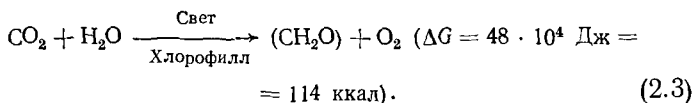


ваемая темновой, может протекать как в темноте, так и на свету.

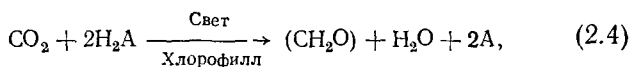
Световую и темновую реакции можно разделить, используя вспышки света, длящиеся краткие доли секунды. Вспышки света длительностью меньше одной миллисекунды (10^{-3} с) можно получить либо с помощью механического приспособления, поставив на пути пучка постоянного света вращающийся диск со щелью, либо электрически, заряжая конденсатор и разряжая его через вакуумную или газоразрядную лампу. В качестве источников света пользуются также рубиновыми лазерами с длиной волны излучения 694 нм. В 1932 г. Эмерсон (Emerson) и Арнольд (Arnold) освещали суспензию клеток *Chlorella* вспышками света от газоразрядной лампы с длительностью около 10^{-5} с. Они измеряли скорость выделения кислорода в зависимости от энергии вспышек, длительности темнового промежутка между вспышками и температуры суспензии клеток. При увеличении интенсивности вспышек насыщение фотосинтеза в нормальных клетках наступало, когда выделялась одна молекула O_2 на 2500 молекул хлорофилла. Эмерсон и Арнольд сделали вывод, что максимальный выход фотосинтеза определяется не числом молекул хлорофилла, поглощающих свет, а числом молекул фермента, катализирующего темновую реакцию. Они также обнаружили, что при увеличении темновых интервалов между последовательными вспышками за пределы 0,06 с выход кислорода в расчете на одну вспышку уже не зависел от длительности темнового интервала, тогда как при более коротких промежутках он возрастал с увеличением длительности темнового интервала (от 0 до 0,06 с). Таким образом, темновая реакция, которая определяет уровень насыщения фотосинтеза, завершается примерно за 0,06 с. На основе этих данных было рассчитано, что среднее время, характеризующее скорость реакции, составило около 0,02 с при 25°C.

2.5. Важные открытия. Формирование новых представлений

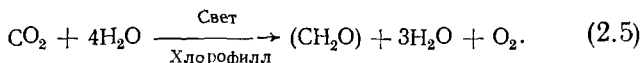
Состояние знаний в области фотосинтеза в начале нашего века можно было бы выразить уравнением



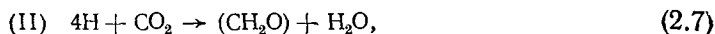
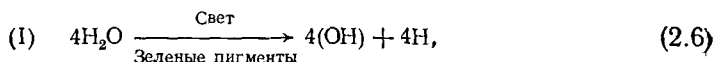
Примерно до начала 1930-х годов многие исследователи в этой области полагали, что первичная реакция фотосинтеза заключается в расщеплении двуокиси углерода под действием света на углерод и кислород с последующим восстановлением углерода до углеводов с участием воды в ходе нескольких последовательных реакций. Эта точка зрения изменилась в 1930-х годах в результате двух важных открытий. Во-первых, были обнаружены разновидности бактерий, способных ассимилировать CO_2 и синтезировать углеводы, не используя для этого энергию света. Затем голландский микробиолог ван Нил (van Niel) сравнил процессы фотосинтеза у растений и бактерий и показал, что некоторые бактерии могут ассимилировать CO_2 на свету, не выделяя при этом O_2 . Такие бактерии способны к фотосинтезу лишь при наличии подходящего субстрата — донора водорода. Ван Нил считал, что фотосинтез можно описать общим уравнением



где H_2A — окисленный субстрат. Ван Нил предположил, что фотосинтез зеленых растений и водорослей является частным случаем, когда H_2A — это H_2O и 2A — это O_2 . Тогда первичным фотохимическим актом в фотосинтезе растений должно быть разложение воды на окислитель (ОН) и восстановитель (Н). Затем первичный восстановитель (Н) может вызвать восстановление CO_2 до органических веществ, составляющих клетку, а первичный окислитель (ОН) расходуется в реакции, в которой высвобождается O_2 и снова получается H_2O . Полное уравнение для фотосинтеза растений по ван Нилу можно записать так:



Это суммарная реакция, протекающая в три отдельных этапа:



Из этой последовательности реакций отчетливо видно, что кислород в фотосинтезе происходит из воды, а не из углекислоты.

Второе важное открытие сделал в 1937 г. Р. Хилл (R. Hill) в Кембриджском университете. С помощью дифференциального центрифугирования гомогената тканей листа он отделил фотосинтезирующие частицы (хлоропласты) от дыхательных частиц. Полученные Хиллом хлоропласты при освещении сами по себе не выделяли кислорода (возможно, из-за того, что они были повреждены при разделении). Однако они начинали выделять кислород на свету, если в суспензию вносили подходящие акцепторы электрона (окислители), например ферриоксалат калия или феррицианид калия. При выделении одной молекулы O_2 фотохимически восстанавливались четыре эквивалента окислителя. Позднее было обнаружено, что многие хиноны и красители восстанавливаются хлоропластами на свету. Однако хлоропласты не могли восстановить CO_2 , природный акцептор электронов при фотосинтезе. Это явление, известное теперь как реакция Хилла, представляет собой индуцируемый светом перенос электронов от воды к нефизиологическим окислителям (реагентам Хилла) против градиента химического потенциала. Значение реакции Хилла состоит в том, что она продемонстрировала возможность разделения двух процессов — фотохимического выделения кислорода и восстановления углекислоты при фотосинтезе.

Разложение воды, приводящее к выделению свободного кислорода при фотосинтезе, было установлено Рубеном (Ruben) и Каменом (Камен) в Калифорнии в 1941 г. Они поместили фотосинтезирующие клетки в воду, обогащенную изотопом кислорода, имеющим массу 18 атомных единиц (^{18}O). Изотопный состав кислорода, выделенного клетками, соответствовал составу воды, но не CO_2 . Кроме того, Камен и Рубен открыли радиоак-

тивный изотоп ^{14}C , который впоследствии успешно использовали Бассэм (Bassham), Бенсон (Benson) и Кальвин (Calvin), изучавшие путь превращения углерода при фотосинтезе (гл. 6). Кальвин и его сотрудники показали, что восстановление углекислоты до сахаров происходит в результате темновых ферментативных реакций, причем для восстановления одной молекулы CO_2 требуются две молекулы восстановленного пиридиннуклеотида (NADPH) и три молекулы АТФ. К тому времени роль АТФ и пиридиннуклеотидов в дыхании тканей уже была установлена. Возможность фотосинтетического восстановления NADP до NADPH выделенными хлоропластами была доказана в 1951 г. в трех разных лабораториях. В 1954 г. Арнон (Arnon), Аллен (Allen) и Уотли (Whatley) продемонстрировали фотосинтез вне клетки — они наблюдали ассимиляцию CO_2 и выделение O_2 выделенными хлоропластами шпината. В течение следующего десятилетия из хлоропластов удалось выделить белки, участвующие в переносе электронов при фотосинтезе, — ферредоксин, пластоцианин, ферредоксин — NADP⁺-редуктазу, цитохромы *b* и *f* и т. д.

Таким образом, в здоровых зеленых листьях под действием света образуются NADPH и АТФ. Восстановительные эквиваленты NADPH и энергия гидролиза АТФ используются для восстановления CO_2 до углеводов в присутствии ферментов, причем активность некоторых ферментов регулируется светом.