

УДК 576.343:546.26.001.57

О ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМАХ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА ПРИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АССИМИЛЯЦИИ CO_2

А. А. ИВЛЕВ, Д. А. КНЯЗЕВ

(Кафедра неорганической и аналитической химии)

Представление о том, что в процессе фотосинтетической ассимиляции CO_2 происходит дискриминация тяжелого изотопа углерода ^{13}C , возникло сразу при выполнении первых определений изотопного состава углерода биомассы живых организмов. Было установлено, что углерод биомассы фотосинтезирующих организмов обогащен ^{12}C (на 15—2‰) относительно CO_2 или HCO_3^- , ассимилируемых из среды, а углерод биомассы гетеротрофных организмов по изотопному составу заметно не отличается от углерода их пищи [19, 24, 26, 32, 37].

Вскоре было также обнаружено, что способностью дискриминировать тяжелый углерод при ассимиляции CO_2 обладают не только фото-, но и хемосинтезирующие организмы [3, 5]. Это привело к выводу, что фракционирование изотопов углерода происходит на стадии ассимиляции CO_2 у всех автотрофных организмов. Эксперименты по выращиванию микроорганизмов разных типов на органических субстратах и CO_2 с известным изотопным составом подтвердили наблюдения, проведенные в естественных условиях [5, 33].

Новый шаг к пониманию природы изотопных эффектов при ассимиляции CO_2 связан с обнаружением большой группы фотосинтезирующих организмов так называемого C_4 -типа, биомасса которых очень незначительно обогащена ^{12}C (на 3—5‰) по сравнению с ассимилируемой CO_2 .

Различия в значениях наблюдаемых изотопных эффектов у C_4 -фотосинтетиков по сравнению с ранее изученными фотосинтетиками C_3 -типа стали связывать с различиями в путях ассимиляции CO_2 [20, 31, 36, 38, 39].

В самом деле, у C_3 -фотосинтетиков акцептором CO_2 является рибулозодифосфат (РиДФ). Фиксация происходит на РиДФ-карбоксилазе, а первичным ассимилятом служит C_3 -соединение — фосфоглицериновая кислота (ФГК).

У C_4 -фотосинтетиков акцептор CO_2 — фосфоенолпироват (ФЕП). Фиксация происходит на ФЕП-карбоксилазе, а первичными ассимилятами являются C_4 -соединения (малат, аспарагиновая кислота).

Возникло предположение, что изотопное фракционирование у C_3 -фотосинтетиков обусловлено реакцией ферментативного карбоксилирования РиДФ. Оно находится в согласии с результатами опытов по ферментативному карбоксилированию РиДФ и ФЕП *in vitro* [41].

Обогащение биомассы легким изотопом может происходить и при дыхании за счет удаления из клетки изотопнотяжелой углекислоты [7]. Однако степень обогащения, как показывает количественный анализ соответствующего механизма разделения изотопов [8], охватывает лишь часть диапазона фракционирования, наблюдаемого в природных организмах, так что и в этом случае должна быть дискриминация тяжелого изотопа при ассимиляции CO_2 . Возникает вопрос, на какой из элементарных стадий ассимиляции происходит фракционирование изотопов. Данному вопросу и посвящена настоящая статья.

Ранее существовало мнение, что основную роль в возникновении изотопной дискриминации ^{13}C при ассимиляции CO_2 фотосинтезирующими организмами играют процессы диффузии газообразных молекул CO_2 сквозь мембрану (через устьичные отверстия листьев у растений) и процессы растворения CO_2 в цитоплазме [18, 32]. Этим, в частности, пытались объяснить изотопные различия наземных и водных организмов исходя из того, что, поскольку водные организмы ассимилируют растворенные формы углерода, изотопные эффекты диффузии и растворения у них должны заведомо отсутствовать. Рассмотрим эту точку зрения подробнее.

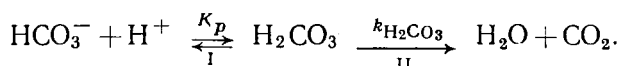
Как известно, фракционирование изотопов в процессе диффузии возникает при движении молекулярного потока газа через пористую перегородку, когда длина свободного пробега молекул становится больше диаметра пор или соизмерима с ним. При нормальном давлении средняя длина свободного пробега молекул, равная приблизительно 0,1 мкм, значительно меньше ширины устьичных отверстий листа, т. е. в нормальных условиях имеет место вязкий поток CO_2 из среды в межклеточное пространство [12], при котором диффузионные изотопные эффекты отсутствуют.

Изотопные эффекты растворения CO_2 в воде, как показывают прямые эксперименты, малы — около 1‰ [19] — и несопоставимы с эффектами наблюдаемого обогащения биомассы легким изотопом.

Затем было обнаружено, что изотопный состав углерода водных растений и микроорганизмов сильно различается [26]. Это, а также дискриминация ^{13}C , наблюдаемая в экспериментах по ферментативному карбоксилированию РиДФ в бесклеточной системе *in vitro* [21, 27, 28, 39, 41], при котором изотопные эффекты диффузии и растворения исключены, доказывают, что основная причина изотопного фракционирования при ассимиляции CO_2 связана с другими процессами, т. е. с химическими реакциями.

В работе [9] в качестве возможной причины обогащения фиксируемого углерода легким изотопом рассмотрен кинетический изотопный эффект неравновесного превращения HCO_3^- в CO_2 . При значениях pH, характерных для цитоплазмы клетки, почти весь растворенный углерод находится в бикарбонатной форме. В то же время показано [22], что при карбоксилировании РиДФ (первичного акцептора CO_2 в C_3 -растениях), в ходе которого происходит сильная дискриминация ^{13}C , преимущественно фиксируемой ферментом формой углерода является CO_2 . Константа Михаэлиса K_m для РиДФ-карбоксилазы в случае CO_2 равна $4,5 \cdot 10^{-4}$ моль, в случае HCO_3^- — $(1-5) \cdot 10^{-2}$ моль [12]. В клетке обратимое превращение бикарбонатной формы в CO_2 осуществляется при помощи высокоактивного фермента — карбоангидразы. Хотя число оборотов карбоангидразы гораздо выше числа оборотов РиДФ-карбоксилазы, благодаря высокой концентрации последней [14] может оказаться, что концентрация CO_2 у мест карбоксилирования ниже константы Михаэлиса, и, следовательно, дегидратация HCO_3^- будет лимитирующей стадией в процессе ассимиляции. В этом случае возникает кинетический изотопный эффект неравновесного превращения HCO_3^- в CO_2 и в результате в реакцию карбоксилирования будут вовлекаться преимущественно изотопнолегкие молекулы CO_2 .

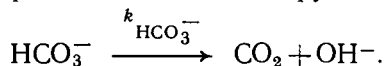
Оценим этот эффект. Представим два механизма неравновесного превращения HCO_3^- в CO_2 . Согласно первому, превращение происходит в две стадии:



В начале протонируется HCO_3^- с образованием угольной кислоты. Последняя распадается с отщеплением воды. Кинетический изотопный эффект, обуславливающий преимущественную фиксацию изотопно-

легкой CO_2 , может возникнуть лишь в том случае, если II стадия контролирует скорость процесса. Тогда на I стадии должно установиться равновесие. При pH 8,3 константа химического равновесия (K_p) на I стадии равна $2 \cdot 10^{-4}$. Константа скорости реакции $k_{\text{H}_2\text{CO}_3}$ на II стадии равна 20 с^{-1} [11].

Согласно второму механизму, превращение HCO_3^- в CO_2 происходит непосредственно при отщеплении OH^- -группы:



Константа скорости этой реакции $k_{\text{HCO}_3^-}$ равна $2 \cdot 10^{-4} \text{ с}$. Легко показать, что скорости образования CO_2 по данным механизмам сопоставимы, поэтому изотопные эффекты необходимо рассматривать для обоих случаев. Отношение скоростей реакций v_1 и v_2 — соответственно для 1-го и 2-го механизмов — будет равно

$$v_1/v_2 = \left(\frac{d[\text{CO}_2]}{dt} \right)_1 / \left(\frac{d[\text{CO}_2]}{dt} \right)_2 = k_{\text{H}_2\text{CO}_3} [\text{H}_2\text{CO}_3] / k_{\text{HCO}_3^-} [\text{HCO}_3^-].$$

Отношение $[\text{H}_2\text{CO}_3]/[\text{HCO}_3^-]$ при pH 8,3, определяемое из K_p , равно $4 \cdot 10^4$. Следовательно, $v_1/v_2 \approx 2,5$.

Изотопный эффект неравновесного превращения HCO_3^- в CO_2 α_Σ по первому механизму равен произведению термодинамического изотопного эффекта α_{therm} на I стадии и кинетического изотопного эффекта α_{kin} на II стадии, т. е.

$$\alpha_\Sigma = \alpha_{\text{therm}} \cdot \alpha_{\text{kin}} = K_p(^{13}\text{C})/K_p(^{12}\text{C}) \cdot k_{\text{H}_2\text{CO}_3(^{13}\text{C})}/k_{\text{H}_2\text{CO}_3(^{12}\text{C})}.$$

Значение α_{therm} легко оценить по значениям β -факторов (отношению приведенных статсумм) молекул HCO_3^- и HCO_3^- , которые при 25° равны (по [1]): $\beta_{\text{H}_2\text{CO}_3} = 1,220$; $\beta_{\text{HCO}_3^-} = 1,196$. Отсюда

$$\alpha_{\text{therm}} = \beta_{\text{H}_2\text{CO}_3} / \beta_{\text{HCO}_3^-} = 1,020.$$

Значение α_{therm} легко оценить по значениям β -факторов (отношению частоты, соответствующей валентному колебанию связи $\text{C}-\text{OH}$, разрываемой при дегидратации).

В рамках переходного комплекса множитель, соответствующий этой частоте, вносит основной вклад в кинетический изотопный эффект:

$$\alpha_{\text{kin}} = \frac{1}{\beta_{\text{CO}}} = \frac{u(^{12}\text{C})}{u(^{13}\text{C})} \cdot \frac{\text{Sh} \frac{u(^{13}\text{C})}{2}}{\text{Sh} \frac{u(^{12}\text{C})}{2}} \text{ при}$$

$u = \frac{hc}{kT} v$; $v(^{12}\text{C}) = v(^{13}\text{C}) + \Delta v$, где v — валентная частота колебания связи CO ; h — постоянная Планка; c — скорость света, k — постоянная Больцмана; T — температура, $^\circ\text{K}$; Δv — изотопный сдвиг валентной частоты CO .

Примем, что v_{CO} в H_2CO_3 равна v_{CO} в HCO_3^- . Воспользуемся данными спектрального расчета HCO_3^- [29]: $v_{\text{CO}} = 1329 \text{ см}^{-1}$; $\Delta v = 21 \text{ см}^{-1}$. Отсюда $\alpha_{\text{kin}} = 0,939$.

В итоге суммарный изотопный эффект дегидратации $\alpha_\Sigma = 0,957$, что соответствует обогащению образующейся CO_2 изотопом ^{12}C приблизительно на 45 ‰.

Согласно второму механизму, изотопные эффекты отщепления OH^- от HCO_3^- можно, как и в случае отщепления H_2O от H_2CO_3 , аппроксимировать через различия констант скоростей деструкции изотопных связей $\text{C}-\text{O}$. При этом кинетический изотопный эффект, как показано выше, равен 0,939, что соответствует обогащению фиксируемой CO_2 изотопом ^{12}C на 65 ‰.

Полученные теоретические оценки сопоставимы со значениями изотопных эффектов, в большинстве случаев наблюдаемых в опытах по ферментативному карбоксилированию РидФ *in vitro*, которые обычно не превышают 60 ‰. Вместе с тем известны случаи, когда значения эффектов были равны или даже превышали 80 ‰ [25, 27, 49]. Напротив, в растениях и микроорганизмах С₃-типа степень изотопной дискриминации ¹³С, даже если весь изотопный эффект приписать ассимиляции СО₂, не выше 30 ‰. Следовательно, когда изотопные эффекты больше 65 ‰, их нельзя объяснить с рассмотренных позиций (или по крайней мере только эффектом неравновесного превращения НСО₃⁻ в СО₂), тогда как сильное снижение эффектов, наблюдаемое в реальной клетке, можно объяснить влиянием фермента карбоангидразы — неперемного участника процесса ассимиляции СО₂ [9]. Карбоангидраза обеспечивает быстрое установление как химического, так и изотопного равновесия в процессах гидратации СО₂ [35] и дегидратации растворенных форм [23]. При достижении равновесия и нормальных температурах изотопные различия между СО₂ и НСО₃⁻ составляют всего 4—5 ‰ [1]. Иными словами, если в клетке реализуется рассмотренный механизм возникновения изотопных эффектов, значения последних должны зависеть от конкуренции процессов дегидратации растворенной СО₂ и карбоксилирования РидФ, определяемой соотношением активностей и концентраций карбоангидразы и РидФ карбоксилазы. Чем выше активность карбоангидразы и чем сильнее она сдвигает систему с растворенной СО₂ к равновесию, тем меньше должен быть изотопный эффект.

Аналогичное снижение значений изотопных эффектов (опять-таки в случае справедливости рассмотренного механизма их возникновения), казалось бы, должно иметь место и в экспериментах по ферментативному карбоксилированию РидФ, если в систему наряду с РидФ-карбоксилазой добавить карбоангидразу. Этого, однако, обнаружено не было [28], что наряду с невозможностью объяснить появление очень высоких значений изотопных эффектов подвергает сомнению реальность указанной выше причины появления изотопных эффектов или по крайней мере ее единственность. Данный вопрос нуждается в более тщательной экспериментальной проверке.

Представляет интерес оценка возможности возникновения изотопного фракционирования в самом процессе ферментативного карбоксилирования РидФ. Прежде чем перейти к анализу, рассмотрим результаты экспериментов *in vitro*.

Первые данные были получены Парком и Эпстайном [32]. Ими обнаружено, что при карбоксилировании РидФ с участием РидФ-карбоксилазы из листьев томатов в бикарбонатном буфере с концентрацией 0,1 моль (рН 7,4) при 25° происходит обогащение карбоксильной группы фосфоглицериновой кислоты (ФГК) изотопом ¹²С. В одном из опытов оно составило 17,4, в другом — 14,7 ‰. С учетом того, что преимущественно ассимилируемой формой на РидФ-карбоксилазе является СО₂, а не НСО₃⁻, обогащение относительно ассимилируемого углерода должно быть на 4—5 ‰ меньше, так как расчет проводился авторами по бикарбонатной форме.

Уэллен, Саккет и Бенедикт [41] исследовали фракционирование изотопов при карбоксилировании с участием РидФ-карбоксилазы, выделенной из сорго. Опыты проводились при температурах 24 и 37°, рН бикарбонатного раствора 8,2. Эффекты оказались значительно выше, чем в опытах Парка и Эпстайна, и составили соответственно 42,9 и 26,1 ‰.

Столь же сильное фракционирование изотопов было в экспериментах по карбоксилированию на РидФ-карбоксилазе, выделенной из листьев парниковой фасоли [21]. Но в отличие от предыдущей работы авторы не обнаружили сильной температурной зависимости. Впрочем, этот вывод не вполне строг, так как температурная зависимость изуча-

Сопоставление изотопного состава углерода растений и микроорганизмов
(в числителе) с изотопными эффектами углерода при карбоксилировании РидФ
на карбоксилазах, выделенных из этих организмов (в знаменателе), по данным [24].
Значение $\delta^{13}\text{C}$ приводится в ‰ относительно ассимилируемого углерода

Rhodospirillum rubrum	Бактерия PR-6	Сине-зеленые водоросли	Шпинат	Соя	Сорго	Маис	Томаты
$\frac{-32,1}{-20,5}$	$\frac{-32,0}{-23,9}$	$\frac{-32,0}{-3,0;-8}$	$\frac{-36,6; -60}{-20,0}$	$\frac{-28,9}{-20,0}$	$\frac{-18;-33}{-4,5}$	$\frac{-64,0}{-4,0}$	$\frac{-8,2}{-18,5}$

лась при переменных значениях pH; хотя, по их мнению, влияние pH отсутствовало.

Фогель [28] сообщила о том, что изотопные эффекты карбоксилирования РидФ на ферментах, выделенных из шести различных фотосинтезирующих микроорганизмов, колебались от $-28,3\text{‰}$ у *Rhodospseudomonas sphaeroides* до $38,7\text{‰}$ у *Hydrogenomonas eutropha*. На значение эффекта влияла природа металла-кофактора. В одном из экспериментов при использовании в качестве кофактора Ni^{2+} значение эффекта равнялось $29,9\text{‰}$, а в случае Mn^{2+} — $41,9\text{‰}$. У *R. sphaeroides* выделены два типа РидФ-карбоксилазы, отличающиеся четвертичной структурой белка. Значения изотопного фракционирования при карбоксилировании РидФ на этих ферментах оказались соответственно $28,3$ и $31,1\text{‰}$. Было также отмечено, что присутствие или отсутствие карбоангидразы не влияло на эффект.

Из сводки данных [27], представленных в таблице, видно, что фракционирование изотопов имеет место независимо от того, выделена РидФ-карбоксилаза из C_3 - или C_4 -организмов, из микроорганизмов или растений. При этом изотопные эффекты, как правило, значительно превышают обогащение легким изотопом углерода биомассы соответствующих организмов. Максимальное фракционирование было обнаружено на РидФ-карбоксилазах, выделенных из шпината и маиса. В одном случае оно составило 80‰ [25], в другом — 90‰ [42]. В последней работе сообщалось о сильной зависимости эффекта от pH. Дискриминация ^{13}C росла от 18‰ при pH 7,5 до 36‰ при pH 8,5.

Остановимся теперь на экспериментах *in vitro* по ферментативному карбоксилированию фосфоенолпирувата (ФЕП) на ФЕП-карбоксилазах [25, 35, 47]. ФЕП является первичным акцептором CO_2 в C_4 -растениях, преимущественно ассимилируемая форма в которых — HCO_3^- [22]. Изотопное фракционирование на ФЕП-карбоксилазах значительно меньше, чем на РидФ-карбоксилазах [25, 35]. Для карбоксилазы, выделенной из листьев сорго, изотопные эффекты составили в среднем $-2,5 \pm 4,4\text{‰}$ [41]. Эти результаты согласуются со слабым обогащением изотопом ^{12}C биомассы, наблюдаемым у C_4 -растений. У последних к тому же благодаря высокой степени реассимиляции выдыхаемой CO_2 должно отсутствовать или быть сильно снижено дополнительное обогащение биомассы изотопом ^{12}C за счет механизма внутриклеточного фракционирования изотопов [7].

Рассмотренные экспериментальные данные позволяют сделать ряд выводов. Значительные изотопные эффекты сопровождают карбоксилирование РидФ на РидФ-карбоксилазе, но не проявляются при карбоксилировании ФЕП на ФЕП-карбоксилазе. Они определяются как неспецифическими факторами —

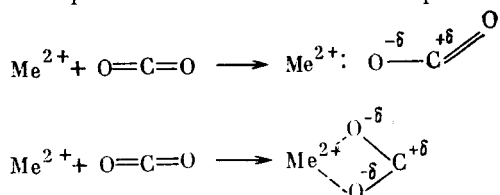


Схема 1.

рН и температурой, так и таким специфическим фактором, как природа металла-кофактора. Эти зависимости различны для ферментов, выделенных из разных организмов, что ука-

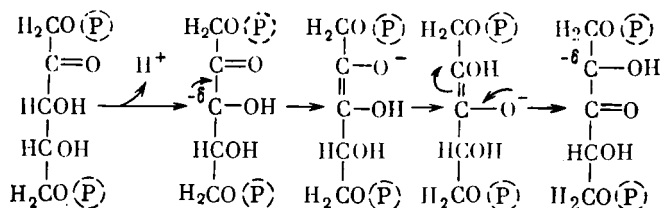


Схема 2.

зывает на связь изотопных эффектов со структурой фермента, его регуляторными свойствами.

Вернемся к вопросу об изотопном фракционировании при карбоксилировании на РиДФ-карбоксилазе. Отметим лишь, что возможность селекции изотопных молекул за счет их геометрических различий мы отрицаем, поскольку амплитуды колебаний связи $C=O$ и радиус молекулы CO_2 отличаются от соответствующих величин молекулы $^{13}CO_2$ всего на $3,7 \cdot 10^{-4}$ А [15], а различия углов вообще не фиксируются, в то же время лабильность белковых молекул, их способность к конфигурационным и конформационным превращениям хорошо известны [2].

Модельную конгруэнтную реакцию карбоксилирования РиДФ можно представить как взаимодействие координированной молекулы CO_2 , атом углерода которой заряжен положительно, с карбанионом РиДФ, образовавшимся при депротонизации.

Образование координационной связи CO_2 с металлом, являющимся кофактором в рассматриваемой ферментной реакции, может происходить по разным механизмам [16]. Появление положительного заряда на атоме углерода связано с подачей неподеленной пары кислорода CO_2 (1лq-электроны) на вакантную орбиталь металла. При этом нейтральная молекула CO_2 может изгибаться, на ее атоме углерода появляется положительный заряд, и молекула уподобляется молекулярному катиону CO_2 (схема 1).

Для нашего анализа важно то, что в результате комплексообразования электронная плотность на связи $C=O$ уменьшается и связь ослабевает. Это, как показано ниже, может приводить к появлению значительного кинетического изотопного эффекта того же знака, что и у эффекта, наблюдаемого при ферментативном карбоксилировании *in vitro*.

Образующийся металлокомплекс переносит CO_2^+ к депротонированной форме РиДФ, которая в ходе кетоенольной перегруппировки превращается в карбанион, второй углеродный атом которого имеет отрицательный заряд (схема 2).

Электронная плотность с третьего атома через енольную связь перекачивается на второй атом и создает у него отрицательный заряд. При этом водород от атома кислорода, смежного с третьим атомом углерода, переносится к атому кислорода, связанного со вторым атомом углерода. Далее положительно заряженный атом углерода координированной молекулы CO_2 взаимодействует с отрицательно заряженным атомом углерода РиДФ, а отщепляемый РиДФ протон замещает атом

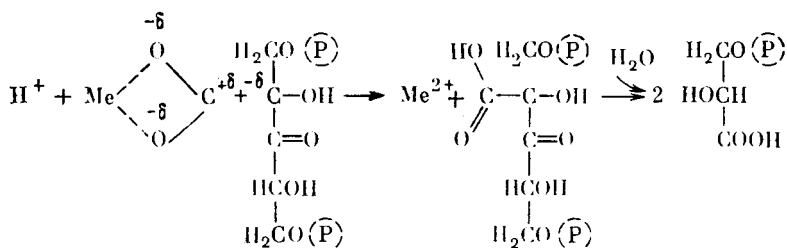


Схема 3.

металла у отрицательно заряженного атома кислорода CO_2 . Образуется неустойчивое соединение 2-карбокситр-3-кетопентит, который легко гидролизуется и образует 2 молекулы фосфоглицериновой кислоты (схема 3).

Описанные стадии карбоксилирования РнДФ, как мы полагаем, имеют место в моделируемой ферментативной реакции. Из [14] известно, что карбоксилирующий фермент РнДФ-карбоксилаза имеет два активных центра. Координация молекулы CO_2 катионом металла и образование диполя протекают на одном из них. Образование комплекса фермент — $\text{Me}^{2+} \sim \text{CO}_2$ индуцирует изменение конфигурации фермента. Это делает возможным присоединение РнДФ через SH-группы ко второму каталитическому центру (схема 4). В результате белок претерпевает дальнейшие конформационные изменения, в ходе которых идет реакция присоединения CO_2 к РнДФ. После распада промежуточного шестиуглеродного интермедиата и диссоциации комплекса фермента с Me^{2+} фермент возвращается в исходное конформационное состояние, в котором он способен вновь включаться в реакцию (схема 4).

Очевидно, наблюдаемый изотопный эффект по присоединяемому атому углерода (карбоксильному углероду ФГК) не может быть связан с превращениями РнДФ в карбанион. В самом деле, у возможного изотопного эффекта, обусловленного образованием С—С связи при синтезе 2-карбокситр-3-кетопентита, как было показано в исследованиях [6], знак противоположный тому, который наблюдается в экспериментах, т. е. образование С—С связи в том случае, если оно лимитирует скорость процесса ассимиляции, должно приводить к изотопному утяжелению, а не облегчению присоединяемого углерода. Следовательно, наблюдаемое при карбоксилировании РнДФ изотопное фракционирование, видимо, связано с превращением молекулы CO_2 в координированный лиганд.

Оценим этот эффект. В рамках теории абсолютных скоростей реакций значение кинетического изотопного эффекта принято аппроксимировать различием β -факторов молекул в исходном и «переходном» состояниях [13]. β -фактор исходного состояния нейтральной молекулы CO_2 известен и равен 1,189 [1]. О «переходном» состоянии CO_2 при комплексообразовании нет никакой информации, но если исходить из описанного выше механизма процесса, этому состоянию должно соответствовать возбужденное состояние CO_2 , в котором молекула нелинейна, электронная плотность оттянута к периферийным атомам, а на атоме углерода имеется небольшой положительный заряд. При отсутствии данных о силовом поле и структуре такой возбужденной молекулы рассчитать более или менее точное значение β -фактора нельзя, но мы можем оценить его по β -факторам молекул, имеющих аналогичную структуру и характер распределения электронной плотности. Ближайшими аналогами являются линейный молекулярный катион CO_2^+ и нелинейная молекула CF_2 . Электронные плотности в обеих молекулах оттянуты к периферийным атомам. В молекуле CF_2 это обусловлено высокой электроотрицательностью атомов фтора. В CO_2^+ положительный заряд находится на атоме углерода. В молекуле CF_2 вследствие ее нелинейности на атоме углерода также должен быть небольшой положительный заряд при электронейтральности молекулы в целом. Небольшие различия масс периферийных атомов мало влияют на значения β -факторов, но заметные различия в значениях силовых постоянных связей углерода с периферийными атомами определяют различия валентных колебательных частот, а следовательно, и β -факторов. Для

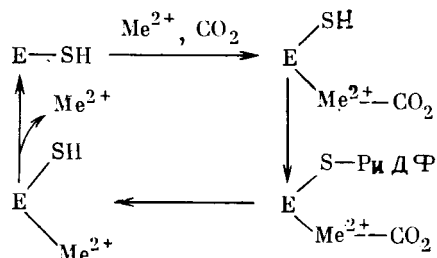


Схема 4.

CO_2^+ расчетное значение $\beta_{\text{CO}_2^+} = 1,140$, для CF_2 $\beta_{\text{CF}_2} = 1,083$. Поскольку, как уже отмечалось, значения силовых постоянных и частот в переходном состоянии мы не знаем, их различия в аппроксимирующих молекулах позволяют судить не только о значениях эффектов, но и об их изменчивости.

Кинетический изотопный эффект в случае «переходного» состояния, аппроксимируемого CO_2^+ , равен

$$(\alpha - 1) \cdot 10^3 = (\beta_{\text{CO}_2^+} / \beta_{\text{CO}_2} - 1) \cdot 10^3 = 43\%,$$

а в случае «переходного» состояния, аппроксимируемого CF_2 —

$$(\alpha - 1) \cdot 10^3 = (\beta_{\text{CF}_2} / \beta_{\text{CO}_2} - 1) \cdot 10^3 = 97\%.$$

Полученные теоретические оценки кинетических изотопных эффектов соответствуют как по знаку, так и по порядку эффектам, наблюдаемым при ферментативном карбоксилировании РидФ, из чего можно предположить, что эффекты обусловлены кинетическими изотопными эффектами, сопровождающими образование комплекса CO_2 с металлом-кофактором на РидФ-карбоксилазе. Чем больше скорость карбоксилирования зависит от скорости комплексообразования, тем значительнее будет проявляться кинетический изотопный эффект. В этом отношении представляет интерес сильная зависимость изотопного эффекта от рН. Наблюдаемое в исследованиях [42] снижение эффектов при уменьшении рН можно объяснить тем, что при некоторых достаточно низких значениях рН скорость реакции все больше начинает лимитироваться образованием аниона РидФ, а не комплексообразованием CO_2 . С понижением рН депротонизация затрудняется. Хотя образование аниона и не сопровождается изотопным эффектом, при карбоксилировании РидФ изотопный эффект снижается. Это обусловлено тем, что скорость реакции во все большей степени начинает контролироваться образованием связи С—С, а влияние на скорость стадии комплексообразования CO_2 с металлом на ферменте становится меньше.

Температура может влиять на изотопный эффект через изменение конформационных состояний фермента [2], в результате которого меняется контролирующая скорость стадия. Влияние таких неспецифических факторов, как рН и температура, для ферментативных реакций проявляется в узких пределах. Но данные пределы различны для ферментов, выделенных из разных организмов. Возможно, этим объясняется довольно большой разброс значений изотопных эффектов, наблюдаемых в экспериментах.

Понятно, что изотопный эффект карбоксилирования должен зависеть от специфических факторов — структуры ферментов, расположения в нем активных центров, природы металла-кофактора. Влияние последнего определяется его способностью к комплексообразованию с молекулой CO_2 . С иным механизмом реакции связано отсутствие заметного фракционирования изотопов при карбоксилировании на ФЕП-карбоксилазах.

В свете изложенного наблюдаемое относительно низкое обогащение биомассы C_3 -растений легким изотопом (которое, помимо ассимиляции CO_2 , вызывается внутриклеточными процессами) по сравнению с эффектами при карбоксилировании *in vitro*, вероятно, обусловлено тем, что стадия комплексообразования в реакциях *in vivo* лишь частично лимитирует скорость ассимиляции. Так как при ассимиляции CO_2 среды попадает внутрь клетки независимо от конкретного механизма фракционирования изотопов, для того чтобы фиксируемый углерод, а следовательно, и углерод биомассы могли обогатиться легким изотопом, должен существовать обратный поток изотопнотяжелого углерода из клетки в среду. Это CO_2 , выдыхаемая клеткой в световой период (фотодыхание). Вместе с тем этот поток включает не только CO_2 , оставшуюся в цитоплазме после фиксации клеткой части прямого пото-

ка, но и CO_2 , поступающую в цитоплазму в результате реакций декарбоксилирования во внутриклеточных процессах метаболизма (в цикле Кребса, при декарбоксилировании пирувата и др.). Механизмы газообмена в клетке, сочетающие ассимиляцию CO_2 и фотодыхание, рассмотрены в работе [12]. О том, что изотопный состав CO_2 в обратном потоке изотопнотяжелее, чем в прямом, свидетельствует тот факт, что углерод CO_2 среды во время фотосинтеза обогащается ^{13}C [4, 17, 33]. Это наблюдалось и в эксперименте, и в природной обстановке [30, 34].

Итак, фракционирование изотопов углерода в процессе ассимиляции CO_2 в C_3 -растениях, возможность существования которого, как показано в настоящей работе, вытекает из анализа модельных расчетов внутриклеточного фракционирования изотопов, связано с кинетическими изотопными эффектами в химических реакциях, контролирующей скорость ассимиляции CO_2 либо с неравновесным превращением HCO_3^- в CO_2 с участием карбоангидразы, либо с переходом молекулы CO_2 из свободного состояния в растворе в координированное состояние на РидФ-карбоксилазе. Нам представляется более правдоподобным второй механизм.

Окончательный выбор в пользу того или иного теоретически возможного механизма изотопного фракционирования при ассимиляции CO_2 может быть сделан на основе специальных исследований. Так, для выяснения вопроса, связано или нет изотопное фракционирование с неравновесной дегидратацией HCO_3^- , следует изучить *in vitro* зависимость изотопного эффекта карбоксилирования РидФ на карбоксилазе от наличия карбоангидразы, устанавливающей равновесие HCO_3^- (раствор) \rightleftharpoons CO_2 (газ).

Для выяснения другой возможной причины изотопных эффектов, связывающей их с неравновесным комплексобразованием CO_2 — кофактор — фермент на РидФ-карбоксилазе, необходимо более детальное изучение зависимости эффекта от комплексобразующей способности металлов-кофакторов, а также от условий эксперимента (рН, t° и др.), влияющих на контролируемую скорость стадию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бланк Т. Л. Исследование изотопных эффектов биогенных элементов. — Автореф. канд. дис. М., 1978. — 2. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики. М.: Наука, 1977. — 3. Бондарь В. А., Гоготова Т. Н., Зякун А. М. О фракционировании изотопов углерода фотоавтотрофными микроорганизмами с различными путями ассимиляции CO_2 . — Докл. АН СССР, 1976, т. 228, № 3, с. 720—722. — 4. Гоготова Г. И., Галимов Э. М., Иванов М. В. Фракционирование изотопов углерода в процессе роста *Ectothiorodospira shparshnikovii*. — Докл. АН СССР, 1973, т. 208, № 5, с. 722. — 5. Зякун А. М., Иванов М. В. Фракционирование стабильных изотопов микроорганизмами. — В сб.: Биохимия и физиология микроорганизмов. Пуцдино, ЦБИ. М.: Изд-во АН СССР, 1975, с. 31—57. — 6. Ивлев А. А. Вопросы теории фракционирования изотопов углерода в автотрофных организмах. — Успехи совр. биологии, 1976, т. 82, с. 84—104. — 7. Ивлев А. А. Фракционирование изотопов углерода в процессах жизнедеятельности организмов в разные фазы геологической истории Земли. — Журн. общей биологии, 1980, т. 41, № 6, с. 901—916. — 8. Ивлев А. А., Князев Д. А., Калашин А. Г. Анализ результатов расчета изотопных эффектов углерода в автотрофной клетке по модели с периодически затухающими колебаниями в гликолитической цепи. — Изв. ТСХА, 1983, вып. 3, с. 113—122. — 9. Ивлев А. А., Королева М. Я. Фракционирование изотопов углерода в процессах ассимиляции CO_2 и диссимилиации органических веществ в живых организмах. — *Studia biophysica*, 1982, vol. 88, p. 47—54. — 10. Князев Д. А., Ивлев А. А., Попов И. Б. Закономерности термодинамики изотопного обмена VI. Линейные и нелинейные молекулы XY_2 и октаэдрические молекулы XY_6 . — Журн. физич. химии, 1969, т. 43, с. 1269—1276. — 11. Коттон Ф., Уилкинсон Дж. Современная неорганическая химия, т. 1. М.: Мир, 1969, с. 138. — 12. Лайск А. Х. Кинетика фотосинтеза и фотодыхания C_3 -растений. М.: Наука, 1977. — 13. Меландер Л. Изотопные эффекты в скоростях реакций. М.: Мир, 1963. — 14. Рубин А. Б., Гавриленко В. Ф. Биохимия и физиология фотосинтеза. М.: Изд-во МГУ, 1977. — 15. Сивин С. Среднеквадратичные амплитуды колебаний молекул. М.: Мир, 1971. — 16. Станкевич И. В., Лысяк Т. В., Александров Г. Г., Каломников И. С. Основные физические свойства и структура двуокиси углерода и ее производных. — Журн. структ. химии, 1978, т. 19, № 5, с. 903—933. — 17. Abelson P. H., Hoering

- T. C.—Proc. Nat. Acad. Sci., 1961, vol. 47, p. 623—632.—18. Baertschi P.—Helv. Chim. Acta, 1953, Bd 36, H. 1, S. 773.—19. Behrens E. W., Frishman S. A.—J. Geology, 1971, vol. 79, p. 94—100.—20. Bender M. M., Roukham I., Vines H. M., Black C. C.—Plant Physiol., 1973, vol. 52, p. 427—430.—21. Christeller J. T., Laing W. A., Troughton J. H.—Plant Physiol., 1976, vol. 57, p. 580—586.—22. Cooper T. C., Filmer D. F., Wishnick M., Lane M. D.—J. Biol. Chem., 1969, vol. 244, p. 1081—1083.—23. Cooper T. C., Wood H. C.—J. Biol. Chem., 1971, vol. 246, p. 5488—5492.—24. Craig H.—Geochem. et Cosm. Acta, 1953, vol. 3, p. 53—92.—25. Deelans E., Lerman J. C., Nato A., Moyse A.—Proc. 3-rd Int. Congr. on Photosynthesis. Amsterdam: Elsv., 1974, p. 1267—1276.—26. Degens E. T., Behrendt M., Gotthardt B., Repmann E.—Deep Sea Res., 1968, vol. 15, p. 11—20.—27. Estep M. F., Tabita F. R., Parker P. L., Baalen Ch. V.—Plant Physiol., 1978, vol. 61, N 4, p. 680—687.—28. Fogel M. L.—Diss. Abs. Int., 1977, vol. 38, Sec. B, p. 1994—1996.—29. Hisutsune I. C., Bernitt D. L., Hartmann K. O.—J. Chem. Phys., 1965, vol. 42, p. 3553—3558.—30. Keeling Ch. D.—Geochem. et Cosm. Acta, 1961, vol. 24, N 3/4, p. 4—21.—31. Ludlow M. M., Troughton J. H., Jones R. J.—J. Agr. Sci., 1976, vol. 87, N 3, p. 632—652.—32. Park R., Epstein S.—Geochem. et Cosm. Acta, 1970, vol. 21, p. 110—119.—33. Park R., Epstein S.—Plant Physiol., 1961, vol. 36, N 2, p. 133—139.—34. Parker P. L.—Geochim. et Cosm. Acta, 1964, vol. 28, N 7, p. 564—570.—35. Reibach P. H., Benedict C. R.—Plant Physiol., 1977, vol. 59, N 4, p. 564—568.—36. Smith B. N., Epstein S.—Plant Physiol., 1971, vol. 47, p. 380—384.—37. Soudheimer E., Dence W. A., Mattick L. R., Silverman S. R.—Sci., 1966, vol. 152, p. 221—223.—38. Tieszen L. L., Senyemba M. M., Imbamba S. K., Troughton J. M.—Oecologia (Berl.), 1979, vol. 37, N 3, p. 337—350.—39. Troughton J. H., Card K. A.—Planta, 1975, vol. 123, p. 185—190.—40. Volpin M. E., Kolomnikov I. S.—Organometal reactions, 1974, vol. 5, p. 287—357.—41. Whelan I., Sackett W. M., Benedict C. R.—Plant Physiol., 1973, vol. 51, p. 1051—1054.—42. Winkler F. J., Kexel H., Kranz C., Schmidt H. L.—The 4-th Int. Conf. on Stable Isotopes, Julich, 1981, in: Book of Abstracts, Sess. 11.2. Life.—43. Wong W.—Diss. Abs. Int., 1977, Vol. 37, p. 5906.

Статья поступила 14 апреля 1982 г.

SUMMARY

Two possible reasons of carbon-13 isotope discrimination are disclosed by theoretical analysis of the mechanism of CO₂ assimilation during photosynthesis in C₃-plants.

The first reason is the kinetic isotope effect accompanying inequilibrium transformation of bicarbonate form dissolved in citoplasm into CO₂ form which is preferentially fixed by ribulosediphosphate carboxylase (RyDP-carboxylase). The value of the carbon isotope effect depends on the reaction rate, i. e. the isotope effect is a function of the activity and concentration of the enzymes, namely carboanhydrase and RyDP-carboxylase.

The second reason is the kinetic isotope effect accompanying the formation of CO₂ and RyDP-carboxylase complex. According to the suggestion the above reaction is to be rate limiting in CO₂ assimilation and the effect is dependent on the nature of metal cofactors.