

6. Фиксация двуокиси углерода

В предыдущей главе мы выяснили, что NADPH и АТФ являются продуктами световых реакций фотосинтеза. Далее происходят темновые процессы фиксации CO_2 , в которых используется «ассимиляционная сила» молекул NADPH и АТФ. В этой главе мы рассмотрим некоторые подробности реакций, связанных с восстановлением CO_2 до уровня углеводов. Кальвин и его сотрудники, работавшие над решением этих вопросов с 1946 г., предложили настолько удачную методику эксперимента и столь точно установили механизмы реакций, что анализ их данных приобрел очень важное значение для современной биологии в целом. За работу по выяснению пути углерода при фотосинтезе Кальвин получил в 1961 г. Нобелевскую премию по химии.

6.1. Техника эксперимента

Опыты по изучению пути фиксации CO_2 при фотосинтезе удалось провести благодаря использованию долгоживущего изотопа углерода ^{14}C , появившегося в лабораториях с 1945 г., и применению двумерной хроматографии на бумаге, разработанной несколькими годами ранее. Фиксацию CO_2 изучали у одноклеточных зеленых водорослей *Chlorella* и *Scenedesmus*. Выбор объекта объясняется тем, что, с одной стороны, эти организмы по своим биохимическим свойствам очень похожи на высшие зеленые растения и с другой — их можно выращивать в одинаковых, стандартных условиях, а при проведении опытов с кратковременной фиксацией углекислоты клетки можно очень быстро убивать.

В итоге работ Кальвина был постулирован детальный цикл реакций превращения углекислоты. Необходимые данные были получены в результате опытов трех типов.

а) Фотосинтезирующие водоросли помещали в среду, содержащую $^{14}\text{CO}_2$, на разные промежутки времени

и прослеживали включение радиоактивности в различные соединения. При очень кратковременной инкубации радиоактивность должна была обнаруживаться только в первичных продуктах обмена. В результате было установлено, что фосfogлицериновая кислота (ФГК) является первичным продуктом карбоксилирования. В конечные продукты фиксации, например в сахарозу, радиоактивность включалась гораздо медленнее.

б) Определяли положение радиоактивного изотопа (^{14}C) в молекулах меченых соединений. Таким путем удалось выяснить подробности взаимопревращения сахарофосфатов при регенерации специфического сахарофосфата, акцептирующего молекулу $^{14}\text{CO}_2$, что помогло выявить механизмы синтеза сахаров и других соединений.

в) Для того чтобы проверить, действительно ли промежуточные продукты реакций ведут себя соответственно предсказанию, исследователи изменяли внешние условия — включали и выключали свет, в широких пределах изменяли концентрацию CO_2 и т. п.

Техника эксперимента проиллюстрирована на рис. 6.1, 6.2 и 6.3. На рис. 6.1 приведено схематическое изображение аппарата для получения экстрактов из во-

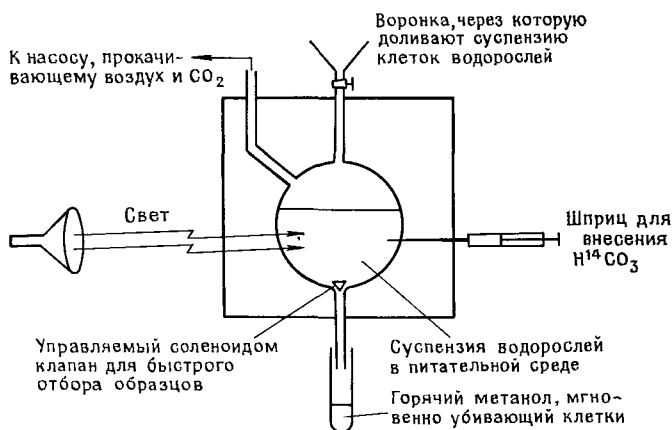


Рис. 6.1. Схема аппарата для изучения фиксации $^{14}\text{CO}_2$ фотосинтезирующими водорослями, предложенная Кальвином и Бассэмом в 1962 г.

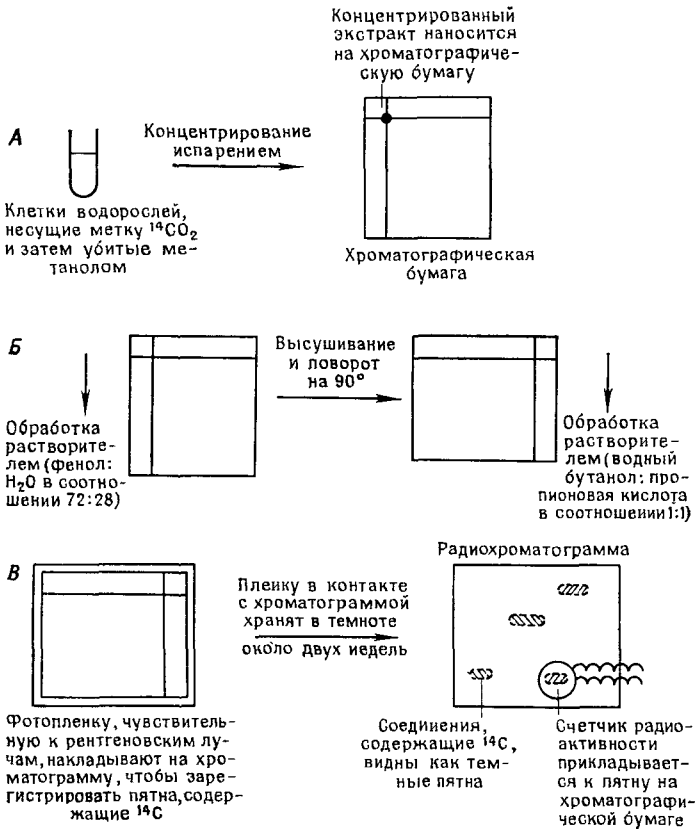


Рис. 6.2. Обнаружение продуктов фиксации $^{14}\text{CO}_2$ водорослями при кратковременном освещении. Используются хроматография на бумаге и радиоавтография.

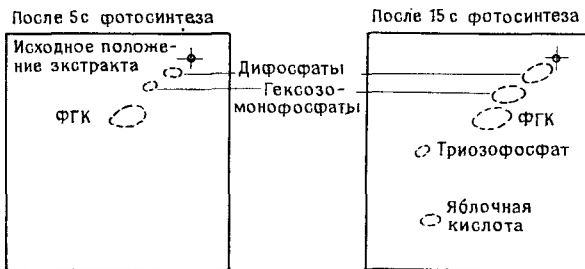


Рис. 6.3. Радиоавтограммы продуктов фотосинтеза водорослей, фиксировавших $^{14}\text{CO}_2$ в течение коротких промежутков времени.

дорослей, использующих при фотосинтезе радиоактивно меченную углекислоту $^{14}\text{CO}_2$. Водоросли суспендируют в питательной среде, значение рН в которой поддерживается постоянным. Через суспензию водорослей продувают воздух и CO_2 . Управляемый клапан позволяет быстро сливать определенные объемы суспензии клеток в метанол, под действием которого все последующие биохимические превращения блокируются. На рис. 6.2 показана дальнейшая работа с инактивированными водорослями. Экстракт из убитых водорослей концентрируют под вакуумом и после этого наносят непосредственно на хроматографическую бумагу. Используя разные растворители, хроматографию проводят в двух направлениях так, что исходная смесь веществ движется по бумаге сначала в одном направлении, а затем в другом, перпендикулярном первому (двумерная хроматография). В результате анализируемая смесь делится на компоненты. Затем измеряют радиоактивность пятен, соответствующих различным соединениям. Расположение пятен устанавливают, исходя из радиоавтограмм, схематически показанных на рис. 6.3. Две радиоавтограммы, приведенные на рис. 6.3, показывают, какие соединения из экстракта клеток *Chlorella* содержат ^{14}C после того, как фотосинтез продолжался 5 и 15 с. Очевидно, что ФГК, триозофосфат и сахарофосфаты образуются очень быстро, тогда как сахароза, органические кислоты и аминокислоты формируются при более длительном фотосинтезе. Видно, что совместное использование радиоактивной CO_2 и метода двумерной хроматографии является очень чувствительным способом для обнаружения продуктов фотосинтеза и определения их количества.

6.2. Углеродный цикл при фотосинтезе (цикл Кальвина)

Фиксацию CO_2 и ее восстановление до уровня сахаров (или других соединений) можно рассматривать как процесс, состоящий из четырех отдельных стадий, показанных на рис. 6.4 и 6.5.

I. Стадия карбоксилирования. Считается, что на этой стадии происходит реакция присоединения CO_2 к