac transporta elektrona koristi seriju reakcija prenosa elektrona da napravi ćelijski ATP kroz oksidativnu fosforilaciju. Osim elektrohemijskog gradijenta neophodnog za nastanak ATP-a, posledica prenosa elektrona kroz mitohondrijsku unutrašnju membranu je i stvaranje reaktivnih molekulskih vrsta kiseonika (ROS), značajnih za homeostatsku signalizaciju, posebno tokom oksidativnog stresa i patoloških promena ćelijskog metabolizma.

Elektronski transport i oksidativna fosforilacija su u fundamentalnim osobinama isti za sve žive ćelije, ali je kod biljaka (kao i nekih gljiva i protista), ova faza ćelijskog disanja delom i specifična, jer se u biljnim ćelijama/ mitohondrijama mogu naći specifične dehidrogenaze (NADH /NADPH), kao i neki alternativni oblici oksidaza, kojih nema u animalnim, odnosno, humanim ćelijama .

Elektronski transportni lanac čine prenosici elektrona organizovani u četiri proteinska kompleksa (Kompleks I, II, III i IV) smeštena u unutrašnjoj membrani mitohondrija; kompleksi I, III i IV su istovremeno uključeni i u transport protona. Gradijent protona (H^+) generisan prenosom elektrona kroz unutrašnju membranu, obezbeđuje energiju (električni napon, mV) potrebnu za sintezu ATP-a na Kompleksu V, koji predstavlja mitohondrijsku ATP sintazu (**Sl. 2.25**).



Sl. 2.25. Mitohondrijski elektronski transportni lanac: elektroni sa NADH i FADH_2 (iz Krebsovog ciklusa) se prenose preko niza prenosioća grupisanih u proteinske komplekse (Kompleks I, II, III i IV) tako da čine parove akceptor/ donor (elektrona) u skladu sa njihovim elektrohemijским potencijalom. Konačni akceptor elektrona je O_2 koji se primajući elektrone i prateće protone, redukuje u H_2O na kompleksu IV. Spegnuto sa elektronima, i protoni (H^+) sa redukcionih energetskih kofaktora NADH i FADH_2 se transportuju i pumpaju u intermembranski prostor mitohondrija; 4 H^+ se iz matriksa mitohondrija pumpaju u intermembranski prostor po svakom paru elektrona koji prolazi kroz Kompleks I. Rezultirajući elektrohemijский gradijent na unutrašnjoj membrani mitohondrija je električna sila (napon) za pokretanje aktivnosti ATP-sintaze koja čini Kompleks V celog elektron-transportnog lanca.

Komponente mitohondrijskog elektron-transportnog lanca – Kompleks I (NADH dehidrogenaza), Kompleks III (citokrom bc1 kompleks), Kompleks IV (citokrom c oksidaza) i Kompleks V (ATP sintaza) nalaze se u unutrašnjoj membrani mitohondrija, odnosno, predstavljaju njen deo, dok je Kompleks II svojim većim delom van membrane i okrenut je prema mitohondrijskom matriksu, te predstavlja i komponentu Ciklusa limunske kiseline (**Sl. 2.25**). Redukovani kofaktor NADH je donor elektrona Kompleksu I, odnosno NADH-dehidrogenazi, dok je FADH_2 donor elektrona Kompleksu II (sukcinat dehidrogenazi).

Elektroni sa Kompleksa I preko pokretnog prenosioća ubihinona (ubikinon, UQ), koji se još naziva i koenzim Q_{10} (CoQ_{10}) idu na kompleks III, a elektroni sa Kompleksa II, takođe preko UQ idu na Kompleks III (citohrom bc1), odakle sukcesivno prelaze na akceptor, Kompleks IV, citohrom c oksidazu. Kompleks IV prihvata elektrone i redukuje molekularni kiseonik (O_2) u vodu (H_2O). Uporedo sa transportom elektrona, protoni (H^+) se pumpaju kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu u intermembranski prostor (u Kompleksima I, III i IV; kompleksu II nedostaje mehanizam za pumpanje protona). Nagomilavanje protona između dve membrane, dovodi do uspostavljanja elektrohemijского protonskog gradijenta na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, što je pokretačka snaga (električni napon) za pokretanje povratnog transporta protona u matriks mitohondrije kroz Kompleks V (ATP sintazu). Energija H^+ gradijenta je na taj način, preko ATP-sintaze iskorištena za regeneraciju ATP-a iz ADP-a i P_i , tj. za oksidativnu fosforilaciju. U fiziološkim uslovima, približno do 5% O_2 u ćelijama se pretvara u reaktivne vrste kiseonika (ROS), pri čemu su Kompleksi I i III glavna mesta za generisanje ROS (reaktivnih kiseoničnih vrsta molekula).

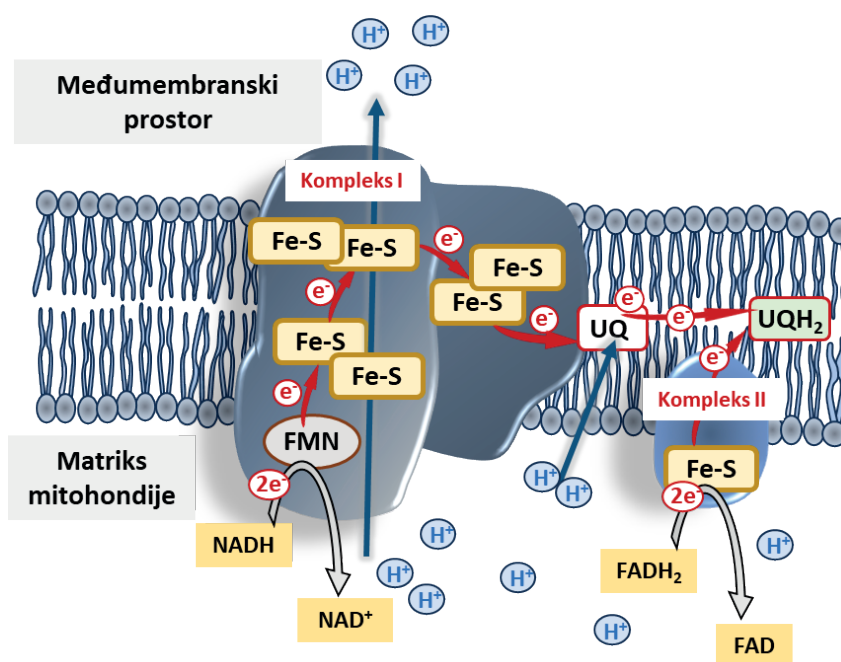
2.11.1. Komponente elektronskog transportnog lanca

Kompleks I (NADH dehidrogenaza, ili NADH-UQ oksidoreduktaza) je enzimski kompleks koji u svom sastavu ima čvrsto vezan kofaktor flavin-mononukleotid FMN (**Sl. 2.26**) i nekoliko Fe-S centara, najčešće od 6 do 8 (**Sl. 2.26**).

Naziv NADH dehidrogenaza odnosi se na grupu enzima (enzimsku familiju) čije je specifično sistematsko (taksonomsko) mesto određeno u odnosu na primarnog akceptora elektrona, zbog toga se enzim iz ove familije sistematski obeležava kao NADH:akceptor oksidoreduktaza. Hemijska reakcija koju ovi enzimi katalizuju generalno je predstavljena sledećom jednačinom:



Kako je u mitohondrijskom transportu elektrona ubihinon primarni akceptor elektrona od NADH, enzim se obeležava kao *NADH dehidrogenaza* (ubihinon, ili ubikinon), ili *NADH-UQ oksidoreduktaza*, sa specifičnom oznakom: EC 7.1.1.2.



Sl. 2.26. Struktura Kompleksa I (NADH dehidrogenaze, ili NADH-UQ oksidoreduktaze). Elektroni iz molekula NADH, generisanih u Krebsovom ciklusu, se u prvom koraku elektronskog transporta, prenose iz matriksa mitohondrije na enzimski kompleks I, koji inicijalno učestvuje u njihovom transportu ($2e^-$ po svakom molekulu NADH).

NADH dehidrogenaza je veliki proteinski transmembranski kompleks (Kompleks I) ima molekulsku masu oko 1000 kDa i uključuje 40–50 subjedinica kod biljaka, životinja i gljiva. Neke od proteinskih subjedinica ekspresovane su na mitohondrijskom genomu. Sastoji se od membranskog kraka i perifernog kraka, tako da izgledom podseća na slovo L i prvi je kompleks u transportnom lancu pošto prihvata elektrone visoke energije iz NADH poreklom iz Krebsovog ciklusa. NADH molekul donira dva elektrona akceptorskoj grupi kompleksa, a to je flavin-mononukleotid (FMN) koji se nalazi na vertikalnom delu kompleksa (**Sl. 2.26**).

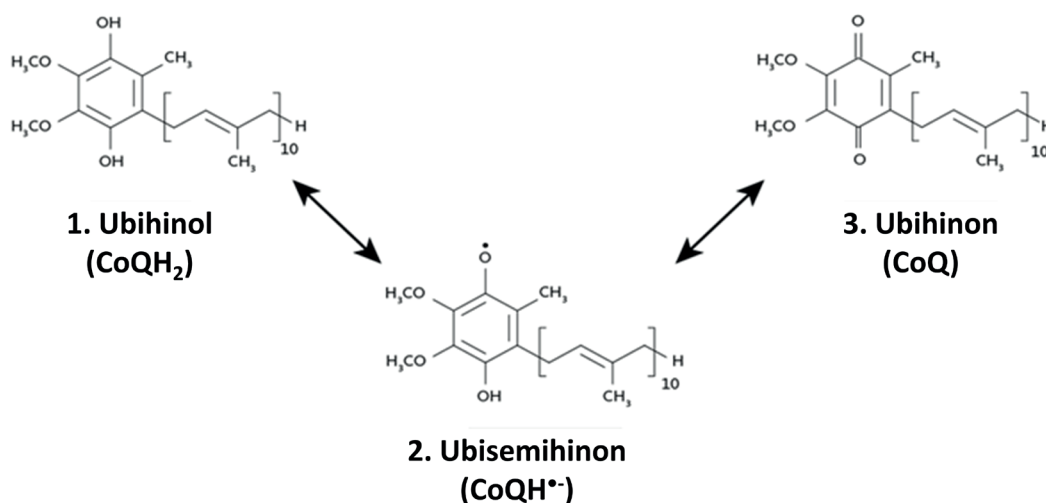
Od ove tačke elektroni se kreću duž niza (najčešće oko osam) gvožđe-sumpornih (Fe-S) – redukcionih centara i prenose se na pokretni elektronski prenosilac, Ubihinon (Ubikinol, Koenzim Q, UQ). Ubihinon istovreme-

no sa prenošenjem elektrona, uzima dva protona (H^+) iz matriksa mitohondrije da bi se formirao potpuno redukovani Ubihinol (Ubikinol, UQH_2). Tok elektrona kroz niz Fe-S klastera generiše električnu energiju koja se koristi za pumpanje protona ($4H^+$ po svakom molekulu NADH) iz mitohondrijskog matriksa u intermembranski prostor, te se na taj način NADH oksiduje/ dehidrogenizuje (otuda naziv kompleksa: NADH dehidrogenaza). Nakupljanje H^+ u međumembranskom prostoru dovodi do stvaranja gradijenta u njihovoj koncentraciji (ΔpH) na unutrašnjoj membrani mitohondrija između spoljašnje strane (okrenutoj prema međumembranskom prostoru) i unutrašnje strane unutrašnje membrane (okrenutoj prema matriksu mitohondrije). Koncentracijski gradijent H^+ sa jedne i druge strane unutrašnje membrane rezultira u elektrohemijском gradijentu, odnosno, potencijalnoj razlici – električnom naponu, koji obezbeđuje rad ATP sintaze za proizvodnju visokoenergetskog molekula ATP-a u procesu oksidativne fosforilacije.

Elektroni poreklom od NADH se sa Kompleksa I prenose na Ubihinon (Ubikinon, UQ) (Sl. 2.26).

Ubihinon (Ubikinon, UQ; $C_{55}H_{90}O_4$) je mali liposolubilni elektronski i protonski prenosilac, lokalizovan u lipidnom dvosloju unutrašnje membrane (Sl. 2.26). Nije čvrsto vezan za proteine i zbog toga može da difunduje kroz hidrofobni (lipofilni) deo membranskog dvosloja. Ubihinon je redoks kofaktor koji pored esencijalne funkcije u mitohondrijskom transportu elektrona predstavlja važnu komponentu antioksidativnog sistema ćelije. Plastohinon (PQ) i ubihinon (UQ) su dva važna **prenilhinona** koji funkcionišu kao transporteri elektrona u fotosintezi (PQ, videti poglavlje Fotosinteza) i procesu aerobnog ćelijskog disanja (UQ), te stoga imaju važnu ulogu u rastu i razviću biljaka. Imaju esencijalnu ulogu u biosintezi i metabolizmu važnih hemijskih jedinjenja koji deluju kao antioksidansi i uključeni su u odgovor biljaka na stres, tako što regulišu ekspresiju gena i transdukciju ćelijskih signala.

Ubihinon (Ubikinon, UQ) je poznat po svom nazivu koenzim Q (CoQ), ili koenzim Q_{10} , (CoQ_{10}), prisutan je u svim eukariotskim ćelijama i po hemijskom sastavu je *benzohinon*, sastoji se od prenilnih/ izoprenilnih i benzohinonskih delova gde se Q odnosi na hinonsku hemijsku grupu, a 10 označava broj izoprenilnih (izoprenskih) podjedinica u njegovom repu (Sl. 2.27).



Sl. 2.27. Ubihinon ($UQ / CoQ / CoQ_{10}$) može da ima tri oksidaciona (redoks) stanja:

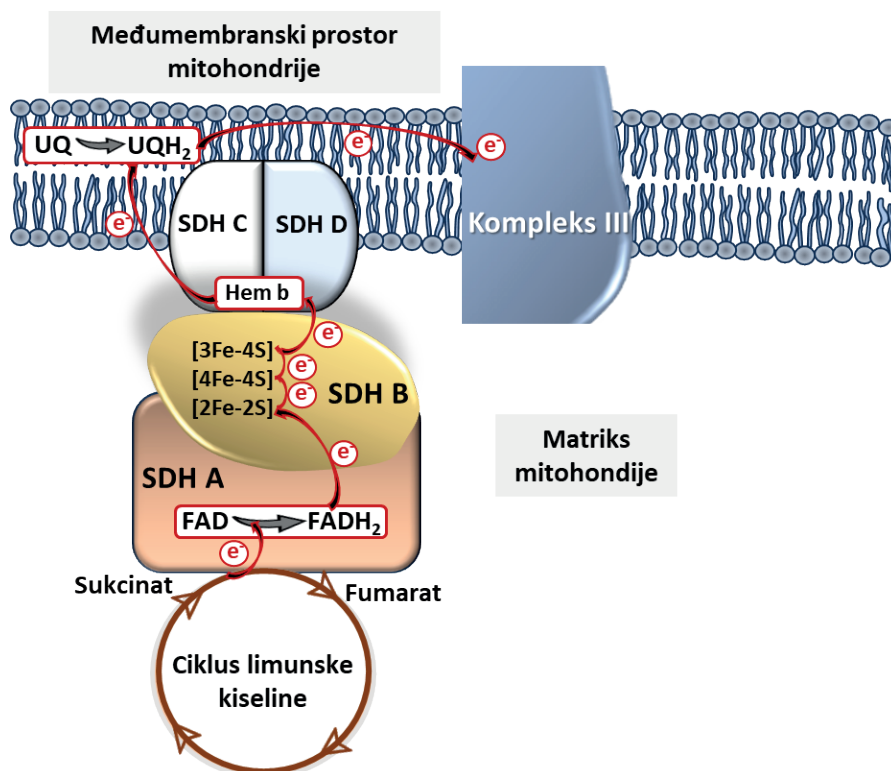
1. potpuno redukovano stanje – sa vezana 2 elektrona koji tada privlače dva protona, to je aktivna forma molekula (ubihinol i obeležava se: $CoQH_2$, ili $CoQ_{10}H_2$);
2. semioksidovano stanje – sa vezanim jednim elektronom (ubisemihinon i obeležava se: $CoQH^+$);
3. potpuno oksidovano stanje (ubihinon i obeležava se UQ, ili CoQ , ili CoQ_{10}).

Kod biljaka, prekursori ubihinona su mevalonska kiselina (za prenilni/izoprenski lanac), kao i amino-kiseline fenilalanin i tirozin (za benzenoidni prsten). Hinonska „glava“ molekula može da ima tri oksidaciona stanja: 1. potpuno redukovano stanje – sa vezana 2 elektrona i dva protona – aktivna forma molekula (CoQH_2 , ili ubihinol); 2. poluoksidovano stanje – sa vezanim jednim elektronom (ubisemihinon, ili $\text{CoQH}^\bullet$) i 3. potpuno oksidovano stanje (ubihinon, UQ, ili CoQ) (**Sl. 2.27**). UQ je medijator u reverzibilnom redoks ciklusu koji uključuje sukcesivni prenos elektrona i nastanak ubihinola, aktivne forme molekula sa 2 elektrona viška zbog čega može da veže 2 protona. Zbog mogućnosti da postoji i u oksidovanoj i potpuno redukovanoj formi, UQ ima nezamenljivu ulogu u transportu elektrona, ali isto tako i antioksidativnu ulogu „hvatača“ i neutralisanja viška elektrona u brojnim metaboličkim procesima.

Elektroni poreklom od NADH se sa Kompleksa I preko UQ/UQH_2 prenose na Kompleks II (**Sl. 2.28**).

Kompleks II (Sukcinat dehidrogenaza, ili sukcinat-ubihinon oksidoreduktaza) je enzimski kompleks, taksonomske specifikacije EC 1.3.5.1, zajednički za ciklus limunske kiseline (TCA) i za lanac transporta elektrona u mitohondrijama, tako da se može reći da povezuje oksidativnu fosforilaciju sa TCA ciklusom. Sukcinat dehidrogenaza (SDH) se kod eukariota sastoji od četiri podjedinice SDH A-D (Sdh 1–4 kod kvasaca). Katalitički domen ovog enzimskog kompleksa čine subjedinice SDH A i SDH B, periferni proteini smešteni u celosti u matriksu mitohondrije, dok su subjedinice SDH C i SDH D manji intermembranski proteini koji ih vezuju u funkcionalnu celinu i preko vezanog *hema b* između njih, obezbeđuju transfer elektrona iz sukcinata u mitohondrijskom matriksu do ubihinona smeštenog u unutrašnjoj membrani (**Sl. 2.28**).

SDH A je flavoprotein koji sadrži kovalentno vezan FAD; SDH B je gvožđe-sumpor protein sa tri različita centra: $[2\text{Fe-2S}]$, $[3\text{Fe-4S}]$ i $[4\text{Fe-4S}]$; SDH C i SDH D su mali integralni membranski proteini, koji povezuju SDH A i SDH B podjedinice za unutrašnju površinu unutrašnje mitohondrijske membrane (**Sl. 2.28**).



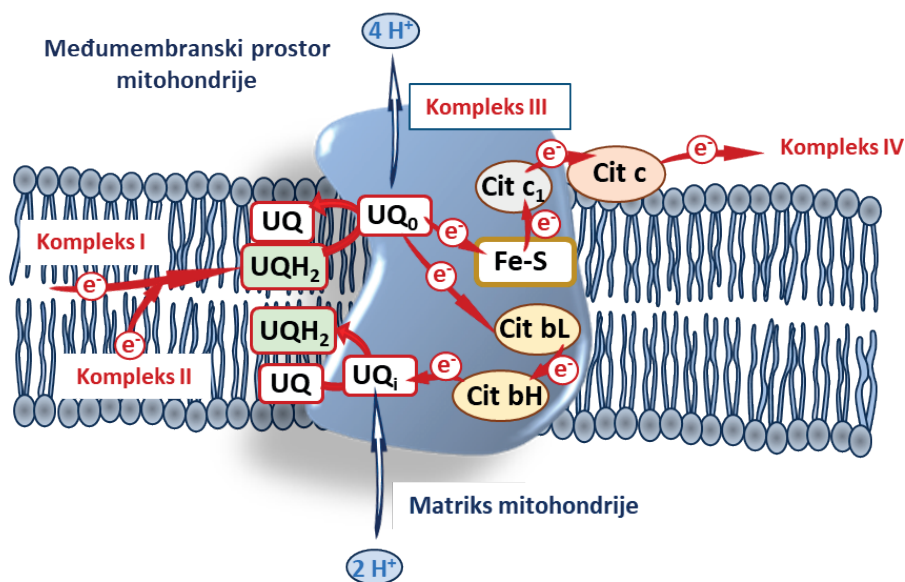
Sl. 2.28. Struktura Kompleksa II (sukcinat dehidrogenaze). Sukcinat se oksiduje u fumarat u TCA ciklusu pomoću SDH A i SDH B, a izdvojeni elektroni se transportuju u ubihinon (UQ), i potom u Kompleks III. Uporedo sa transferom elektrona, redukuje se FAD u FADH_2 iz SDH A podjedinice, a elektroni se potom kreću kroz Fe-S klastere u SDH B podjedinici, i preko hema b u SDH C i SDH D redukuju UQ.

Ove četiri podjedinice enzima *sukcinat dehidrogenaze* formiraju enzimski kompleks, čiji rastvorljivi domen povezuje Krebsov ciklus sa elektronskim transportom tako što *katališe oksidaciju sukcinata u fumarat redukujući FAD u FADH₂*. Aktivnošću ovog enzima, elektroni se prenose sa FAD iz SDH A preko krajnjeg Fe-S klastera [3Fe-4S] subjedinice SDH B, zatim, preko hema intermembranskih subjedinica SDH C i SDH D do UQ a odatle na Kompleks III elektronskog transportnog lanca (**Sl. 2.28**).

Kompleks II ne pumpa protone u intermembranski prostor.

Elektroni poreklom od NADH se sa Kompleksa I preko UQ/UQH₂ i Kompleksa II prenose na Kompleks III.

Kompleks III (Citohrom bc₁ kompleks, ili Ubihinol citohrom c oksidoreduktaza, ili CoQH₂-citohrom c oksidoreduktaza; Cit bc₁), je multifunkcionalni, oligomerni membranski proteinski kompleks – enzim, lokalizovan u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani eukariota (ili citoplazmatskoj membrani prokariota) i koji po internacionalnoj enzimskoj klasifikaciji ima oznaku (EC 1.10.2.2). Sastavni je deo ćelijskog respiratornog lanca koji doprinosi stvaranju elektrohemijskog gradijenta tako što, u jednom ciklusu, na UQ₀ centru kompleksa (koji predstavlja centar niskog potencijala) prihvata elektrone sa ubihinola (redukovano ubihinona, UQH₂). UQH₂ se oksidiše na UQ₀ centru kompleksa III tako što jedan njegov elektron prelazi na Fe-S protein, pri čemu nastaje ubisemihinon, ili CoQH[•], a zatim preko citohroma c₁, elektron prelazi na citohrom c, koji je okrenut prema međumembranskom prostoru mitohondrije. Drugi elektron sa UQH₂ prelazi kroz lanac nižeg potencijala koji sadrži dva citohroma b (bL - sa hemom niskog potencijala, engl. “low” i bH - sa hemom visokog potencijala, engl. “high”), na Q_i centar kompleksa koji je visokog potencijala i gde će se UQ redukovati u UQH₂ (**Sl. 2.29**). Protonski gradijent na membrani se formira oksidacijom – deprotonizacijom UQH₂ i ubacivanjem H⁺ u međumembranski prostor (**Sl. 2.29**).



Sl. 2.29. Šematski model Kompleksa III (citohrom bc₁ kompleksa). Homodimerni bc₁ kompleks ima tri katalitičke podjedinice: citohrom b sa dva hema b tipa (bH i bL), Rieske gvožđe-sumporni protein (FeS) i citohrom c₁ (Cit c₁) sa jednim haemom c-tipa. Hinonski ciklus: četiri protona po svakom elektronskom paru se pumpaju iz matriksa mitohondrije u međumembranski prostor.

Preko ovog kompleksa se kao i kod Kompleksa I, uporedo sa transportom elektrona, translociraju protoni iz matriksa mitohondrije u međumembranski prostor organele.

Četiri protona po svakom elektronskom paru se pumpaju iz matriksa mitohondrije u međumembranski prostor preko Kompleksa III u tzv. Q (hinonskom/ ubihinonskom) ciklusu (**Sl. 2.29**).

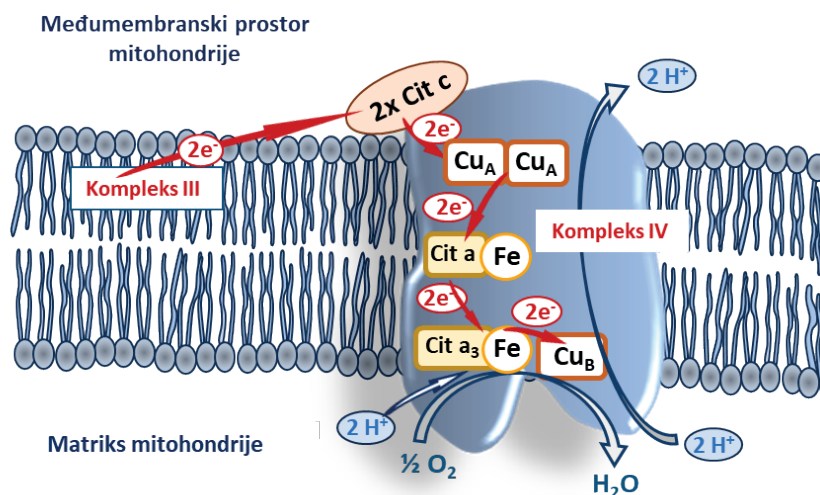
Kompleks III je homodimerni protein sa tri katalitičke subjedinice: citohrom b (Cit b) koji može biti u dve forme zbog dva b-tipa hema (Cit b_{565} i cit b_{560}), zatim, Rieske Fe-S protein (Fe-S) i treća subjedinica je citohrom c_1 (Cit c_1) sa c-tipom hema. Strukturno i funkcionalno, [ubihinon (UQ) – citohrom bc1] kompleks je veoma sličan [plastohinon (PQ) – b_6f] kompleksu u fotosintetičkom elektronskom transportu (videti poglavlje Fotosinteza). Biljke mogu da sadrže, zavisno od taksonomske pripadnosti, i subjedinice u ETC-kompleksima čija funkcija nije do kraja razjašnjena, a postoje indikacije da učestvuju u procesu ćelijskog disanja.

Citohrom c (Cit c) je mali periferni protein sa hem-prostetičnom grupom, labavo vezan za spoljašnju površinu unutrašnje membrane mitohondrija, tako da je svojim najvećim delom okrenut prema međumembranskom prostoru mitohondrije. Cit c prenosi elektrone sa Cit c_1 – terminalne komponente Kompleksa III, na redoks centre Kompleksa IV (citohrom c oksidazu) (**Sl. 2.29**).

Elektroni poreklom od NADH se sa Kompleksa I preko UQ/UQH₂, Kompleksa II, Kompleksa III i Citohroma c prenose na Kompleks IV.

Kompleks IV (Citohrom c oksidaza) je terminalna oksidaza – krajnji primalac elektrona u respiratornom transportnom lancu. To je enzim (po ranijoj klasifikaciji: EC 1.9.3.1; po novijoj klasifikaciji: EC 7.1.1.9 – translokaza) koji katališe transfer elektrona sa redukovano Cit c na finalni akceptor, kiseonik (O₂), uz istovremenu translokaciju protona iz matriksa u intermembranski prostor. Za nastanak jednog molekula H₂O potrebna su dva elektrona koje donose dva redukovana citohroma c sa kompleksa III na kompleks IV, što znači da su za redukciju molekula O₂ potrebna četiri elektrona, odnosno, četiri protona, da bi nastala dva molekula H₂O:

$4H^+ + O_2 \longrightarrow 2 H_2O$; na **Sl. 2.30** predstavljena je reakcija za jedan par elektrona.



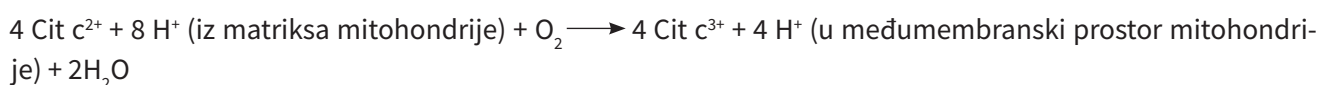
Sl. 2.30. Kompleks IV (citohrom c oksidaza) sa četiri aktivna redoks centra: dva citohromna (hem / Fe – centra), to su Cit a i Cit a₃, kao i dva bakar (Cu) – centra, to su Cu_A i Cu_B. Dva protona iz matriksa pumpaju se u međumembranski prostor po svakom paru elektrona koji redukuje ½ O₂ uz nastanak jednog molekula H₂O.

Kompleks IV sadrži četiri aktivna redoks centra: dva citohromna (hem/Fe – centra), to su Cit a i Cit a₃ (Fe_a i Fe_{a3}) kao i dva bakar (Cu) – centra, to su Cu_A i Cu_B (**Sl. 2.30**). Prostetične grupe citohromima c i c₁ sadrže hem koji je kovalentno povezan sa apoproteinom tioetarskim vezama između dva cisteinska ostatka i vinil grupa hema. Hem citohroma b i a₃ je vezan jakim hidrofobnim vezama sa apoproteinom.

Citohrom c, koji je redukovano preko Kompleksa III (ima hem-prostetičnu grupu sa Fe²⁺), dolazi u blizinu binuklearnog redoks-centra Cu_A i šalje elektron do njega, oksidujući povratno Cit c (Fe³⁺). Redukovani binuklearni centar Cu_A-Cu_A dalje prenosi elektron na Cit a, odakle, na binuklearni centar Cit a₃-Cu_B. Dva metalna

jona (Fe i Cu) u ovom binuklearnom centru grade čvrstu vezu (udaljena su 4,5 Å) i koordinišu redukciju O₂ u H₂O (**Sl. 2.30**).

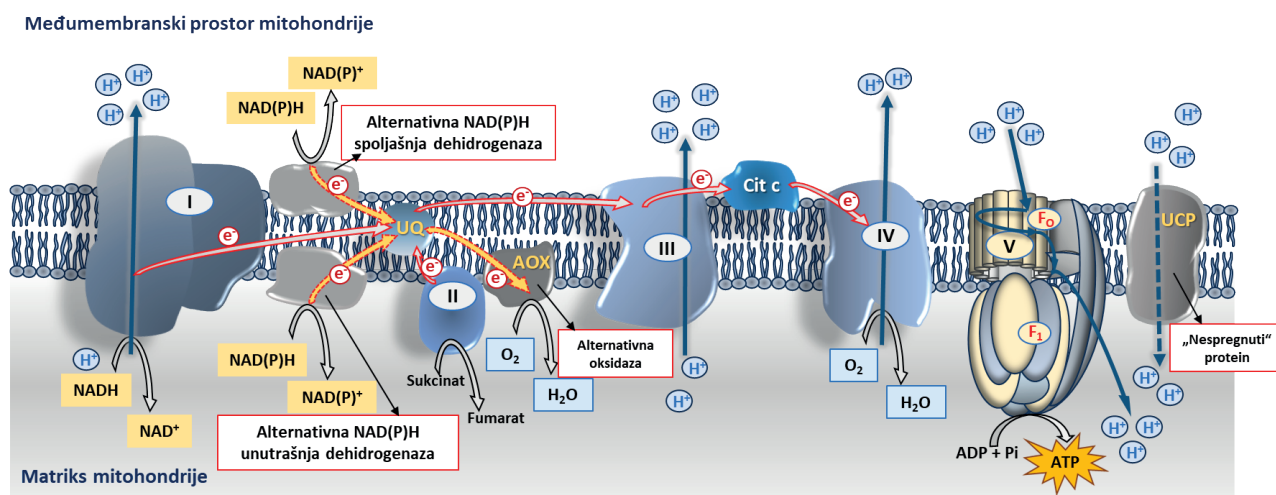
Elektroni se prenose jedan po jedan od Cit c kroz Cu_A–Cu_A centar (hem grupa sa bakrom) do Cit a, tj. do prve hem grupe koja sadrži gvožđe. Odatle se prenose u drugu Fe-hem grupu citohroma a₃ i potom na treći atom bakra (Cu_B). Dva Cit c donose dva elektrona u prvom koraku, svaki posebno, za Fe i Cu redoks centre. Kada se prime prva dva elektrona, molekul kiseonika se vezuje za Fe_{a3}–Cu_B centar, dvostruka veza između njih se prekida da bi se formirao energetski peroksidni most (Fe³⁺–O[–]–O[–]–Cu²⁺), gde peroksidna grupa premošćuje 2 metalna jona na mestu redukcije O₂. Vezivanje elektrona i posledično, privlačenje i vezivanje dva protona (H⁺), dovešće do nastanka hidroksida (Fe–OH i Cu–OH). Nakon ovog stadijuma, još dva elektrona koje donosi Cit c, omogućiće redukciju Cu i Fe u početno (originalno stanje), a ekstrakcija dva dodatna protona iz matriksa dovodi do stvaranja dva molekula vode (**Sl. 2.30**). Stoga se sumarna jednačina konačne redukcije O₂ katalitičkim delovanjem Kompleksa IV (citohrom c oksidaze), može predstaviti:



2.12. Alternativni biohemijski putevi u elektronskom transportnom lancu

Mnogi eukariotski organizmi imaju više, ili manje strukturno i fiziološki specifične elektronske transportne puteve. Na primer, biljke mogu da imaju alternativne NADH (ili NADPH) dehidrogenaze, koje oksiduju NADH (NADPH) iz citoplazme, a ne iz mitohondrijskog matriksa, i prosleđuju zatim ove elektrone na ubihinon (UQ) (**Sl. 2.31**). Ovi enzimi (alternativne dehidrogenaze) ne transportuju protone i, prema tome, ne doprinose nastanku elektrohemijskog gradijenta na unutrašnjoj membrani mitohondrije. Još jedan primer specifičnosti transporta elektrona je postojanje alternativne oksidaze (AOX), enzima koji prenosi elektrone direktno sa ubihinola na kiseonik i koji se nalazi pre svega, u biljkama, zatim u nekim gljivama i protistima (postoje naučni dokazi da se može naći i kod nekih životinja).

Zajedničko za alternativne puteve respiratornog transporta elektrona je da se na uspostavljenom elektrohemijskom gradijentu kroz unutrašnju membranu mitohondrija, obrazuje manje ATP-a u procesu oksidativne fosforilacije. Metaboličke prednosti postojanja alternativnog/skraćenog puta elektrona u transportnom lancu nisu u potpunosti jasne, ali je dokazano da se alternativna oksidaza (AOX) proizvodi (ekspresuje) i indukuje se njena aktivnost kao odgovor na stresne ekološke činioce, kao što su temperatura, reaktivne vrste kiseonika (ROS), infekcija patogenima i dr. Stoga se smatra da alternativni elektron-transportni putevi ćelijskog disanja povećavaju adaptabilnost biljaka i s tim u vezi, otpornost na metaboličke poremećaje, smanjenjem oksidativnog stresa.



Sl. 2.31. Biljne mitochondrije imaju respiratorni lanac koji je složeniji od onog kod životinja i sadrži alternativne NAD(P)H dehidrogenaze, alternativne oksidaze (AOXs) kao i „nespregnute“ proteine (UCPs), koje katalizuju potrošnju O₂ bez spregnute reakcije oksidativne fosforilacije; cijanid rezistentno disanje i rotenon rezistentno (insenzitivno) ćelijsko disanje.

Alternativni putevi elektrona kroz unutrašnju membranu mitohondrija su prvobitno identifikovani u biljnim mitohondrijama koje mogu održavati proces ćelijskog disanja (potrošnju O₂) i u prisustvu različitih inhibitora transporta elektrona/protona.

Selektivni inhibitori kao što su rotenon (prirodni preparat, insekticid i herbicid, C₂₃H₂₂O₆) za Kompleks I, antimicin (C₂₈H₄₀N₂O₉, herbicid, fungicid) za Kompleks III i cijanid (so cijanovodonične kiseline, opšte formule R-C≡N, najčešće KCN) za Kompleks IV, blokiraju normalni transport elektrona kroz unutrašnju membranu mitohondrija.

Alternativne NADH (NADPH) dehidrogenaze i alternativne oksidaze (AOX) ne translociraju protone iz matriksa u međumembranski prostor mitohondrija, stoga nisu povezane sa sintezom ATP-a i često se nazivaju nefosforilišućim obilaznicama (biljnog) respiratornog lanca. Na taj način je omogućeno da su ćelijsko disanje i oksidativna fosforilacija razdvojeni i da se potrošnja kiseonika u ćelijskom disanju dešava u odsustvu izvora ADP-a.

Alternativne NAD(P)H dehidrogenaze prisutne su na obe strane unutrašnje mitohondrijske membrane, te stoga oksiduju NADH, ili NADPH iz citoplazme, kao i iz matriksa mitohondrije (**Sl. 2.31**). Genom *Arabidopsis thaliana* sadrži sedam gena koji kodiraju NAD(P)H dehidrogenaze, čije različite izoforme mogu biti prisutne i u drugim ćelijskim kompartmentima, ne samo u mitohondrijama.

Cijanid-rezistentno (cijanid-insenzitivno) ćelijsko disanje je katalisano mitohondrijskom alternativnom oksidazom (AOX), terminalnom 2 Fe-hinol oksidazom, koja se odvaja od standardnog elektron-transportnog lanca na nivou UQ i redukuje O₂ u H₂O bez spregnute translokacije protona iz mitohondrijskog matriksa u međumembranski prostor (**Sl. 2.31**). AOX je dimer koji može biti inaktiviran stvaranjem kovalentnih disulfidnih (S–S) veza.

Specifičnost mitohondrijskog elektron-transportnog lanca je i postojanje tzv. „nespregnutih/ nevezanih“ proteina (engl. Uncoupling proteins, UCPs), koji dozvoljavaju pasivni protok H⁺ nazad (iz međumembranskog prostora) kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu i na taj način smanjuju transmembranski protonski gradijent (ΔμH⁺/ΔpH), odnosno, rasipaju energiju iz elektronskog transporta neophodnu za ATP-sintezu. Reaktivne kiseonične molekulske vrste (ROS) aktiviraju UCPs.

Prema opšte prihvaćenoj hemiosmotskoj teoriji koju je predložio Piter Mičel 1961. godine, prenos elektro-

na nastalih oksidacijom supstrata i sinteza ATP-a su spregnuti preko elektronskog transporta u unutrašnjoj membrani mitohondrija, ali to ne znači da je transfer elektrona 100% efikasan. Zbog rasipanja elektrona i protona u samom procesu, nije moguće da svi elektroni iz transporta budu preneseni na konačni akceptor – O_2 , odnosno, energija koju oslobađaju preneti elektroni ne može biti u potpunosti iskorištena za stvaranje ATP-a. Međutim, i ROS generisan rasipanjem (curenjem) elektrona i UCPs koji su uključeni u rasipanje protona igraju važnu ulogu u fiziologiji i patologiji biljnih ćelija, odnosno, u metaboličkoj konverziji ugljenika. Tako na primer, *prolin-dehidrogenaza* je enzim koji u alternativnom mitohondrijskom elektronskom transportu oksiduje amino-kiselinu prolin akumuliranu u uslovima osmotskog stresa. Takođe, enzim *hinon oksidoreduktaza*, učestvuje u alternativnom mitohondrijskom elektronskom transportu omogućavajući razgradnju nekoliko rezervnih amino-kiselina u uslovima smanjene fotosinteze. Još jedan primer alternativne dehidrogenaze je *galaktono-gama-lakton dehidrogenaza* od izuzetne važnosti za sintezu askorbinske kiseline (vitamina C) koja koristi citohrom c kao elektronski akceptor.

2.13. Oksidativna fosforilacija (sinteza ATP) – spregnuta reakcija fosforilacije i transporta elektrona

Mitohondrije omogućavaju da se sačuva energija nastala razgradnjom organskih molekula u živim eukariotskim ćelijama procesom koji se naziva oksidativna fosforilacija.

energije u živim eukariotskim ćelijama procesom koji se naziva oksidativna fosforilacija. Ovaj metabolički put se još naziva i spregnuta reakcija transporta elektrona i fosforilacije, ili terminalna oksidacija. Skoro svi aerobni organizmi vrše oksidativnu fosforilaciju koja predstavlja najzastupljeniji metabolički put, jer se u njemu proizvodi najviše energije (ATP) u poređenju sa alternativnim anaerobnim procesima, kao što je fermentacija (anaerobna glikoliza). U spregnutoj reakciji transporta elektrona i pumpanja protona u intermembranski prostor mitohondrija preko niza respiratornih enzimskih kompleksa (kompleks I–IV) unutrašnje mitohondrijske membrane, generisana energija (iz transmembranskog gradijenta) se koristi za sintezu ATP-a iz ADP-a i P_i . Proces je katalisan enzimom mitohondrijskom F_0F_1 -ATP sintazom, koja predstavlja kompleks V (**Sl. 2.32**). Količina energije (broj sintetisanih molekula ATP) u jednom ciklusu, zavisi od prirode elektronskog donora.

Odnos ADP:P predstavlja kvantitativnu meru efikasnosti ćelijskog disanja, jer se odnosi na broj molekula ATP-a koji se sintetiše za dva elektrona preneti na konačni akceptor, O_2 .

Danas postoje pouzdani eksperimentalni podaci dobijeni u istraživanjima na izolovanim mitohondrijama koji ukazuju da je odnos ADP:O varijabilan, ali da generalno, za biljne, kao i za animalne mitohondrije postoje tri mesta za generisanje/konzervaciju energije u elektronskom transportnom lancu, a to su: Kompleks I, Kompleks III i Kompleks IV (**Tabela 2.2.**):

Tabela 2.2. Teorijski i eksperimentalni odnos ADP:O.

Elektroni dolaze na akceptor:	ADP : O (broj ATP sintetisanih pri transportu 2 elektrona)	
	Teorijska vrednost*	Eksperimentalna vrednost
Kompleks I	2,5	2,4 – 2,7
Kompleks II	1,5	1,6 – 1,8
Eksterna NADH dehidrogenaza	1,5	1,6 – 1,8
Kompleks IV	1,0	0,8 – 0,9

*Teorijska vrednost ADP:O (broj ATP sintetisanih pri transport 2 elektrona) se izračunava na osnovu pretpostavke da se transportom elektrona od NADH do poslednjeg akceptora – O₂, ukupno 10 protona transportuje kroz unutrašnju membranu mitohondrije iz matriksa u međumembranski prostor: Kompleks I pumpa 4H⁺ (za svaka 2e⁻), Kompleks III pumpa 4H⁺ (za svaka 2e⁻), dok Kompleks IV pumpa 2H⁺ (za svaka 2e⁻). Stoga je za NADH, kao donora elektrona (Kompleks I) teorijska vrednost ADP : O = 10/4, odnosno, 2,5 ATP-a se proizvodi. FADH₂ donira 6 protona u intermembranski prostor uz istovremeni transport 2 elektrona, tako da je odnos ADP:O = 6/4, odnosno, 1,5 ATP-a se proizvodi.

Elektroni sa eksterne NADH prolaze samo kroz komplekse III i IV, što rezultira sa 6H⁺ ubačenih u intermembranski prostor, odnosno, sa 1,5 stvorenih ATP-a na ATP sintazi.

Kompleks IV (citohrom c oksidaza) pumpa 2H⁺ u međumembranski prostor, dok se istovremeno 2e⁻ premeštaju sa spoljašnje strane unutrašnje membrane (sa citohroma c) kroz unutrašnju membranu mitohondrije, što rezultira potrošnjom 2H⁺ na njenoj unutrašnjoj strani (prema matriksu mitohondrije). To znači da je neto protok H⁺, odnosno doprinos generisanju elektrohemijjskog gradijenta na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani ekvivalentan pumpanju 4H⁺, čime se dobija teorijski odnos ADP:O u iznosu 1.

Mehanizam mitohondrijske sinteze ATP-a bazira se na generalno prihvaćenoj hemiosmotskoj hipotezi, prvi put definisanoj početkom 60-ih godina XX veka (tačnije, 1961. godine) od strane nobelovca Petera Mičela, što je već navedeno u poglavlju Fotosinteza (potpoglavlje: Transport protona kroz tilakoidnu membranu i sinteza ATP u hloroplastima – Fotofosforilacija), a odnosilo se na mehanizam *hloroplastne sinteze ATP-a* na osnovu transmembranskog elektrohemijjskog (protonskog) gradijenta.

Prema hemiosmotskoj teoriji spregnuta reakcija vektorskog transporta elektrona kroz unutrašnju membranu mitohondrije i prenošenja protona (H⁺) sa jedne strane (iz matriksa) na drugu (u međumembranski prostor) dovodi do nagomilavanja H⁺ u prostoru između dve membrane zbog nepropustljivosti unutrašnje membrane za pasivno povratno kretanje H⁺. Stoga dolazi do generisanja **protonskog gradijenta** ($\Delta\mu_{H^+}$), **odnosno pH gradijenta** (ΔpH) između dve strane membrane: međumembranski prostor postaje pozitivno naelektrisan i kiseo u odnosu na matriks mitohondrije, tj. pH-intermembranskog prostora je manji od pH-matriksa mitohondrije, a zakišeljavanje intermembranskog prostora (i alkalizacija mitohondrijskog matriksa) omogućava generisanje **protonske pokretačke sile** (engl. „*proton motive force*“, Δp), koja kada se izražava u voltima (V) zavisi od:

- **Električnog transmembranskog potencijala (ΔE):**

$$\Delta E = E_{\text{unutrašnja-matriksna strana membrane}} - E_{\text{spoljašnja-intermembranska strana membrane}}$$

- **Hemijjskog transmembranskog potencijala (ΔpH):**

$$\Delta pH = pH_{\text{unutrašnja-matriksna strana membrane}} - pH_{\text{spoljašnja-intermembranska strana membrane}}$$

Stoga se protonska pokretačka sila (Δp) može predstaviti kao:

$\Delta p = \Delta E - 59 \Delta pH$ (na 25 ° C); 59 – konstanta proporcionalnosti: jediničnoj vrednosti razlike u pH između unutrašnje (matriksne) i spoljašnje (intermembranske) strane membrane ekvivalentan je električni transmembranski potencijal od 59 mV.

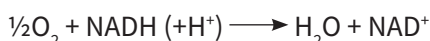
Kako Δp rezultira iz asimetrične raspodele naelektrisanih čestica – jona (H⁺) sa jedne i druge strane membrane, govori se o **transmembranskom elektro-hemijjskom (protonskom) gradijentu**, neophodnom za indukovanje aktivnosti *mitohondrijske H⁺ATP-sintaze*, enzima koji upravlja proizvodnjom energije (ATP), slično

kao što je to već objašnjeno za *hloroplastnu H⁺ATP-sintazu*. Ovde treba napomenuti da je u mitohondrijama (u ćelijskom disanju) udeo ΔpH u rezultirajućoj vrednosti Δp značajno manji u odnosu na ΔE , što je posledica velikog pufernog kapaciteta citoplazme i matriksa mitohondrije, čime se sprečavaju veće oscilacije u pH. Međutim, suprotno se dešava u poređenju sa generisanom protonskom pokretačkom silom (Δp) u hloroplastima (u fotosintezi), gde najveći udeo Δp za sintezu ATP-a pripada ΔpH na tilakoidnoj membrani (između lumenalne i stromalne strane tilakoida hloroplasta).

U normalnim uslovima i pri stabilnom metabolizmu, ΔpH iznosi oko 0,5, a ΔE je oko 0,2V. Pošto je unutrašnja mitohondrijska membrana veoma tanka (oko 7–8 nm), ova vrednost ΔE između dve strane membrane, odgovara postojanju električnog polja od nekoliko miliona volti što ukazuje na to da izuzetno visok transmembranski elektrohemijski gradijent potencijala (napon, u voltima (V)) obezbeđuje aktivnost mitohondrijske ATP-sintaze.

Oksidativna fosforilacija – energetika

Transport elektrona kroz unutrašnju membranu mitohondrije od redoks para $NAD^+/NADH$ do konačnog redoks para $\frac{1}{2}O_2/H_2O$ može se sumirati kao:



Razlika potencijala između ova dva redoks para je 1,14 volti (od -0,32V do +0,82V), (**Tabela 2.3**):

Tabela 2.3. Standardni redukcionni potencijali ($\mathcal{E}^0$) (V) prenosilaca elektrona u oksido-redukcionim reakcijama unutrašnje membrane mitohondrija.

Oksido-redukciona reakcija – Dve spregnute polureakcije	Standardni redukcionni potencijal $\mathcal{E}^0$ (V)
NAD^+ (oksidant) + $2H^+$ + $2e^- \longrightarrow NADH$ (reduktant) + H^+	-0,32
$FMN + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow FMNH_2$	-0,30
$FAD + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow FADH_2$	-0,18
$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$	0,00
Ubihinon (UQ) + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ Ubihinol (UQH_2)	+0,05
Citohrom b (oksidant) + $e^- \longrightarrow$ Citohrom b (reduktant)	+0,08
Citohrom c_1 (oksidant) + $e^- \longrightarrow$ Citohrom c_1 (reduktant)	+0,22
Citohrom c (oksidant) + $e^- \longrightarrow$ Citohrom c (reduktant)	+0,25
Citohrom a (oksidant) + $e^- \longrightarrow$ Citohrom a (reduktant)	+0,29
Citohrom a_3 (oksidant) + $e^- \longrightarrow$ Citohrom a_3 (reduktant)	+0,55
$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O$ ($NADH + \frac{1}{2}O_2 + H^+ \longrightarrow H_2O + NAD^+$)	+0,82

$\mathcal{E}^0$ (V) se odnosi na polureakciju: oksidant + $e^- \longrightarrow$ reduktant; Redoks par predstavlja dva oblika supstance u polureakciji, pri čemu se oksidovani oblik (akceptor elektrona) uvek nalazi na levoj strani, a redukovani oblik (donator elektrona) na desnoj strani.

Već je rečeno ranije da se za svaku (polu)reakciju može izvesti standardni redukcionni potencijal ($\mathcal{E}^0$) u voltima (ili milivoltima), što predstavlja meru tendencije donora da se u reakciji oslobodi elektrona. Ono što posebno treba naglasiti je da supstanca sa većom tendencijom odavanja elektrona u redukovanom obliku ima negativniji $\mathcal{E}^0$, dok supstanca sa slabom tendencijom da donira elektrone u redukovanom obliku ima manje negativan ili čak pozitivan $\mathcal{E}^0$.

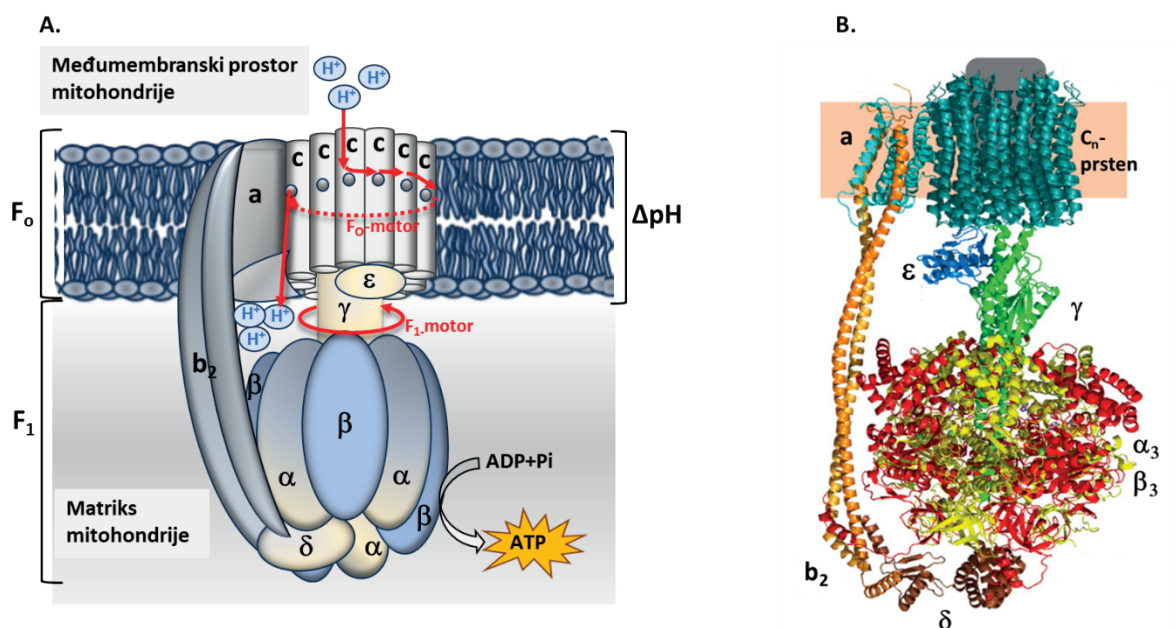
Supstanca sa negativnim $\mathcal{E}^0$ je u redukovanom obliku, veoma dobar donor elektrona.

Da bi reakcija bila energetski povoljna za ćeliju, prenosioči moraju biti raspoređeni po njihovom standardnom redukcionom potencijalu (od najnegativnijeg $\mathcal{E}^0$ ka najmanje negativnom, odnosno najpozitivnijem).

Važno je naglasiti, a ranije je detaljno objašnjeno, da u mitohondrijskom elektron-transportnom lancu neki prenosioci prihvataju/prenose i elektrone i protone, dok drugi prihvataju i transportuju samo elektrone, što je od izuzetne važnosti za energetiku samog procesa ćelijskog disanja.

Niz redoks reakcija koji pokreće protok elektrona kroz elektronski transportni lanac, od donora elektrona kao što je NADH do akceptora elektrona kao što su kiseonik i vodonik (protoni), je egzergoni proces – oslobađa energiju, dok je sinteza ATP-a endergoni proces, koji zahteva unos energije.

Enzim koji katališe proizvodnju ATP-a iz ADP-a i P_i , ili hidrolizu ATP-a, koristeći transmembranski elektro-hemijski gradijent nastao u spregnutoj reakciji transporta elektrona i pumpanja protona u međumembranski prostor mitohondrije je H^+ ATP-sintaza/-aza (F_0F_1 -ATP-sintaza/-aza), koja se još naziva i Kompleks V (Sl. 2.32; A, B).



Sl. 2.32. ATP-sintaza F-tipa (F_0F_1 -ATP-sintaza);

A. Glavne funkcije ATP-sintaze su kontrola transmembranskog potencijala i upravljanje sintezom ATP-a; F_0 -„motor“ uključuje aktivnost a , b_2 i c_n proteinskih subjedinica; F_1 -„motor“ uključuje aktivnost α , β , γ , δ i ϵ subjedinica. Za sintezu 1 molekula ATP, $3H^+$ je potrebno da prođe kroz F_0 subjedinicu ATP-sintaze i bude ubačeno u matriks mitohondrije duž elektrohemijskog protonskog gradijenta.

B. Adaptirano prema Vlasov i sar. (2022); Elektronski izvori slika, str. 159.

Iako je struktura F_0 i F_1 glavnih podjedinica enzima ATP sintaze F-tipa očuvana, tj. uniformna, sastav samih podjedinica i njihova strukturna organizacija mogu značajno varirati, te se stoga govori o enzimskoj porodici ATP-sintaza / ATP-aza, jedinstvenih rotacionih molekularnih mašina koje snabdevaju biohemijske reakcije adenozin trifosfatom (ATP) – univerzalnim oblikom energije koju ćelije koriste za sintezu vitalnih molekula i održavanje života.

ATP-sintaze F-tipa (F_0F_1) su veliki proteinski kompleksi (≈ 500 kDa) ugrađeni u ćelijsku membranu bakterija, u tilakoidne membrane hloroplasta i u unutrašnje membrane mitohondrija kod eukariota.

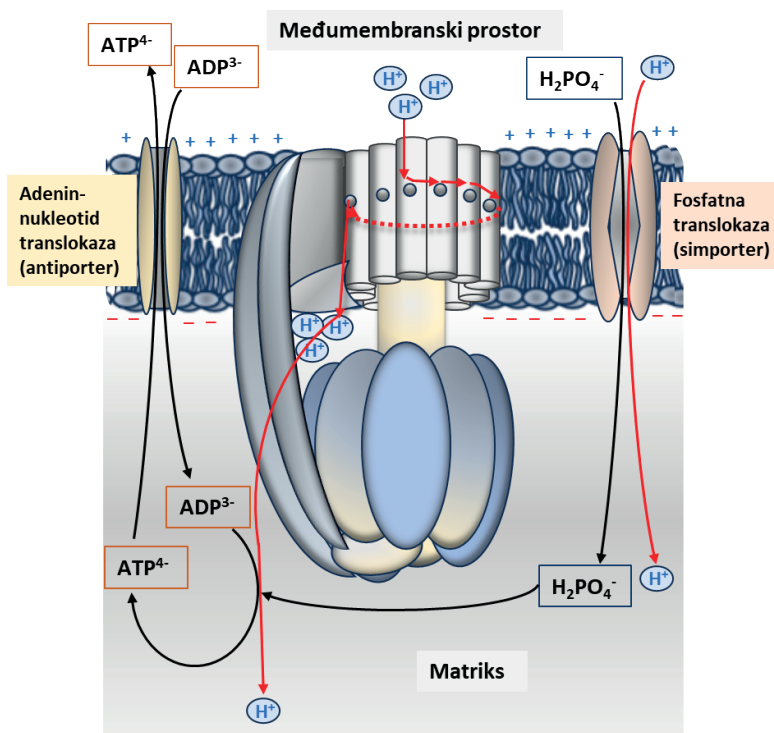
F_0 (indeks „o“ potiče od oligomicin-senzitivan) je integralni membranski proteinski kompleks koji se sastoji od najmanje tri različite proteinske (glavne) subjedinice: a , b_2 (dve b-subjedinice) i c_n koje formiraju prstenastu strukturu tj. kanal kroz koji protoni prolaze kroz unutrašnju membranu mitohondrije iz matriksa u intermembranski prostor. Broj c-subjedinica je promenljiv zavisno od vrste, najčešće, $n=7-14$, ali se može u litera-

turi naći podatak da broj c-subjedinica može ići i do 18).

F_1 je periferni membranski proteinski kompleks sačinjen od najmanje pet različitih subjedinica: α_3 (3 subjedinice), β_3 (3 subjedinice), γ , δ i ϵ) i sadrži katalitičko mesto za sintezu ATP-a iz ADP-a i Pi. Vezan je za F_0 sa strane koja je okrenuta prema matriksu mitohondrije (**Sl. 2.32**). Tri α -podjedinice i tri β -podjedinice su raspoređene naizmenično, formirajući heksagonalni cilindar oko γ -podjedinice, strukture slične kanalu.

F_0F_1 ATP-sintaza/ATP-aza je enzim koji sintetiše (ili razgrađuje) ATP, a funkcioniše kao motor: kada se transportom protona u međumembranski prostor dostigne dovoljno veliki elektrohemijski gradijent (napon (V)) na unutrašnjoj membrani, dolazi do toka protona duž koncentracijskog gradijenta (spontano, „nizbrdno“) iz međumembranskog prostora u matriks mitohondrije kroz F_0 , što izaziva rotaciju podjedinica rotora ($c_n - \gamma\epsilon$) u odnosu na podjedinice statora ($ab_2 - \alpha_3\beta_3\delta$), a rotacija γ -podjedinice indukuje konformacione promene β -subjedinica F_1 -regiona sekvencijalno: od otvorene pozicije, preko pozicije delimičnog („labavog“) vezivanja, do konformacije čvrstog vezivanja ADP i Pi što dovodi do sinteze ATP. *U suprotnoj reakciji, hidroliza ATP-a na F_1 -subjedinici, izaziva obrnutu rotaciju podjedinica rotora koja pokreće F_0 da pumpa protone u obrnutom smeru.* Regulacija aktivnosti ATP-sintaze je složena i uključuje nekoliko različitih mehanizama. U bakterijama i hloroplastima, podjedinica epsilon (ϵ) igra važnu ulogu u ovoj regulaciji, utiče na efikasnost spregnutih reakcija transporta elektrona i protoka protona, utiče na katalitički put selektivno inhibirajući aktivnost hidrolize ATP-a (**Sl. 2.32**). Struktura i funkcija CF_0CF_1 -ATP-sintaze u hloroplastima je slična opisnoj strukturi i funkciji mitohondrijske ATP-sintaze F-tipa (videti poglavlje Fotosinteza).

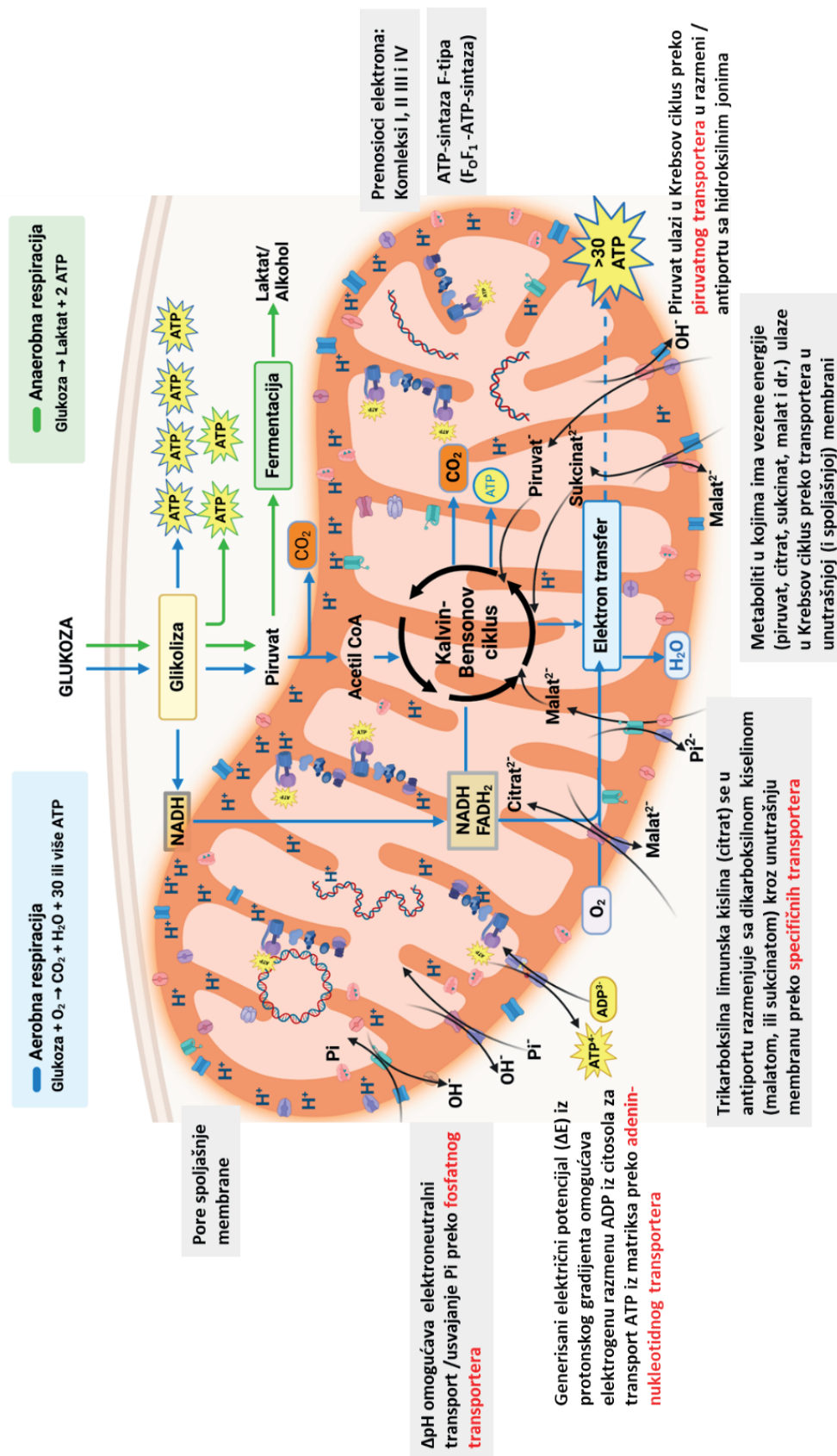
Efikasan transport ATP-a iz mitohondrijajskog matriksa (mesta sinteze) u citoplazmu je ostvaren *aktivnošću adenin-nukleotidnih transportera (ADP/ATP)* u unutrašnjoj (i spoljašnjoj) mitohondrijskoj membrani (**Sl. 2.33**). Funkcionisanje ovih transportera u prometu ADP/ATP, tj. premeštanje molekula ATP negativnijeg standardnog redukcionog potencijala (ATP^{4-}) iz mitohondrije, u zamenu za ADP koji ima pozitivniji (manje negativan, ADP^{3-}) redukcionu potencijal, energizovano je upravo elektrohemijskim gradijentom, odnosno, protonskom pokretačkom silom (Δp). ***Za sintezu 1 molekula ATP-a, $3H^+$ je potrebno da prođe kroz F_0 subjedinicu ATP-sintaze i bude „ubačeno“ u matriks mitohondrije (duž elektrohemijskog protonskog gradijenta).*** Ova kalkulacija je rezultat toga da se potencijal jednog H^+ koji se kreće iz međumembranskog prostora kroz F_0 region ATP-sintaze (kompleks V) i ulazi u mitohondrijski matriks, koristi za transport ADP i Pi gde se na nivou F_1 regiona ATP-sinteze generiše ATP koji izlazi iz mitohondrije. Prema tome, jedan proton se mora uzeti u obzir kao „trošak“ razmene $ATP/(ADP + P_i)$, te konačna kalkulacija pokazuje da se $3H^+$ koriste za sintezu jednog molekula ATP, plus $1H^+$ za razmenu $(ADP + P_i) \leftrightarrow ATP$ (**Sl. 2.33**).



Sl. 2.33. Transmembranski transport u biljnoj mitohondriji je ostvaren preko specifičnih transportera koji koriste elektrohemijski gradijent, nastao zbog postojanja negativnog električnog potencijala, ΔE od $\approx -200\text{mV}$, sa unutrašnje strane unutrašnje membrane i gradijenta hemijskog transmembranskog potencijala (ΔpH) zbog nagomilavanja protona (zakišeljavanja) u intermembranskom prostoru i time alkalizovanja strome mitohondrije.

Kada se govori o ulozi trans-membranskog elektrohemijskog/protonskog gradijenta, odnosno (Δp) u aktivnom transportu materija kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu, ne sme se izostaviti ni transport P_i^- u antiportu sa OH^- preko fosfatnog transportera u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani. Pored esencijalne uloge u sintezi ATP, elektrohemijski/protonski gradijent ima i ulogu u transportu organskih kiselina iz Krebsovog ciklusa; antiport na piruvatnom transporteru – usvajanje piruvata u zamenu za OH^- , je takođe ostvaren energijom iz elektro-hemijskog gradijenta na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani (**Sl. 2.34**).

Treba napomenuti da je udeo električnog transmembranskog potencijala (ΔE), odnosno hemijskog transmembranskog potencijala (ΔpH) u ukupnoj protonskoj pokretačkoj sili (Δp) različit za različite materije koje se transportuju kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu.



Sl. 2.34. Transmembranski transport u biljnoj mitohondriji.
 Kreirano u BioRender-u. Pajevic, S. (2025); Elektronski izvori slika, str. 159.

Koliko se molekula ATP generiše oksidativnom razgradnjom (dekarboksilacijom) jednog molekula saharoze / glukoze i koliko je to energije deponovane u hemijskim vezama između atoma (ΔG°), koja se iskorišćava za metaboličke potrebe ćelije?

Iako je P. Mičel još polovinom XX veka postavio naučnu osnovu za računanje energetskog bilansa procesa ćelijskog disanja, a nešto kasnije opisao kako je oksidativna razgradnja supstrata povezana sa fosforilacijom i kretanjem protona kroz unutrašnju membranu mitohondrija, obimna i brojna istraživanja u tom relativno dugom periodu do danas, ipak ostavljaju nedoumicu o tačnom broju molekula ADP koji može biti fosforilisan u ATP tokom potpune oksidacije molekula saharoze / glukoze u ćeliji (maksimalna energija).

Još uvek se u udžbenicima može naći proračun da se potpunom razgradnjom jednog mola/molekula glukoze oslobađa 36–38 molekula ATP, ali se danas, u sve većem broju naučnih publikacija i udžbenika iznosi naučno-dokazana tvrdnja da se **u procesu aerobnog disanja, potpunom razgradnjom jednog molekula saharoze oslobađa 60 molekula ATP, odnosno, razgradnjom jednog molekula glukoze koji ulazi u proces glikolize, zatim preko Krebsovog ciklusa i na kraju kroz elektronski transport u unutrašnjoj membrani mitohondrija, oslobađa se ukupno, 30 molekula ATP (Tabela 2.4).**

Tabela. 2.4. Potpunom oksidacijom jednog molekula saharoze, uključujući fosforilaciju na nivou supstrata, do CO_2 , nastaje oko 60 molekula ATP (Adaptirano prema Taiz i sar., 2018)

Reakcija	Broj molekula ATP po molekulu saharoze
GLIKOLIZA	
4 x fosforilacija na nivou supstrata	4
4 x NADH	$4 \times 1,5 = 6$
CIKLUS LIMUNSKKE KISELINE	
4 x fosforilacija na nivou supstrata	4
4 x FADH_2	$4 \times 1,5 = 6$
16 x NADH	$16 \times 2,5 = 40$
UKUPNO	60

Napomena: NADH poreklom iz citoplazme se oksiduje eksternom NADH-dehidrogenazom; pretpostavka je da alternativne oksidaze nisu uključene.

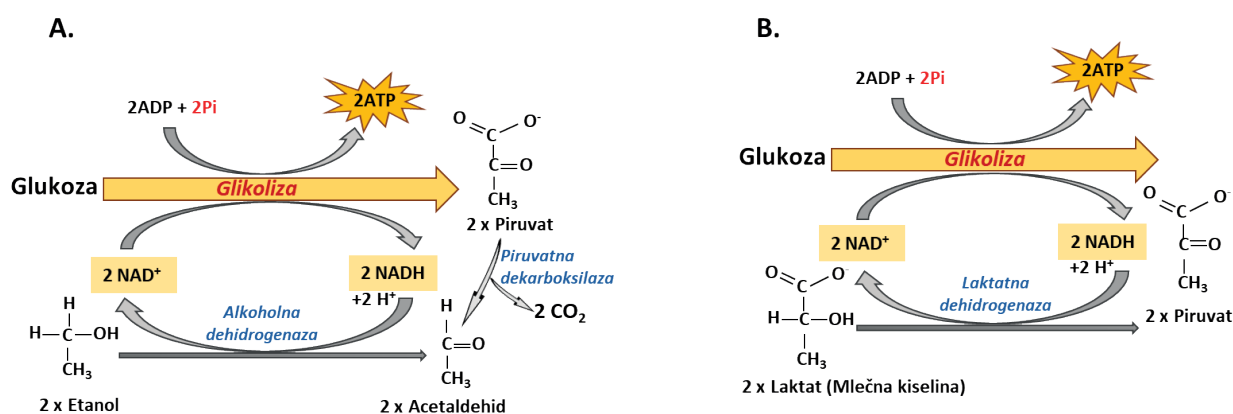
Za proizvodnju jednog molekula glukoze u Kalvinovom ciklusu biljka koristi 18 molekula ATP-a (videti poglavlje Fotosinteza), ali kada se isti molekul glukoze oksidiše u ćelijskom disanju, prvo u citoplazmi, a zatim u mitohondriji, dobija se 30 (ili čak više molekula ATP). Ovaj energetski disbalans posledica je (pogrešnog) obračuna uz pretpostavku da se promet energije kroz serije biohemijskih reakcija ogleda isključivo u međusobnoj konverziji ATP-a i ADP-a, ali se promet slobodne energije dešava u svim povezanim reakcijama. Objašnjenje:

Osvrćući se na već izneto u potpoglavlju 2.3. (Stvaranje ATP-a iz glukoze/saharoze; Standardna Gibsova slobodna energija (ΔG°)), izračunata vrednost ΔG° deponovane u hemijskim vezama ATP-a nastalog iz ADP i P_i je $-7,3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-30,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). U standardnim, „in vitro“ uslovima međutim, ΔG° hidrolize jednog mola ATP-a u živoj ćeliji skoro je dvostruko veća od ove vrednosti i iznosi oko $14 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, odnosno, oko $(-57 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$. Istovremeno, ne može se zanemariti ni mogućnost da alternativno, ATP može biti u različitim metaboličkim reakcijama hidrolizovan u AMP i pirofosfat (PPi), kada je oslobođena energija ΔG° oko $50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Prema tome, koristeći ove kvantitativne pokazatelje, koji ukazuju na to da je vrednost ΔG° koja je sačuvana u hemijskim vezama ATP-a oko $(-50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$, može se izračunati da je oko $3000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ slobodne energije sačuvano u ATP nastalom potpunom aerobnom razgradnjom jednog molekula saharoze (60 molekula ATP-a po jednom molekulu saharoze $\times 50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Prema brojnim literaturnim podacima, ovaj iznos slobodne energije deponovan u jednom molu ATP-a, predstavlja oko 50% slobodne energije koja se može dobiti potpunom oksidacijom saharoze, dok se ostatak gubi, najčešće u

obliku toplote, što je u saglasnosti sa prethodno iznetim u potpoglavlju 2.3., gde je navedeno da ako se posmatra sumarna jednačina ćelijskog disanja, odnosno potpuna oksidativna razgradnja (dekarboksilacija) saharoze (1 mol glukoze + 1 mol fruktoze) do CO_2 i H_2O , onda je neto promena standardne Gibsove slobodne energije ovog termodinamičkog sistema (sistema reakcija): $\Delta G^0 \approx -5760 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ saharoze (342 g saharoze).

2.14. Fermentacija (vrenje)

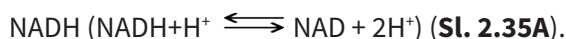
Nedostatak kiseonika (anoksija), ili pak smanjenje njegovog parcijalnog pritiska (hipoksija), predstavljaju abiotičke faktore koji kod aerobnih organizama deluju kao stresori uslovljavajući niz morfoloških, fizioloških, biohemijskih i molekularnih promena, sa posledicom u ograničenju prinosa useva. U nedostatku kiseonika, piruvat nastao u procesu glikolize, ne može nastaviti svoj metabolički put u mitohondrijama, tako da ne dolazi do Krebsovog ciklusa, transporta elektrona kroz membranu, te oksidativne fosforilacije i stvaranja ATP-a. Odsustvo Krebsovog ciklusa u anaerobnim uslovima onemogućava regeneraciju NAD^+ , nagomilava se njegov redukovani oblik, $\text{NADH} + \text{H}^+$ koji predstavlja hemijski oblik deponovanja vodonika i elektrona za elektron-transportni lanac u mitohondrijama. Istovremeno, enzim neophodan za oksidaciju (dehidrogenaciju) glicerinaldehid-3-fosfata preko NAD^+ (*glicerinaldehid-3-fosfatna dehidrogenaza*; reakcija br. 6 glikolize) ne može obavljati svoju funkciju u glikolizi bez NAD^+ . Da bi biljke (neke gljive i bakterije) prevazišle toksične efekte anaerobnog stresa koji se povremeno javlja, pokreće se mreža događaja koja počinje percepcijom stresa i završava se ekspresijom velikog broja gena odgovornih za sintezu specifičnih proteina – enzima i transkripcionih faktora odgovornih za usmeravanje metabolizma ka fermentaciji (vrenju). Fermentacija stoga, predstavlja metaboličku adaptaciju ćelijskog disanja na odsustvo kiseonika: piruvat nastao u glikolizi ne prelazi iz citoplazme u mitohondrije, već dolazi do njegove parcijalne razgradnje do alkohola, ili mlečne kiseline (laktata), pri čemu je energetska dobit za biljku mala, a najveći deo energije još uvek je vezan u produktima fermentacije (**Sl. 2.35**).



Sl. 2.35. Alkoholna fermentacija (A); Mlečno-kiselinska (laktatna) fermentacija (B).

Alkoholna fermentacija je karakteristična za biljke, ali je veoma zastupljena i najviše proučena kod kvasca, jednoćelijskih i saprotrofnih gljiva iz roda *Saccharomyces* (od grčkog sacharon (šećer) i mices (gljiva), što znači šećerna gljiva). Mnogi pripadnici ovog roda (pivski kvasac, pekarski kvasac i dr.) se zbog postojanja fermentacije smatraju veoma važnim u proizvodnji hrane (piva, hleba, alkoholnih pića i dr.). Za proces alkoholne fermentacije važna je aktivnost dva enzima: *piruvatne dekarboksilaze* i *alkoholne dehidrogenaze*. Dekarboksilacijom piruvata *piruvatnom dekarboksilazom* nastaje acetaldehid (2 C atoma, CH_3CHO) uz oslobađanje CO_2 . Acetaldehid potom biva redukovano preko NADH (iz glikolize) u etanol (etil-alkohol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$),

a etanol katalitičkim delovanjem alkoholne dehidrogenaze prelazi u piruvat. Treba napomenuti da je *alkoholna dehidrogenaza* enzim koji katališe **reverzibilnu reakciju** reoksidacije:



Za razliku od alkoholne fermentacije koja je tipična za biljne ćelije i kvasce, mnogo manje prisutna, ali ipak registrovana fermentacija kod biljaka je i **mlečno-kiselinska (laktatna)**, kada se piruvat iz glikolize direktno redukuje u citoplazmi preko $\text{NADH} + \text{H}^+$, do mlečne kiseline (laktata). Enzim koji katališe ovu reverzibilnu reakciju prenosa protona i elektrona sa $\text{NADH} + \text{H}^+$ na piruvat je *laktat-dehidrogenaza* (Sl. 2.35B).

Termodinamički, fermentacijom je ostvarena vrlo mala energetska dobit, jer je još uvek preko 90% energije deponovane u C–H–O vezama glukoze ostalo vezano u 2 molekula alkohola, odnosno, mlečne kiseline. Veliki broj naučnih rezultata ukazuje na to da je energetska efikasnost fermentacije (alkoholne i mlečne) kod biljaka oko 4%.

Za aerobne organizme kojima je potreban kiseonik da bi preživeli (eukarioti i većina prokariota) fermentacija je privremena/fakultativna i njene reakcije imaju za cilj da obezbede preživljavanje u periodu dok su koncentracije kiseonika niske. Ako koncentracije kiseonika ostanu niske (u uslovima hipoksije), eukariotske ćelije neće moći da održavaju metabolizam samo na osnovu 2 molekula ATP, koliko iznosi neto energetska dobit iz glikolize i fermentacije po jednom molekulu glukoze. Pošto su manje i imaju niže energetske potrebe, neke fakultativno anaerobne bakterije mogu da održavaju metabolizam tako što obe vrste reakcija fermentacije teku odjednom, pri čemu se jedan piruvat pretvara u mlečnu kiselinu, dok se drugi metaboliše u alkohol.

Periodična pojava hipoksije korenova karakteristična je za biljake koje rastu na plavnim zemljištima, tako da je tokom poplava metabolizam korenskih ćelija zbog nedovoljne količine i slabe difuzije kiseonika usmeren ka fermentaciji. U zavisnosti od biljne vrste i stepena hipoksije, inicijalno može da se javi prvo laktatna, a potom alkoholna fermentacija, ali ovo nije pravilo. Smatra se da je etanol najmanje toksičan produkt fermentacije, jer može da difunduje van ćelije, dok akumulisani laktat u ćeliji izaziva zakišeljavanje (acidifikaciju) citoplazme i znatno ozbiljniji poremećaj metabolizma.

2.15. Literatura

- Akinfemiwa O, Zubair M, Muniraj T. (2023): Amylase. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; PMID: 32491670. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491670/>
- Alverson AJ, Rice DW, Dickinson S, Barry K, Palmer JD. (2011): Origins and recombination of the bacterial-sized multichromosomal mitochondrial genome of cucumber. *The Plant Cell*, 23(7): 2499–2513. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087189>
- Barreto P, Koltun A, Nonato J, Yassitepe J, Maia IdG, Arruda P. (2022): Metabolism and signaling of plant mitochondria in adaptation to environmental stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19): 11176. <https://doi.org/10.3390/ijms231911176>
- Bekiaris PS, Klamt S. (2023): Network-wide thermodynamic constraints shape NAD(P)H cofactor specificity of biochemical reactions. *Nature Communications*, 14: 4660. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40297-8>
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H. (2013): Mobilization of Stored Reserves. In: *Seeds*. Springer, New York, NY. pp 183–246. ISBN 978-1-4614-4693-4 https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4_5
- Bhagavan NV, Ha CE. (2015): Chapter 13 - Electron Transport Chain, Oxidative Phosphorylation, and Other Oxygen-Consuming Systems. In: N.V. Bhagavan, Chung-Eun Ha (Eds.). *Essentials of Medical Biochemistry* (Second Edition), Academic Press, pp. 187–204. ISBN 9780124166875 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416687-5.00013-0>
- Bi C, Qu Y, Hou J, Wu K, Ye N, Yin T. (2022): Deciphering the Multi-Chromosomal Mitochondrial Genome of *Populus simonii*. *Frontiers in Plant Science*, 13: 914635. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.914635>
- Britannica, The Editors of Encyclopaedia. “cellular respiration”. *Encyclopedia Britannica*, <https://www.britannica.com/science/cellular-respiration> Pristupljeno 20 marta 2024.
- Brody T. (1999): 4 – Regulation of energy metabolism. In: Tom Brody (Ed.). *Nutritional Biochemistry* (Second Edition). Academic Press, pp. 157–271. ISBN 9780121348366 <https://doi.org/10.1016/B978-012134836-6/50007-X>
- Brzezinski P, Ādelroth P. (2013): Cytochrome Oxidases, Bacterial. In: William J. Lennarz, M. Daniel Lane (Eds.). *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Second Edition). Academic Press, pp. 602–606. ISBN 9780123786319, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00131-6>
- Carrín ME, Carelli AA. (2010): Peanut oil: Compositional data. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112: 697–707. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900176>
- Cléménçon B, Babot M, Trézéguet V. (2013): The mitochondrial ADP/ATP carrier (SLC25 family): Pathological implications of its dysfunction. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3): 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.006>
- Cooper GM. (2000): *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. In: Sunderland (MA) (Ed.). *Metabolic Energy*. Sinauer Associates, ISBN-109780878931064. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9903/>
- Cramer WA, Hasan SS, Yamashita E. (2011): The Q cycle of cytochrome bc complexes: A structure perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1807(7): 788–802. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.02.006>
- Cui J, Tcherkez G. (2021): Potassium dependency of enzymes in plant primary metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166: 522–530. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.017>
- Feniouk BA, Suzuki T, Yoshida M. (2006): The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of FOF1-ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(5-6): 326–338. <https://doi.org/10.1016/j.bba-bio.2006.03.022>
- Hiroshi A, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K, Hiratad K, Yamashitad E, Tsukihara T, Ogurac T, Yoshikawa S. (2009): A peroxide bridge between Fe and Cu ions in the O₂ reduction site of fully oxidized cytochrome c oxidase could suppress the proton pump. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7): 2165–2169. <https://doi.org/10.7554/eLife.69096>
- Jain M, Aggarwal S, Nagar P, Tiwari R, Mustafz A. (2020): A D-lactate dehydrogenase from rice is involved in conferring tolerance to multiple abiotic stresses by maintaining cellular homeostasis. *Scientific Reports*, 10: 12835 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69742-0>
- Kaur H, Lakatos-Karoly A, Vogel R, Nöll A, Tampé R, Glaubitzet C. (2016): Coupled ATPase-adenylate kinase activity in ABC transporters. *Nature Communications*, 7: 13864. <https://doi.org/10.1038/ncomms13864>
- Kim E, Annibal A, Lee Y, Park H-EH, Ham S, Jeong D-E, Kim Y, Park S, Kwon S, Jung Y, Park JS, Kim SS, Antebi A, Lee

- S-J, V (2023): Mitochondrial aconitase suppresses immunity by modulating oxaloacetate and the mitochondrial unfolded protein response. *Nature Communications*, 14: 3716. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39393-6>
- Kim HU. (2020): Lipid Metabolism in Plants. *Plants*, 9(7): 871. <https://doi.org/10.3390/plants9070871>
- Kruger NJ, von Schaewen A. (2023): The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3): 236–246. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00039-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00039-6)
- Lal M. (2018). Lipid Metabolism. In: *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer, Singapore, pp. 379-424. ISBN 978-981-13-2023-1 https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_10
- Le XH, Millar AH. (2023): The diversity of substrates for plant respiration and how to optimize their use. *Plant Physiology*, 191(4): 2133–2149. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac599>
- Lehti-Shiu MD, Shiu SH. (2012): Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 367(1602): 2619–2639. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0003>
- Liu M, Lu S. (2016): Plastoquinone and Ubiquinone in Plants: Biosynthesis, Physiological Function and Metabolic Engineering. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1898. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01898>
- Mitchell P, Moyle J. (1967): Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*, 213(5072): 137-139. <https://doi.org/10.1038/213137a0>
- Mitome N, Kubo S, Ohta S, Takashima H, Shigefuji Y, Niina T, Takada S. (2022): Cooperation among c-subunits of FoF1-ATP synthase in rotation-coupled proton translocation. *eLife*, 11: e69096.
- Moosavi B, Berry EA, Zhu XL, Yang WC, Yang GF (2019): The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76: 4023–4042. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03200-7>
- Morley SA, Nielsen BL. (2017): Plant mitochondrial DNA. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 22(6): 1023–1032. <https://doi.org/10.2741/4531>
- Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. (2020): Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*, 37: 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
- Okuno D, Iino R, Noji H. (2011): Rotation and structure of FOF1-ATP synthase. *The Journal of Biochemistry*, 149(6): 655–664. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr049>
- Peng H, Mirouze M, Bucher E. (2022): Extrachromosomal circular DNA: A neglected nucleic acid molecule in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 69: 102263. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102263>
- Plaxton WC. (1996): The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 185–214. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.185>
- Rivoal J, Bérénice R, Pradet A. (1991): Lactate Dehydrogenase in *Oryza sativa* L. Seedlings and Roots: Identification and Partial Characterization. *Plant Physiology*, 95(3): 682–686. <https://doi.org/10.1104/pp.95.3.682>
- Sharkey TD. (2021): Pentose Phosphate Pathway Reactions in Photosynthesizing Cells. *Cells*, 10(6): 1547. <https://doi.org/10.3390/cells10061547>
- Smith EN, Schwarzländer M, Ratcliffe RG, Kruger NJ. (2021): Shining a light on NAD- and NADP-based metabolism in plants. *Trends in Plant Science*, 26(10): 1072–1086. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.06.010>
- Sopory SK, Munshi M. (1998). Protein Kinases and Phosphatases and Their Role in Cellular Signaling in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(3): 245–318. <https://doi.org/10.1080/07352689891304230>
- Stanley D, Farnden KJF, MacRae EA. (2005): Plant α -amylases: functions and roles in carbohydrate metabolism. *Biologia, Bratislava*, 60(16): 65-71.
- Studničková M, Paulová-Klukanová H, Turánek J, Kovář J. (1988): Reduction of NAD⁺ and NADP⁺ and reductive cleavage of NADH and NADPH yielding NAD. and NADP. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 252(2): 383–394 [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(88\)80224-9](https://doi.org/10.1016/0022-0728(88)80224-9)
- Taylor NL, Millar AH. (2018): *Plants in Action. A resource for teachers and students of plant science. Chapter 2 - Carbon dioxide assimilation and respiration; 2.4.3 - The oxidative pentose phosphate pathway.* In: Rana Munns, Susanne Schmidt, Christine Beveridge, Ulrike Mathesius (Eds.). Australian Society of Plant Scientists, New Zealand Society of Plant Biologists, and New Zealand Institute of Agricultural and Horticultural Science 2010–2018. Dostupno na:

<https://www.rseco.org/content/about.html>

- Ueno H, Suzuki T, Kazuhiko Kinoshita K, Masasuke Yoshida M. (2024): ATP-driven stepwise rotation of FoF₁-ATP synthase. The Proceedings of the National Academy of Sciences, Biochemistry, 102(5): 1333–1338. <https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.0407857102>
- Valero E, Varón R, García-Carmona F. (2000): Kinetics of a self-amplifying substrate cycle: ADP-ATP cycling assay. Biochemistry Journal, 350: 237–243.
- Vinogradov AD. (2008): NADH/NAD⁺ interaction with NADH: Ubiquinone oxidoreductase (Complex I). Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 1777(7–8): 729–734. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.014>
- Vlasov AV, Osipov SD, Bondarev NA, Uversky VN, Borshchevskiy VI, Yanyushin MF, Manukhov IV, Rogachev AV, Vlasova AD, Ilyinsky NS, Kuklin AI, Dencher NA, Gordeliy VI. (2022): ATP synthase FOF₁ structure, function, and structure-based drug design. Cellular and Molecular Life Science, 79(3): 179. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04153-0>
- Walker RP, Chen ZH, Famiani F. (2021): Gluconeogenesis in Plants: A Key Interface between Organic Acid/Amino Acid/Lipid and Sugar Metabolism. Molecules, 26(17): 5129. <https://doi.org/10.3390/molecules26175129>
- Ward BL, Anderson RS, Bendich AJ. (1981): The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (Cucurbitaceae). Cell, 25(3): 793–803. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90187-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90187-2)
- Wedding RT. (1989): Malic Enzymes of Higher Plants. Characteristics, Regulation, and Physiological Function. Plant Physiology, 90: 367–371. <https://doi.org/10.1104/pp.90.2.367>
- Wu YQ, Liao XZ, Zhang ZN, Tembrock TR, Broz A (2022): Genomic architectural variation of plant mitochondria—A review of multichromosomal structuring. Plant mitochondrial genome. Journal of systematics and evolution, 60 (1): 160–168. <https://doi.org/10.1111/jse.12655>
- Xia D, Esser L, Tang WK, Zhou F, Zhou Y, Yu L, Yu CA. (2013): Structural analysis of cytochrome bc₁ complexes: implications to the mechanism of function. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 1827(11–12): 1278–1294. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.008>
- Xiao W, Wang RS, Handy DE, Loscalzo J. (2018): NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. Antioxidants and Redox Signalling, 28(3): 251–272. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7216>
- Xu J-J, Hu M, Yang L, Chen X-Y. (2022): How plants synthesize coenzyme Q. Plant Communications, 3: 100341. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100341>
- Zhang X, Feng Z, Zhao L, Liu S, Wei F, Shi Y, Feng H, Zhu, H. (2020): Succinate dehydrogenase SDH1–1 positively regulates cotton resistance to *Verticillium dahliae* through a salicylic acid pathway. Journal of Cotton Research, 3: 12. <https://doi.org/10.1186/s42397-020-00052-6>

2.15.1. Elektronski izvori slika

- Sl. 2.2.** Kreirano u: BioRender-u. Pajević, S. (2025): <https://biorender.com/x91c633>
- Sl. 2.3.** Adaptirano prema licenci: Wikimedia Commons, Licenca CC BY 4.0. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0315_Mitochondrion_new.jpg
- Sl. 2.6.** Kreirano u: BioRender-u. Pajević, S. (2025): <https://BioRender.com/k95q602>
- Sl. 2.11.** Kreirano u BioRender-u. Pajević, S. (2025): <https://biorender.com/o53e623>
- Sl. 2.13.** Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki, H. (2013): Mobilization of Stored Reserves. Seeds, 183–246. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4_5
- Sl. 2.14.** Kreirano u: BioRender-u. Pajević, S. (2025): <https://BioRender.com/m07h251>
- Sl. 2.16.** Kreirano u: BioRender-u. Pajević, S. (2025): <https://BioRender.com/i65u944>
- Sl. 2.18.** Kreirano u: BioRender-u. Pajević, S. (2025): <https://BioRender.com/x12r359>
- Sl. 2.32.** Adaptirano prema: Vlasov AV, Osipov SD, Bondarev NA, Uversky VN, Borshchevskiy VI, Yanyushin MF, Manukhov IV, Rogachev AV, Vlasova AD, Ilyinsky NS, Kuklin AI, Dencher NA, Gordeliy VI. (2022): ATP synthase F₀F₁ structure, function, and structure-based drug design. Cell Mol Life Sci. 6; 79(3): 179. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04153-0>
- Sl. 2.34.** Kreirano u: BioRender-u. Pajević, S. (2025): <https://BioRender.com/t13v345>

