

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, тризофосфат 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

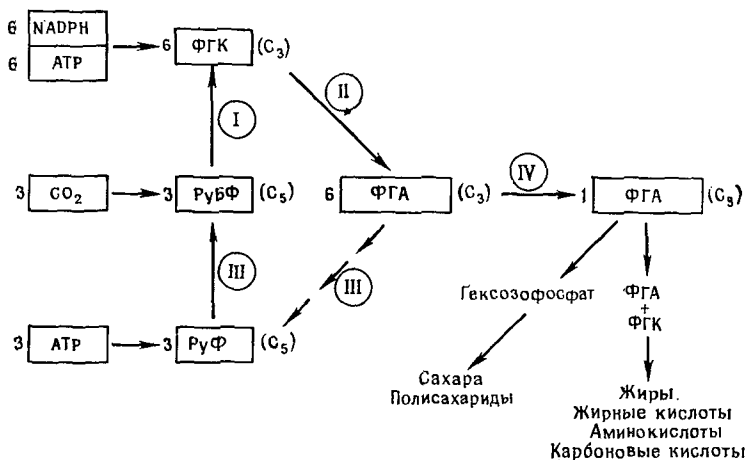
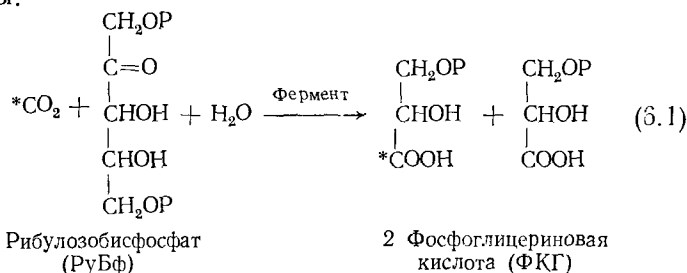


Рис. 6.4. Схема цикла фиксации CO_2 . РубФ — рибулозобисфосфат, ФГК — фосфоглицериновая кислота, ФГА — фосфоглицеральдегид (триозофосфат), РубФ — рибулозо-5-фосфат.

5-углеродному сахару, рибулозобисфосфату, приводящая к образованию двух молекул фосфоглицериновой кислоты:



Эта реакция катализируется ферментом рибулозобисфосфат-карбоксилазой, называемым также карбоксидисмутазой, или белком фракции I.

Данные, подтверждающие правильность уравнения (6.1), отчетливо показаны на рис. 6.6. При освещении фотосинтезирующих клеток концентрация РубФ и ФГК в этих клетках увеличивается до определенного уровня, называемого «стационарным состоянием». При вы-

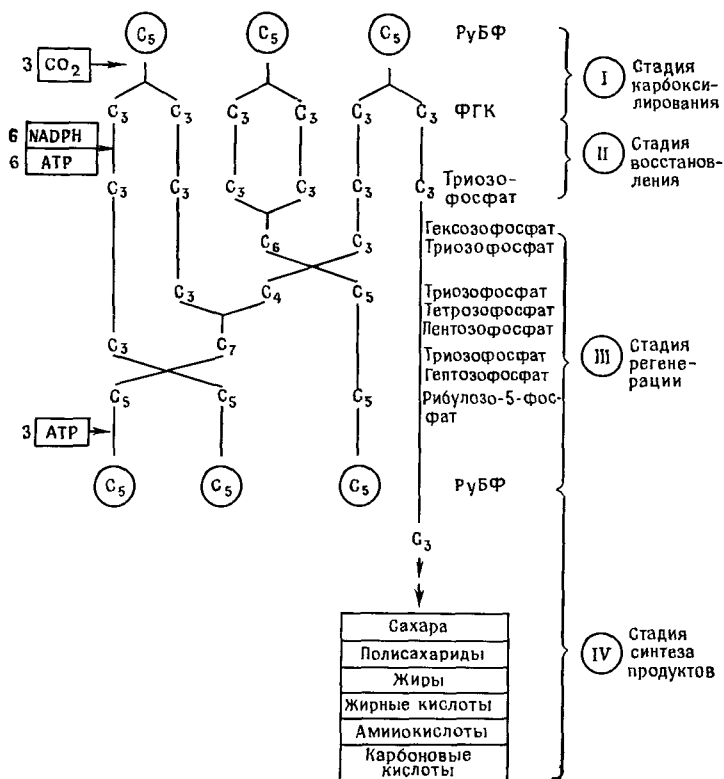


Рис. 6.5. Четыре стадии фиксации CO₂ при фотосинтезе, согласно Холлу и Уотли (Hall, Whatley).

ключении света содержание РуБФ немедленно уменьшается (поскольку синтез этого вещества происходит только на свету), тогда как содержание ФГК продолжает увеличиваться, так как из каждой молекулы РуБФ образуются две молекулы ФГК. На рис. 6.6 показан также эффект перехода от высокой концентрации CO₂ к очень низкой. Уровень «стационарного состояния» достигается, когда концентрация CO₂ оказывается равной 1%, но при резком уменьшении концентрации CO₂ до 0,003% (и при включенном свете) содержание ФГК быстро падает, поскольку количество имеющегося CO₂ оказывает

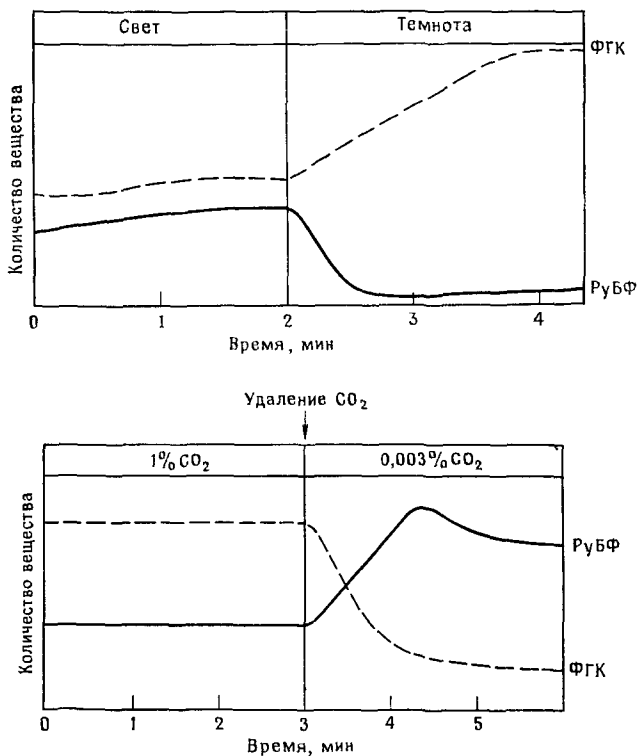
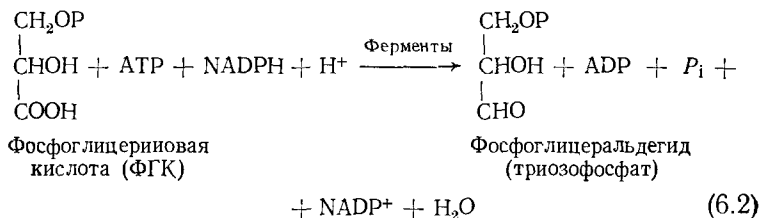


Рис. 6.6. Взаимное превращение рибулозобисфосфата (РуБФ) и фосфоглицериновой кислоты (ФГК) в опытах по фотосинтезу. (По Бассэму и Кальвину; см. Ruhland, 1960.)

ся недостаточным для фиксации. Содержание РуБФ при этом увеличивается, так как расход этого вещества на образование ФГК путем фиксации CO_2 оказывается незначительным, а его синтез на свету продолжается.

II. Стадия восстановления. ФГК, образуемая путем присоединения CO_2 к РуБФ, — это органическая кислота, и ее энергетический уровень ниже энергетического уровня сахаров. Для превращения ФГК в трехуглеродный сахар (триозофосфат) нужно затратить энергию в виде «ассимиляционной силы» NADPH и АТФ.

Данная реакция осуществляется в два этапа. На первом этапе к ФГК присоединяется фосфат молекулы АТФ, на втором происходит восстановление за счет NADPH. Суммарную реакцию можно описать в виде следующего уравнения:



Как видно из этого уравнения, восстановительная сила расходуется для замены карбоксильной группы ФГК на альдегидную группу триозофосфата. АТФ требуется в качестве источника дополнительной энергии, необходимой для завершения этой реакции. Однако отщепляемый при этом от АТФ неорганический фосфат (P_1) не включается в триозофосфат. Оба фермента, участвующие в двух этапах реакции, обнаружены в выделенных хлоропластах.

Когда CO_2 уже восстановлена до уровня трехуглеродного сахара, триозофосфата, ту часть реакций, которая связана с запасанием энергии при фотосинтезе, можно считать завершённой. Теперь требуется регенерировать, привести в исходное состояние, молекулу первичного акцептора CO_2 , т. е. рибулозобисфосфата, чтобы фиксация CO_2 могла повторяться снова и снова (стадия регенерации) и чтобы триозофосфат мог превращаться в более сложные сахара, углеводы, жиры, аминокислоты (стадия синтеза продуктов).

III. *Стадия регенерации.* Регенерация РубФ для повторной фиксации CO_2 происходит в сложной последовательности реакций с участием фосфатов трех-, четырех-, пяти-, шести- и семиуглеродных сахаров. В общих чертах такие реакции показаны на рис. 6.5. Детали этих реакций в данном случае интереса не представляют, а при необходимости их можно найти в статье Бассэма (Bassham), опубликованной в журнале *Scientific American* (1962). Достаточно сказать, что все реакции и участ-

вующие в них ферменты более или менее подробно исследовались разными группами исследователей.

IV. *Стадия синтеза продуктов.* Конечными продуктами фотосинтеза считаются в первую очередь сахара и углеводы. Однако установлено, что в ходе фиксации CO_2 при фотосинтезе образуются также жиры, жирные кислоты, аминокислоты и органические кислоты. Многие детали соответствующих реакций известны, но для нас они опять-таки большого интереса не представляют. Следует лишь отметить, что в разных условиях, различающихся по освещенности, концентрации CO_2 , O_2 и т. п., по-видимому, происходит образование разных конечных продуктов (рис. 6.7). В последнее время синтез конечных продуктов исследуется очень активно, поскольку понимание механизма реакций и выяснение благоприятствующих им факторов могут в конечном счете позволить нам создавать необходимые условия для того, чтобы растения по нашему желанию синтезировали больше или меньше сахаров, жиров, аминокислот.

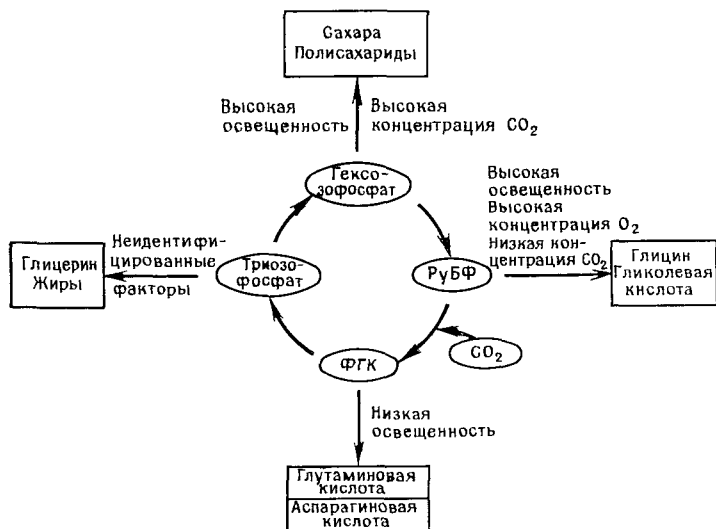


Рис. 6.7. Условия, благоприятствующие синтезу различных вторичных продуктов фотосинтеза. [Рисунок взят из работы Гиллера и Уотли (Hiller, Whatley) в книге *Advancement of Science*, 1967, с. 643.]