

И. И. ЧЕРНЯДЬБЕВ, И. В. ТЕРЕХОВА, Н. Г. ДОМАН,  
О. Н. АЛЬБИЦКАЯ

## О ПУТЯХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕКИСЛОТЫ У СПИРУЛИНЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 26 VII 1974)

За последние годы резко возрос интерес к изучению биохимии синезеленых водорослей, что связано с попытками практического использования этих организмов. Особый интерес представляет изучение культуры *Spirulina platensis* как весьма перспективного продуцента белка. Для введения в промышленную культуру чрезвычайно важным является изучение процесса фотосинтеза, за счет которого осуществляется рост и развитие микроорганизмов. Однако данные о путях ассимиляции углерода в фотосинтезе у синезеленых водорослей очень отрывочны и были получены лишь на небольшом числе объектов. Изучение продуктов ассимиляции меченой углекислоты (<sup>1</sup>) и некоторых ферментов (<sup>2-5</sup>), выполненное главным образом на *Anacystis* и *Anabaena*, позволяет предполагать функционирование восстановительного пентозофосфатного цикла (<sup>6</sup>). Ключевым ферментом этого цикла является рибулозодифосфаткарбоксилаза (3-фосфо-*D*-глицерат карбокси-лиаза, димеризирующая, 4.1.1.39), осуществляющая карбоксилирование рибулозо-1,5-дифосфата (РиДФ). Что же касается спирулины, то для нее какие-либо данные о путях фотоассимиляции CO<sub>2</sub> или карбоксилирующих ферментов вообще отсутствуют.

В настоящей работе для общей характеристики путей фотосинтетической ассимиляции углекислоты у спирулины исследована активность РиДФ-карбоксилазы, карбоксилазы фосфоенолпирувата (ФЕП), «малик»-энзимов, пируваткарбоксилазы и некоторых других ферментов. Ввиду того, что синезеленые водоросли предпочитают щелочные условия среды (до pH 9 и даже 10), которые могут существенно влиять на интенсивность и пути ассимиляции CO<sub>2</sub>, выращивание клеток проводили при трех различных значениях pH в щелочной области: 8,5, 9,5 и 10,5.

Клетки спирулины выращивали на минеральной среде при освещенности примерно 8000 лк и температуре около 30°. В экспоненциальной фазе роста клетки отделяли от среды и получали гомогенат разрушением с помощью ультразвука на дезинтеграторе MSE-500 вт (20 килоциклов/сек). Необходимое время разрушения клеток определяли предварительно по выходу белка и удельной активности фермента. Надосадочную жидкость, полученную при центрифугировании гомогената при 20 000 *g* в течение 40 мин., использовали в качестве источника ферментов.

Определение активности карбоксилирующих ферментов проводили радиометрическим методом (<sup>7, 8</sup>) по скорости включения <sup>14</sup>C-углерода бикарбоната при 30° в 0,1 *M* трис-HCl-буфере, просчет радиоактивности, включившейся в кислотоустойчивые продукты реакции, проводили на сцинтиллаторе. Активность малатдегидрогеназ (<sup>9</sup>) и аспартат-аминотрансферазы (<sup>10</sup>) определяли спектрофотометрически по скорости окисления восстановленных форм НАД или НАДФ и соответственному уменьшению оптической плотности при 340 нм.

Ниже приводятся составы ферментных смесей (в мкмольях).

РиДФ-карбоксилаза: хлористый магний — 5, восстановленный глутатион — 5, бикарбонат натрия — 25, РиДФ — 0,5 (контроль без РиДФ), белок ферментного препарата — 0,1 мг, общий объем — 0,5 мл.

Суммарная активность рибозофосфатизомеразы, фосфорибулокиназы и РиДФ-карбоксилазы: состав тот же, но вместо РиДФ вводили рибозо-5-фосфат (P-5-Ф) — 10 и АТФ — 9 (контроль без P-5-Ф и АТФ), общий объем 0,5 мл.

Таблица 1

Влияние pH среды для выращивания клеток на активность ферментов у спиролины (мЕ/мг белка)

Фермент	pH 8,5	pH 9,5	pH 10,5
Риболозодифосфаткарбоксилаза	94,3	112,0	33,6
Комплекс: рибозофосфатизомеразы, фосфорибулокиназы, риболозодифосфаткарбоксилазы	13,6	16,5	5,4
НАДФ-«малик»-энзим	66,4	53,8	45,2
НАД-«малик»-энзим	44,4	36,1	33,8
Фосфопируваткарбоксилаза (4.1.1.31)	2,1	3,0	1,9
Аспарат-аминотрансфераза	8,0	7,5	4,1

ФЕП-карбоксилаза (4.1.1.31): хлористый магний — 2,5, восстановленный глутатион — 5, восстановленный НАД — 0,5, глутамат калия — 1, в ряде опытов добавляли экзогенную малатдегидрогеназу (МДГ), бикарбонат натрия — 10, ФЕП — 1,75 (контроль без ФЕП), белок — 0,5 мг, общий объем 0,5 мл. ФЕП-карбоксилаза (4.1.1.32): состав тот же (вместо хлористого магния хлористый марганец — 2,5), но с добавлением ГДФ — 0,5 (контроль без ГДФ). ФЕП-карбоксилаза (4.1.1.38): состав тот же, но с добавлением ортофосфата — 5 (контроль без ортофосфата).

Пируваткарбоксилаза: хлористый марганец — 5, восстановленный глутатион — 5, восстановленный НАД — 1, АТФ — 1, пируват — 20 (контроль без пирувата), меченый бикарбонат — 10, белок — 0,75 мг, общий объем 0,5 мл.

НАД-зависимый «малик»-энзим: состав тот же, но без АТФ. НАДФ-зависимый «малик»-энзим: то же, но вместо НАД вводили восстановленный НАДФ — 2, общий объем 0,5 мл.

МДГ: восстановленный НАД — 15 (или восстановленный НАДФ — 30), щавелевоуксусная кислота (ЩУК) — 2 (контроль без ЩУК), белок от 0,2 до 5 мг, общий объем 3 мл.

Аспарат-аминотрансфераза: L-аспарагиновая кислота — 6, восстановленный НАД — 50,  $\alpha$ -кетоглутарат — 20 (контроль без него), экзогенная МДГ, белок — 3 мг, общий объем 3 мл.

ФЕП-гидратаза (енолаза): состав тот же, что при определении ФЕП-карбоксилазы (4.1.1.31), но вместо ФЕП вносили 3-фосфоглицериновую кислоту (ФГК) — 5, общий объем 0,5 мл. Для ингибирования фермента добавляли фтористый натрий — 5.

Прежде всего, была определена активность РиДФ-карбоксилазы (табл. 1). Оказалось, что независимо от pH среды выращиваемых клеток pH-оптимум этого фермента у спиролины равен 8,0.

Кроме того, во всех трех вариантах обнаружена фиксация меченого бикарбоната в присутствии P-5-Ф и АТФ, что может свидетельствовать о функционировании последовательно трех ферментов восстановительного пентозофосфатного цикла: рибозофосфатизомеразы (D-рибозо-5-фосфат-кетол-изомеразы, 5.3.1.6), фосфорибулокиназы (АТФ: D-рибозо-5-фосфат-1-фосфотрансфераза, 2.7.1.19) и РиДФ-карбоксилазы.

У клеток, выращенных при рН 8,5 и 9,5 активность этих ферментов оказалась близкими величинами, а при рН 10,5 была в 2,5—3,5 раза меньше.

Следует отметить, что как и у исследованных нами фототрофных бактерий *Rhodospirillum rubrum* и *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* у одного и того же ферментного препарата скорость фиксации на Р-5-Ф и АТФ была значительно ниже, чем на РидФ. Наибольшая активность наблюдалась при 20 мМ Р-5-Ф и 18 мМ АТФ. Это довольно высокая используемая концентрация АТФ <sup>(11)</sup>. Однако, например, при 16 мМ Р-5-Ф и 9 мМ АТФ удалось получить лишь около 45% активности.

У исследуемого организма карбоксилирование ФЕП осуществляется ФЕП-карбоксилазой (ортофосфат: оксалоацетат-карбокси-лиаза, фосфорилирующая, 4.1.1.31). Как и в случае РидФ-карбоксилазы, максимальная активность фермента не зависела от рН среды для выращивания клеток, во всех трех вариантах она оказалась равной 8,2. Удельная активность ФЕП-карбоксилазы (4.1.1.31) при наших условиях выращивания была невысокой и примерно равной во всех вариантах. Активность ФЕП-карбоксилаз (4.1.1.32 или 4.1.1.38) обнаружить не удалось при рН ферментной смеси от 6,0 до 8,5.

Активность ФЕП-карбоксилазы (4.1.1.31) при выращивании клеток спирулины в фотоавтотрофных условиях тесно связана с карбоксилированием РидФ, о чем говорят результаты наших опытов по фиксации <sup>14</sup>С-бикарбоната в присутствии ФГК. При использовании 10 мМ NaF — ингибитора ФЕП-гидратазы (4.2.1.11), катализирующей превращение ФГК в ФЕП, включение меченого бикарбоната ингибировалось почти на 90%.

При карбоксилировании ФЕП образуется ЦУК. Каковы возможности ее дальнейшего превращения? Если в ферментную смесь для определения ФЕП-карбоксилазы без экзогенной МДГ добавить восстановленный НАД или глутамат калия, то мы получаем соответственно около 20 или 80% от максимальной скорости реакции, наблюдаемой при введении обоих компонентов, что может свидетельствовать о слабой активности НАД-зависимой МДГ и значительно большей активности аспартат-аминотрансферазы. Однако при спектрофотометрических определениях нам не удалось обнаружить ни НАД-зависимой МДГ (*L*-малат: НАД-оксидоредуктаза 1.1.1.37), ни НАДФ-зависимой МДГ (шифра по номенклатуре ферментов не имеет) при рН от 6,5 до 9,5. Следовательно, превращение ЦУК в малат или не происходит или осуществляется чрезвычайно медленно, что говорит о слабой замкнутости цикла трикарболовых кислот на этом участке. Активность аспартат-аминотрансферазы (*L*-аспартат: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза, 2.6.1.1.) обнаружена нами во всех трех вариантах.

Интенсивное образование яблочной кислоты осуществляется у спирулины с помощью «малик»-энзимов (*L*-малат: НАД-оксидоредуктазы декарбоксилирующие, 1.1.1.38 и 1.1.1.40), активность которых сопоставима с активностью РидФ-карбоксилазы. Вероятно, это два различных энзима, подобно обнаруженным у некоторых бактерий <sup>(12)</sup>. НАД- и НАДФ-зависимые ферменты активировались ионами марганца и, значительно слабее, магния, и несколько различались по оптимуму рН: 7,8 для НАД- и 7,5 для НАДФ-«малик»-энзима. Но и для этих ферментов рН-оптимум не зависел от варианта выращиваемых клеток.

Таким образом, карбоксилирование РидФ с помощью РидФ-карбоксилазы и, возможно, другие реакции восстановительного пентозофосфатного цикла являются главным, но не единственным путем ассимиляции углерода в фотосинтезе спирулины. Активность «малик»-энзимов вполне сопоставима при наших условиях роста с активностью РидФ-карбоксилазы и значительно превышает активность трех взаимосвязанных ферментов восстановительного пентозофосфатного цикла, определяемых по реакциям с Р-5-Ф и АТФ. Это имеет принципиальное значение, т.к. показывает возможность альтернативных путей ассимиляции углекислоты.

Представляют большой интерес данные по скорости усвоения углекислоты целыми клетками и приросту биомассы спирулины, которые в наших опытах коррелируют с активностью карбоксилирующих ферментов в зависимости от рН среды.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
23 VII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> O. Kandler, Naturwiss., В. 48, 604 (1961). <sup>2</sup> J. Richter, Naturwiss., В. 46, 604 (1959). <sup>3</sup> Y. M. Willard, M. Schulman, M. Gibbs, Nature, v. 206, 195 (1965). <sup>4</sup> J. Pearce, N. G. Carr, J. Gen. Microbiol., v. 54, 451 (1969). <sup>5</sup> T. Batt, D. H. Brown, Planta, v. 116, 197 (1974). <sup>6</sup> М. Кальвин, Дж. Бассем, Докл. междунаро. конфер. по мирному исп. атомной энергии, М., 1955, стр. 616. <sup>7</sup> А. К. Романова, И. Я. Веденина и др., Биохимия, т. 36, 408 (1971). <sup>8</sup> И. И. Чернядьев, В. Э. Успенская, Н. Г. Доман, Биохимия, т. 37, 948 (1972). <sup>9</sup> И. И. Чернядьев, Н. Г. Доман, Биохимия, т. 35, 968 (1970). <sup>10</sup> W. Splittstoesser, Plant Cell Physiol., v. 11, 579 (1970). <sup>11</sup> А. К. Романова, И. Я. Веденина, ДАН, т. 211, 241 (1973). <sup>12</sup> J. Eyzaguirre, E. Cornwell et al., J. Bacteriol., v. 116, 215 (1973).