

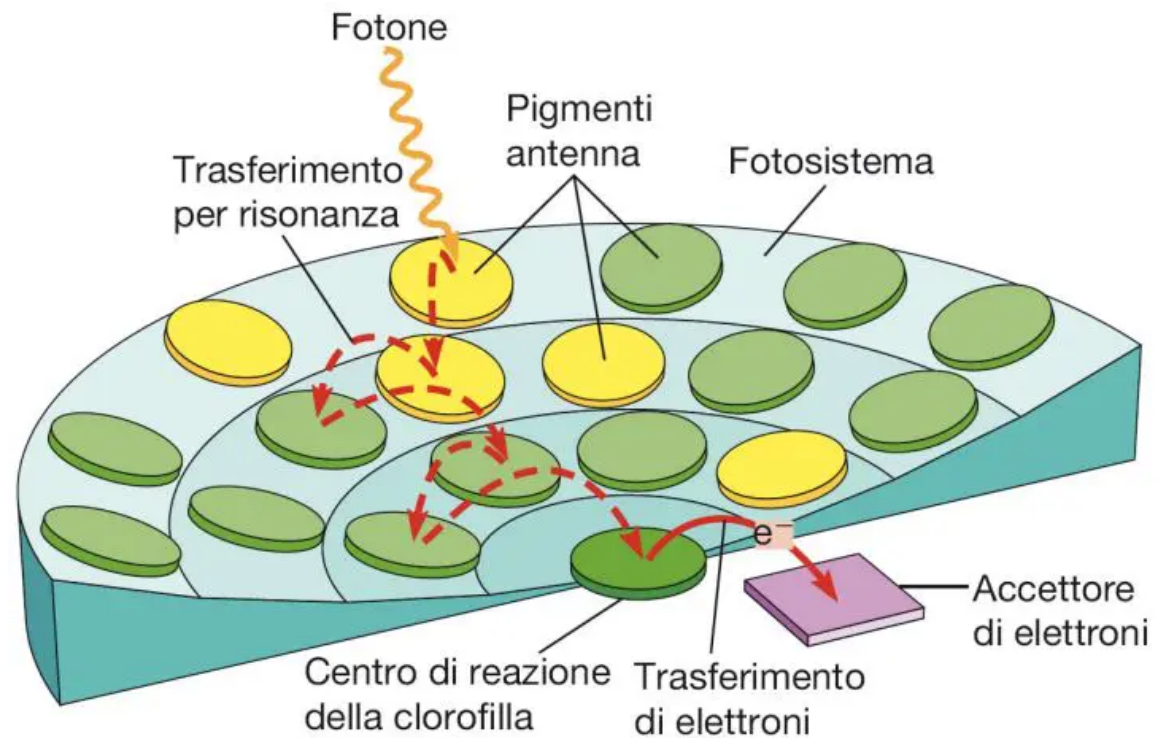


FOTOSINTESI



Complesso antenna: reprise :-)





Le molecole di **clorofilla** e di altri pigmenti che costituiscono il **complesso antenna** assorbono fotoni a lunghezze d'onda specifiche.

Quando un pigmento assorbe un fotone, un **eletttrone** in quella molecola viene promosso da uno stato elettronico fondamentale a uno **stato eccitato singoletto**.

L'energia dell'eccitazione non è stabile: deve essere trasferita altrove per non andare persa in forma di calore.

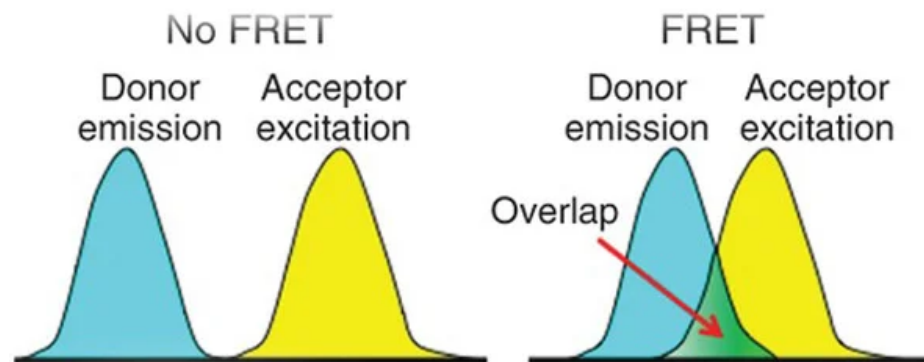
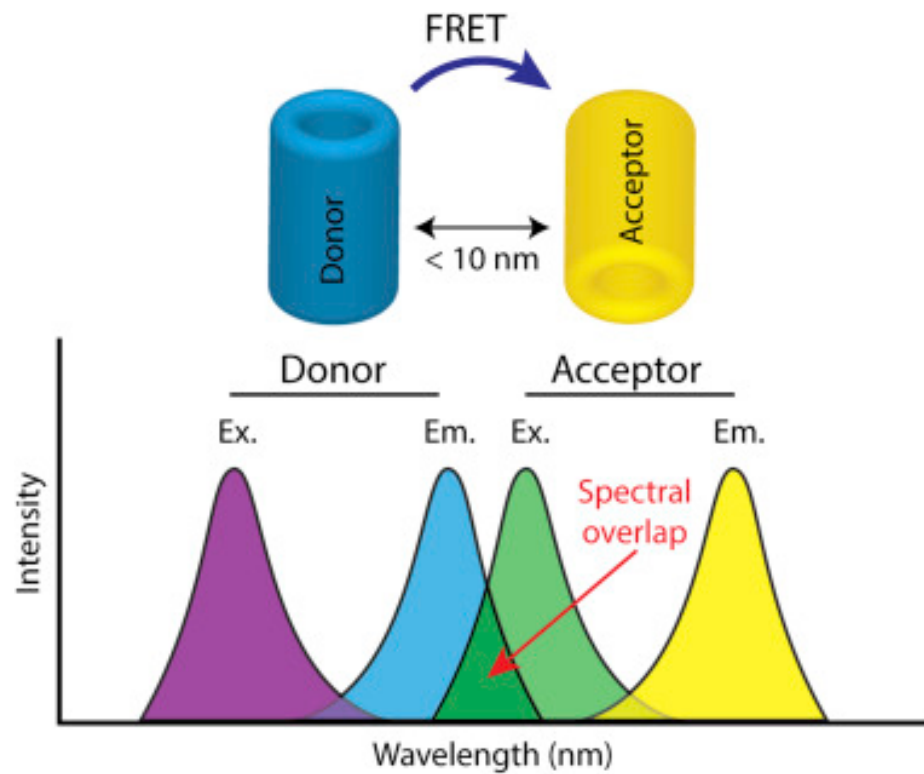




Il processo non avviene con il trasferimento diretto di elettroni tra pigmenti antenna, ma attraverso un **meccanismo di risonanza elettromagnetica (Fluorescence Resonance Energy Transfer - FRET)** o **trasferimento di eccitazione per risonanza**.

- **Come funziona:**
 - Una molecola eccitata genera un **campo elettromagnetico oscillante** (dipolo di transizione).
 - Se nelle vicinanze ($< 2\text{--}10\text{ nm}$) c'è un altro pigmento le cui bande di assorbimento coincidono con l'energia dell'eccitazione, l'energia può “saltare” dal primo pigmento al secondo per accoppiamento dipolo–dipolo.
- **Condizione di risonanza:** La transizione elettronica della molecola donatrice deve avere un'energia molto vicina (in risonanza) a quella della molecola accettrice.
- **Perdita graduale di energia:** Ad ogni trasferimento, l'energia tende ad abbassarsi leggermente (shift verso lunghezze d'onda più lunghe, “**red shift**”), finché si raggiunge il centro di reazione.







Le proteine del complesso antenna non sono disposte a caso: creano una **rete spaziale organizzata** di pigmenti, con energie elettroniche leggermente decrescenti verso il centro di reazione.

Questo genera un “**imbuto energetico**” (energy funnel) che guida l’eccitazione, minimizzando la dispersione.

L’energia arriva infine allo **special pair di clorofille** (**P680** nel **Fotosistema II**, **P700** nel **Fotosistema I**).

Queste clorofille speciali hanno la capacità, per eccitazione elettrostatica, di “perdere” un elettrone, che viene effettivamente trasferito a un **accettore primario**.

Da qui parte la vera catena di trasporto degli elettroni della fotosintesi.





Riassunto del meccanismo

- Il fotone **non viaggia fisicamente da una molecola all'altra**.
- L'energia è trasmessa attraverso una **serie di oscillazioni coerenti dei dipoli elettronici**, un po' come onde che passano da un diapason vibrante a un altro vicino.
- Questo meccanismo di **trasferimento per risonanza di eccitazione** è estremamente efficiente (fino al **95–99%** di rendimento).





Che peccato!

**Le cose, purtroppo, non
sono veramente così.
O almeno, non solo...**





Negli ultimi 15 anni (a partire dal 2007 circa), usando tecniche di **spettroscopia 2D ultrarapida** sui complessi antenna (ad esempio il **FMO complex** dei batteri verdi solforosi), è emerso un fenomeno sorprendente:

- Dopo l'assorbimento di un fotone, l'eccitazione **non resta localizzata su un singolo pigmento**, ma si distribuisce **coerentemente** su più molecole contemporaneamente.
- Si formano stati quantistici “delocalizzati”, cioè **superposizioni coerenti** di eccitazione tra più pigmenti.

In altre parole, invece di pensare a un'energia che “salta” come una pallina da una molecola all'altra, bisogna immaginarla come un'**onda quantistica** che si propaga su tutta la rete di pigmenti.





Questa propagazione ondulatoria ha conseguenze importanti:

- **Ricerca parallela dei cammini energetici:**
L'onda quantistica esplora simultaneamente più percorsi nella rete pigmentaria. L'energia non prova una strada alla volta, ma “tutte insieme”.
- **Selezione del percorso ottimale:**
L'interferenza quantistica favorisce i cammini più efficienti verso il centro di reazione, scartando quelli meno favorevoli.
- **Robustezza al rumore termico:**
In modo controintuitivo, l'interazione con le vibrazioni molecolari (il rumore dell'ambiente) non distrugge ma può addirittura **stabilizzare la coerenza**, aiutando l'energia a mantenersi in uno stato delocalizzato abbastanza a lungo per raggiungere il centro di reazione.





Oggi si pensa che nei complessi antenna agiscano **entrambi i meccanismi**:

- **FRET classico**, utile per spiegare i trasferimenti più locali e a lungo raggio.
- **Coerenza quantistica**, che permette una **ricerca veloce e parallela dei cammini energetici**, aumentando l'efficienza complessiva.

In sintesi: la fotosintesi sembra sfruttare principi della **meccanica quantistica applicati a sistemi biologici**, per massimizzare la raccolta e il trasferimento dell'energia solare.





Queste ricerche hanno interessanti sviluppi applicativi...

La fotosintesi ha mostrato che la natura sfrutta coerenze quantistiche e accoppiamenti vibrazionali per dirigere l'energia in modo estremamente efficiente.

Diversi gruppi di ricerca stanno tentando di trasporre quei principi in materiali artificiali (organici, ibridi, plasmonici e polaritonici) per migliorare l'assorbimento, il trasporto e l'estrazione dell'energia nelle celle solari.

I progressi sono promettenti ma si scontrano con sfide pratiche di decoerenza, stabilità e dimostrazione di benefici energetici reali su scala tecnologica.





Evoluzione della fotosintesi





La terra si è formata circa 4,5 miliardi di anni fa.

Nei primi 500 milioni di anni circa, è stata bombardata da sciame meteorici, che hanno reso la sua superficie troppo tormentata (e calda) per ospitare la vita.

Tuttavia, queste hanno probabilmente portato sul pianeta:

- i) materia organica di origine extraterrestre
- ii) acqua
- iii) azoto molecolare.

Questo “bombardamento a tappeto” cessò probabilmente circa 4 miliardi di anni fa. Gli esperti sono abbastanza concordi nel credere che le prime forme di vita si siano quindi sviluppate circa 3,8 miliardi di anni fa.

Le condizioni sul pianeta, a questo stadio del suo sviluppo erano le seguenti: ossigeno quasi assente dall'atmosfera (ca. 0,001%, contro circa il 21% attuale); altissime concentrazioni di anidride carbonica, con conseguente effetto serra. La convinzione che vi fosse anche molto metano sembra oggi non essere più supportata dai ricercatori.



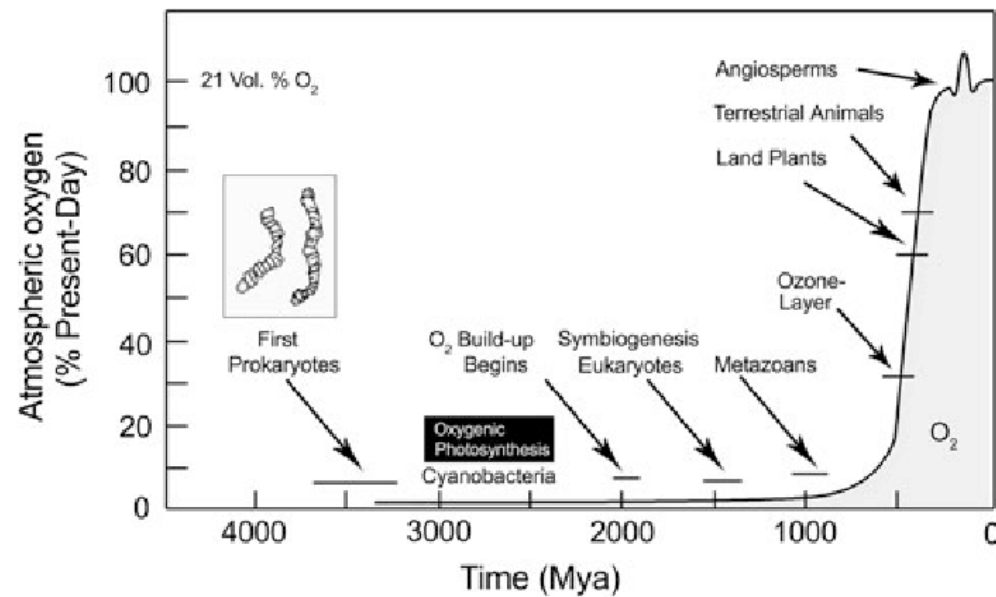
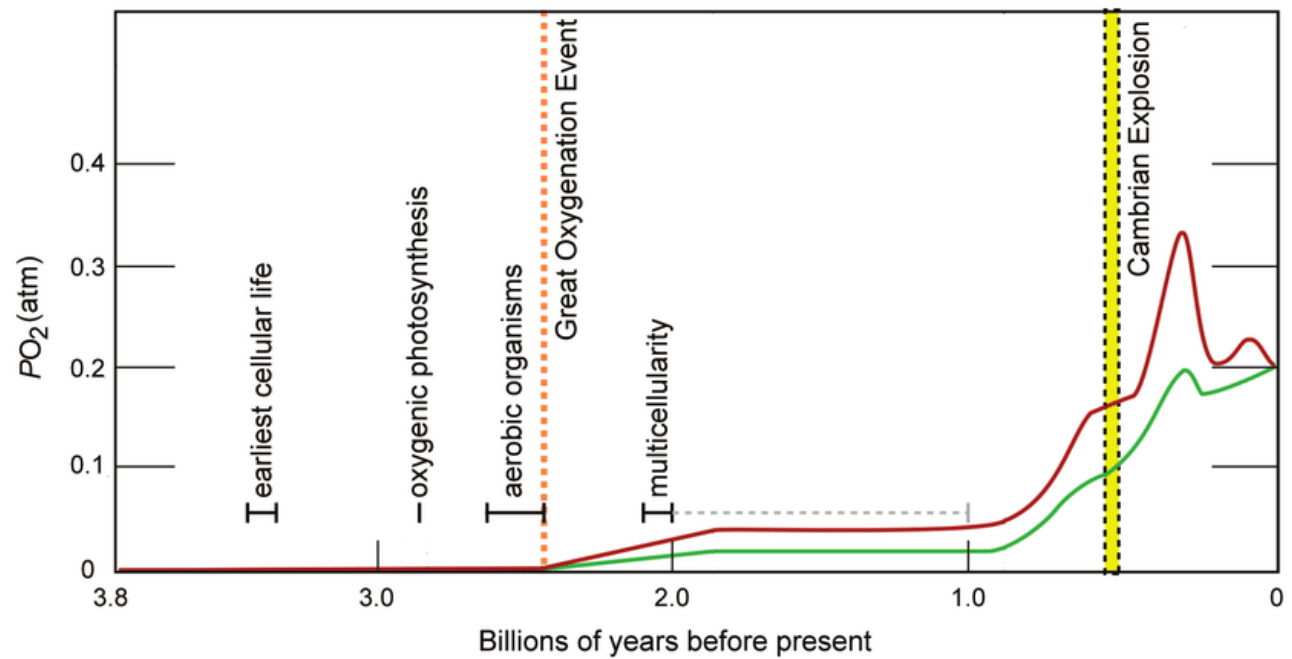


L'effetto serra garantito dalle alte concentrazioni di anidride carbonica in questa fase della vita del pianeta fu probabilmente molto importante, visto che il sole era nei suoi primi stadi di sviluppo, e emetteva un quantitativo di energia che doveva essere circa 80% di quello attuale.

Le prime evidenze di fotosintesi vengono oggi fatte risalire a circa 3,6 miliardi di anni fa. Tuttavia, la fotosintesi ossigenica, ovvero quella che prevede la rottura di acqua e la liberazione di ossigeno, viene fatta risalire a tempi più recenti, circa 2,8-3 miliardi di anni fa, con la comparsa di alcuni primitivi cianobatteri.

Di conseguenza, una massiccia immissione di ossigeno in atmosfera non è iniziata probabilmente prima di 3 miliardi di anni fa. Inoltre, a causa della grande quantità di gas e altri materiali riducenti sul pianeta, il livello di ossigeno iniziò a crescere molto lentamente all'inizio, tanto che si stima che rimase circa a 1% nell'atmosfera fino a 1 miliardo di anni fa.



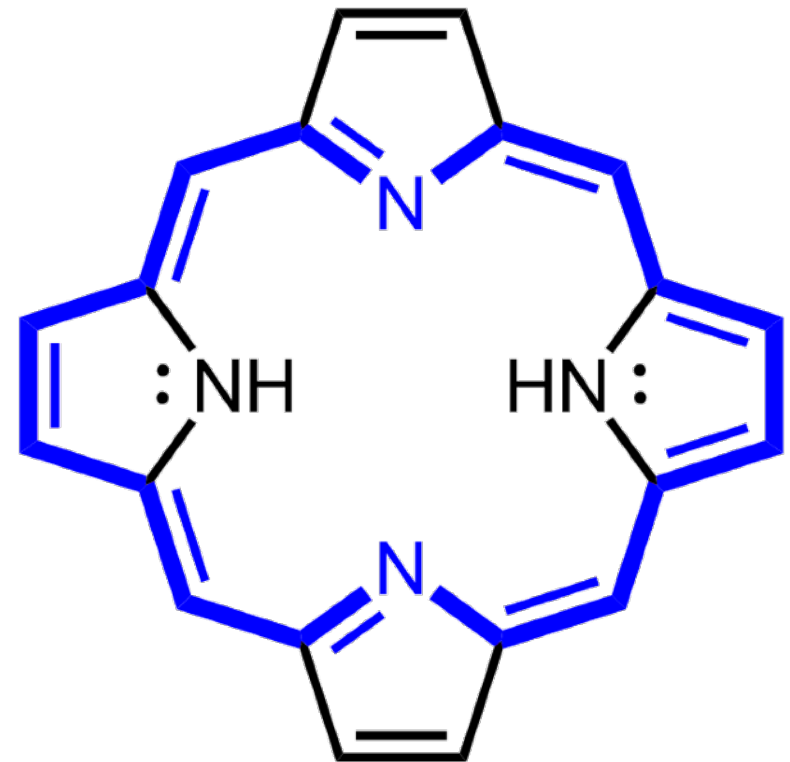




La comparsa dei primi eucarioti fotosintetici viene fatta risalire a circa 2-1,8 miliardi di anni fa.

L'evoluzione dei primissimi batteri fotosintetici sembra sia dovuta in particolare a molecole quali porfirinogeni e porfirine.

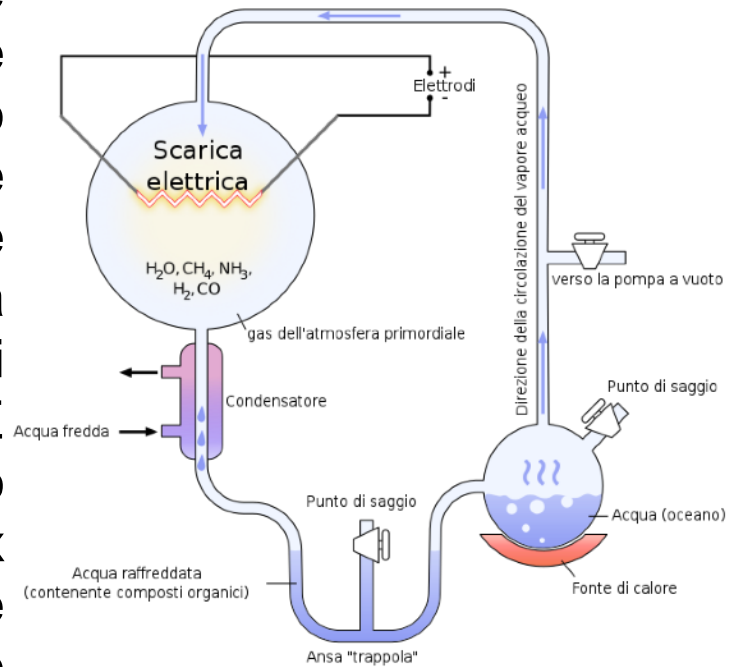
I porfirinogeni sono composti che si trovano in natura, e che erano prodotti in quantità probabilmente nei primi stadi di evoluzione del pianeta. Essi sono i precursori delle porfirine, che a loro volta sono la base per la costruzione di diverse molecole organiche quali citocromi, eme, clorofille, vitamina B, etc.





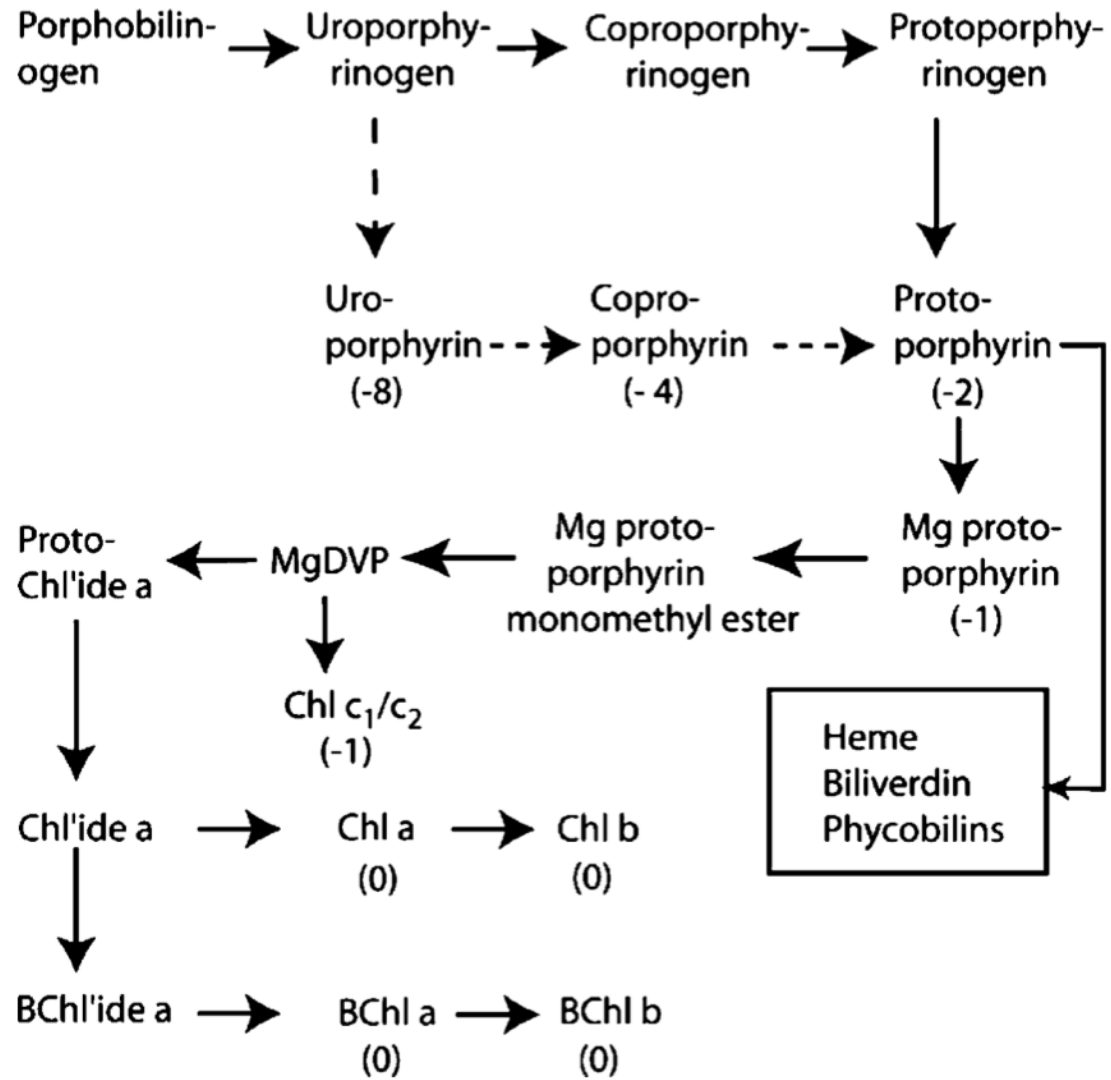
Le porfirine sono colorate, e hanno un picco principale di assorbimento nel violetto (400-410 nm), e altri 4 caratteristici picchi minori nel verde.

Siccome porfirine furono prodotte nell'esperimento di Urey e Miller, negli anni 50, è facile immaginare che queste molecole fossero abbondanti nel brodo primordiale del pianeta, e che quindi fossero le prime molecole capaci di assorbire la luce a essere usate da alcuni primitivi organismi fotosintetizzanti. È stato suggerito che un primo meccanismo di pompa redox alimentata dalla luce fosse capace di generare un gradiente protonico ossidando composti organici e riducendo ioni ferrici (Fe^{3+}).



esperimento di Urey e Miller

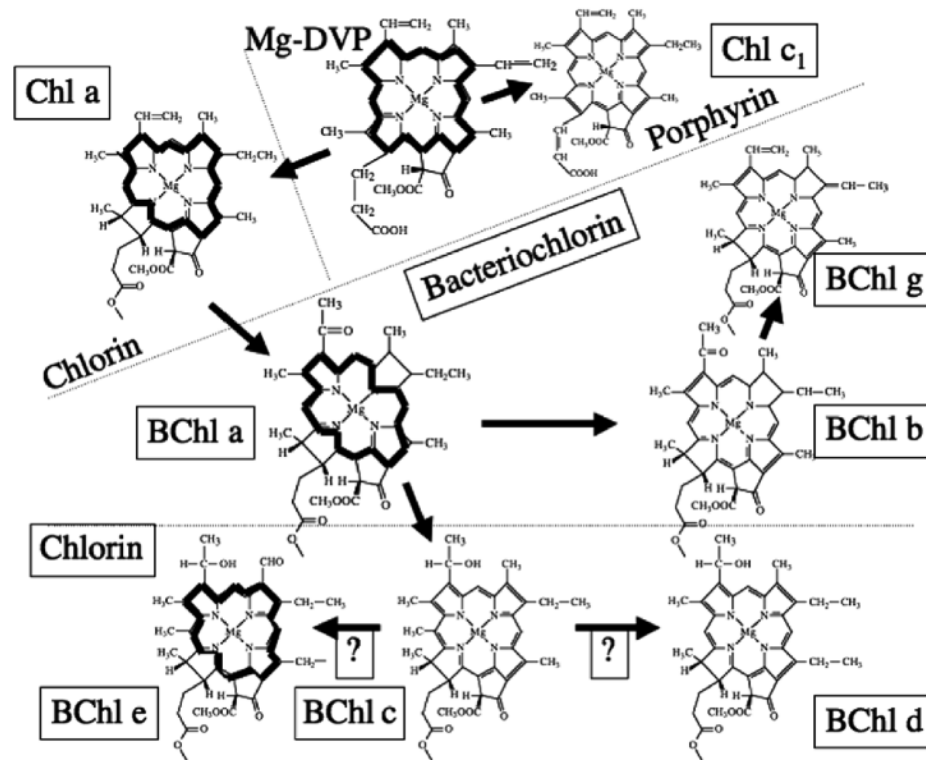






I primi pigmenti fotosintetici “moderni” furono probabilmente delle porfirine chelanti magnesio (Mg^{2+}), che portò a un notevole aumento della loro efficienza.

Sembra ora possibile che da queste molecole si siano originate prima le clorofille c che la clorofilla (Chl) a e b, e le batterioclorofille (BChl). Esistono tuttavia diverse contrastanti ipotesi su quale forma di clorofille si sia evoluta prima.





Da questo punto in poi l'evoluzione dei pigmenti fotosintetici diviene ancor più incerta.

Anche la relativa certezza del ruolo fondamentale della Chl a in entrambi i fotosistemi, ove si credeva fosse l'unica clorofilla a formare lo "*special pair*", è stata recentemente messa in dubbio dalla scoperta della Chl d (P740), che invece forma come omodimero lo *special pair* nel fotosistema I, e probabilmente come eterodimero con la clorofilla a nel fotosistema II del cianobatterio *Acaryochloris marina*.

Questa scoperta è stata in un certo senso rivoluzionaria, perché ha dimostrato non solo che il ruolo esclusivo della Chl a non è tale, ma che anche radiazioni nel rosso lontano sembrano contenere fotoni con energia sufficiente ad attivare il processo fotosintetico.

L'adattamento che ha portato alla selezione di organismi con clorofilla d da un indubbio vantaggio in ambienti dove la luce disponibile è quella già filtrata da altri organismi fotosintetizzanti con clorofilla a.

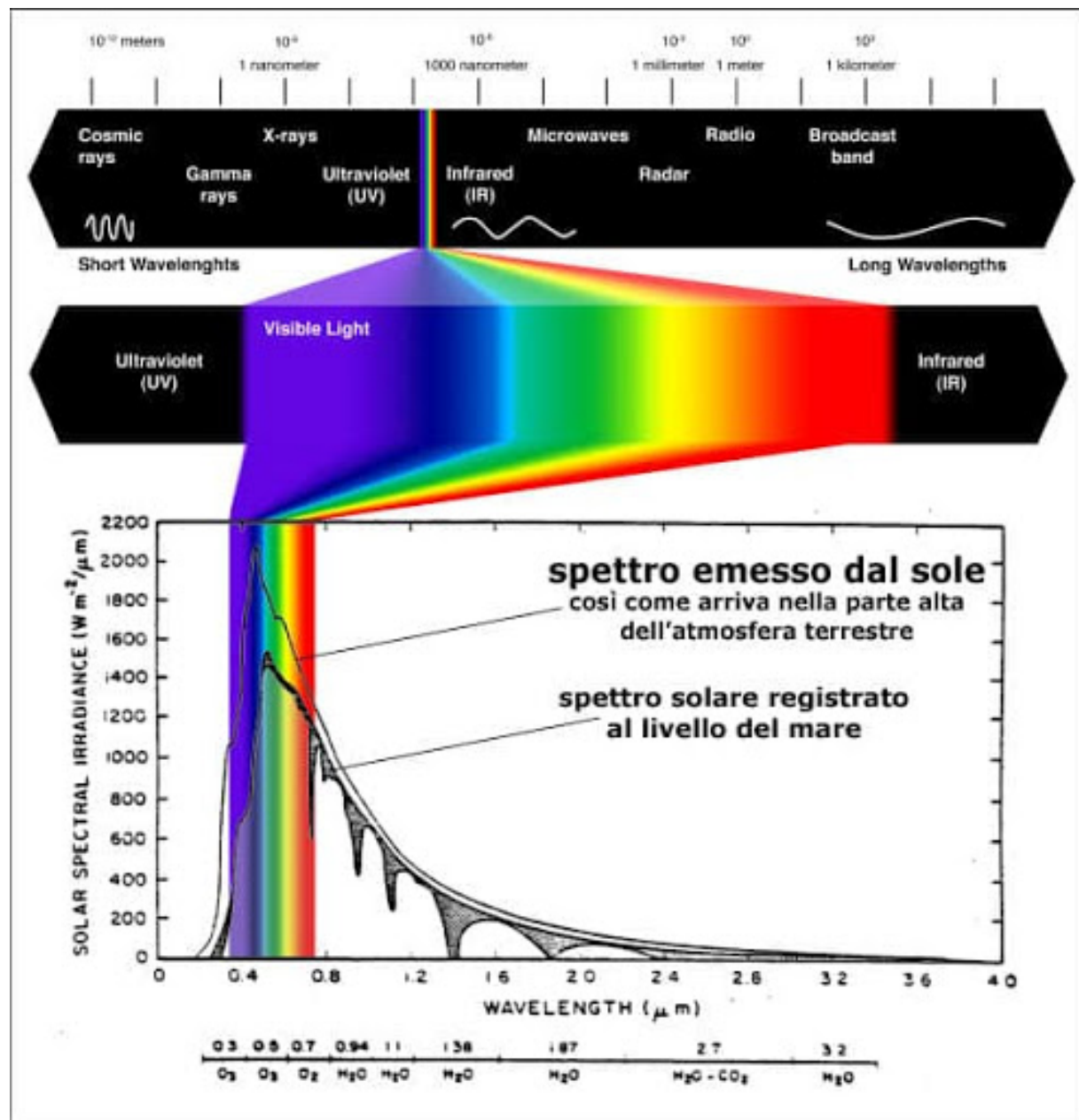


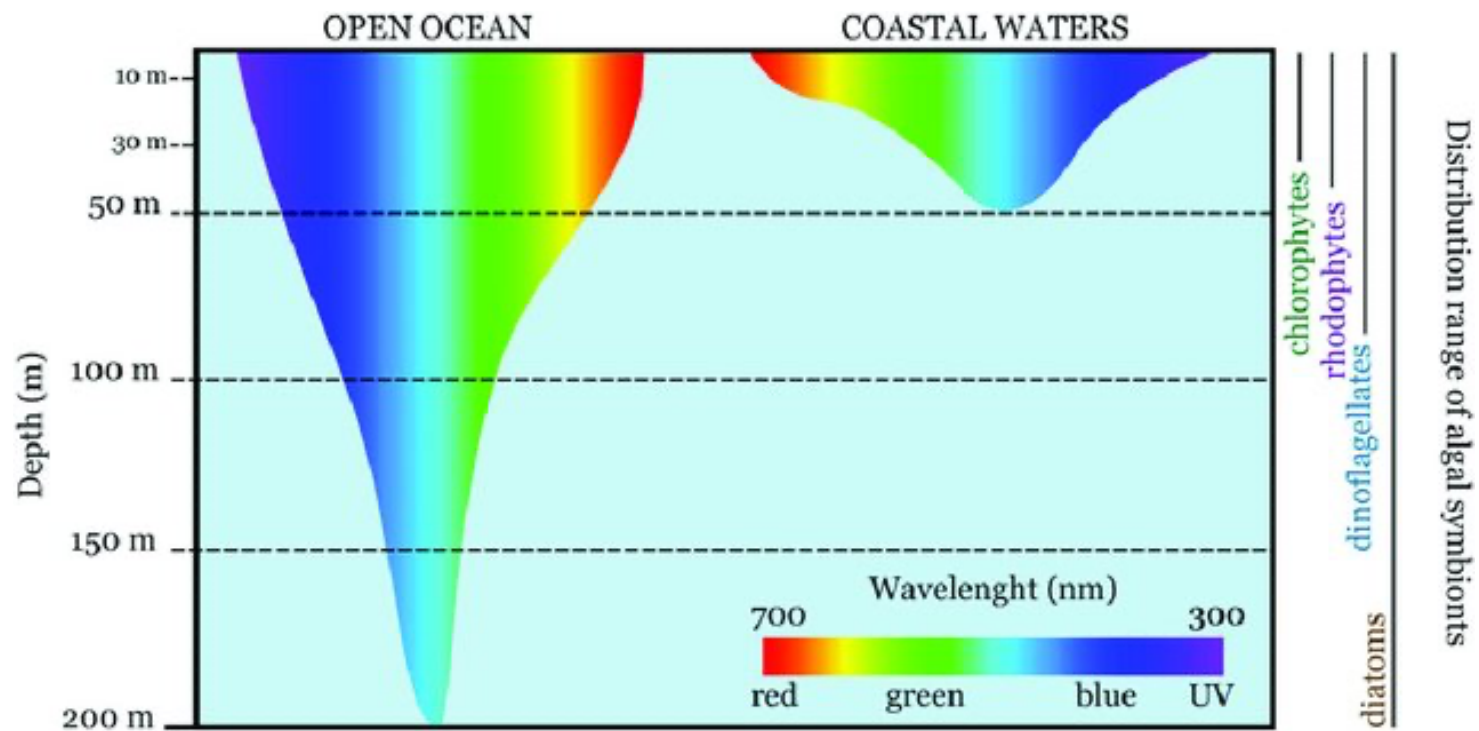


Perché queste lunghezze d'onda?

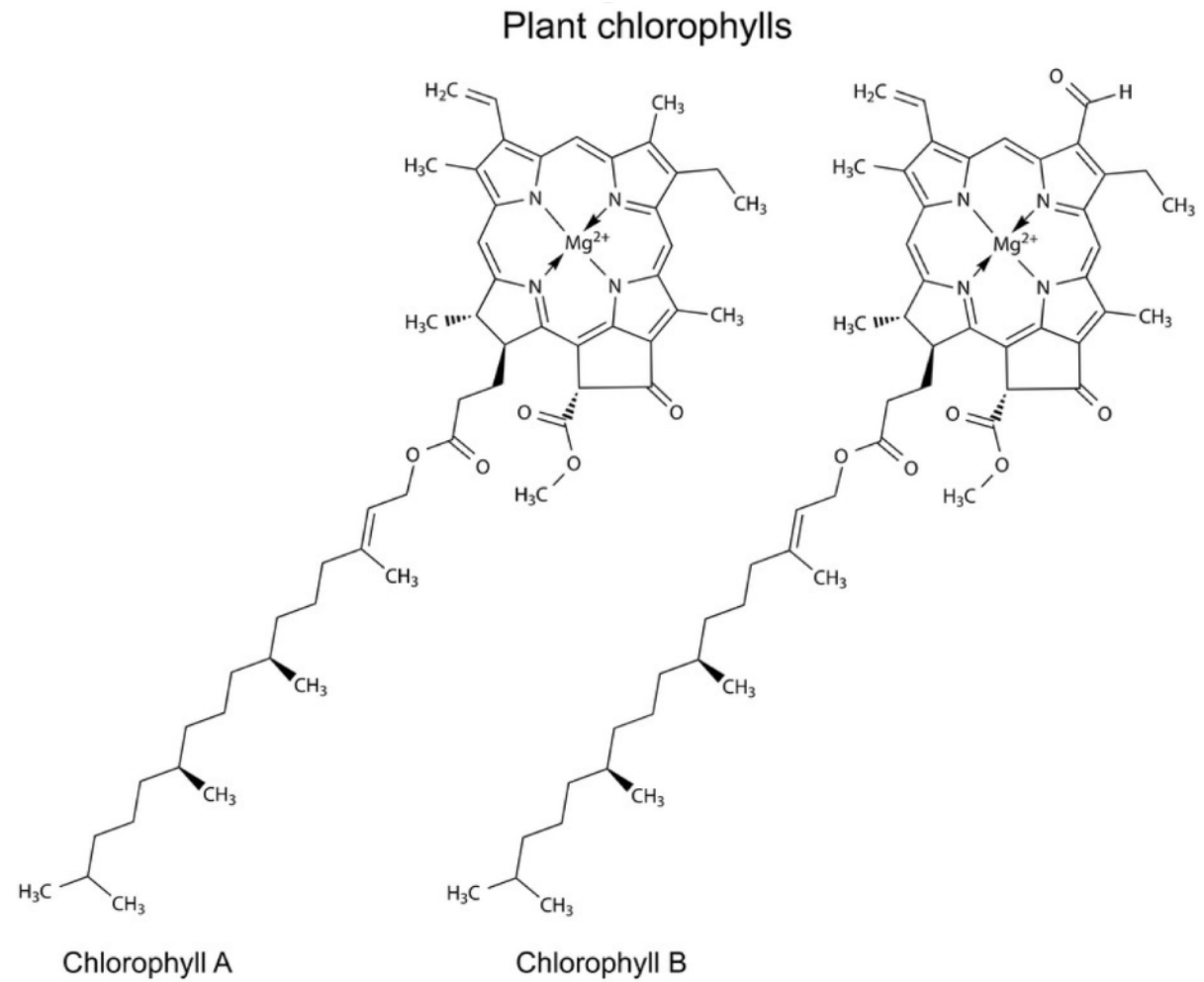
Perché la fotosintesi si è evoluta per sfruttare proprio queste, e non altre, magari più ricche di energia?





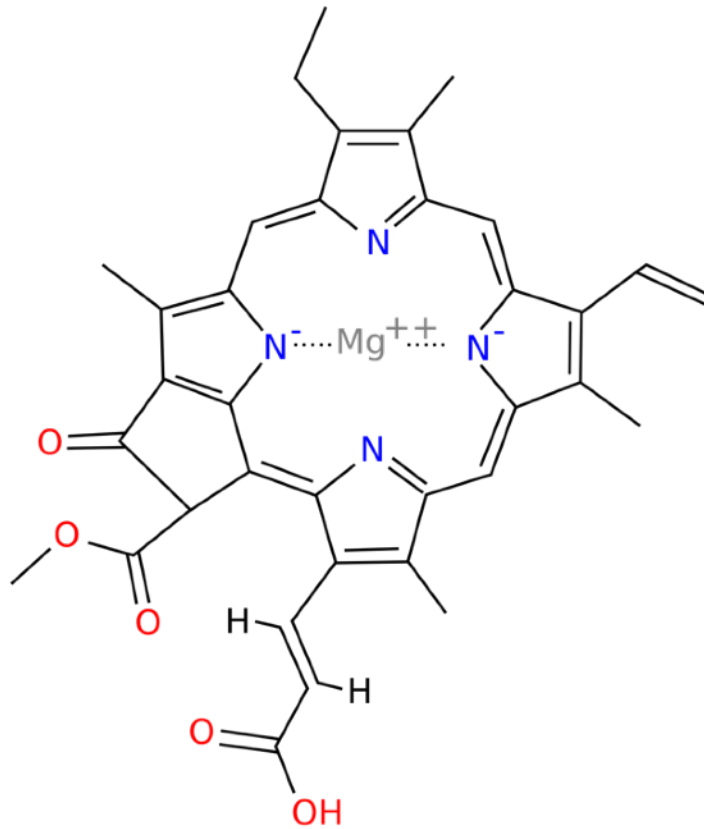


Tuttavia, come detto, non esiste solo la clorofilla a....

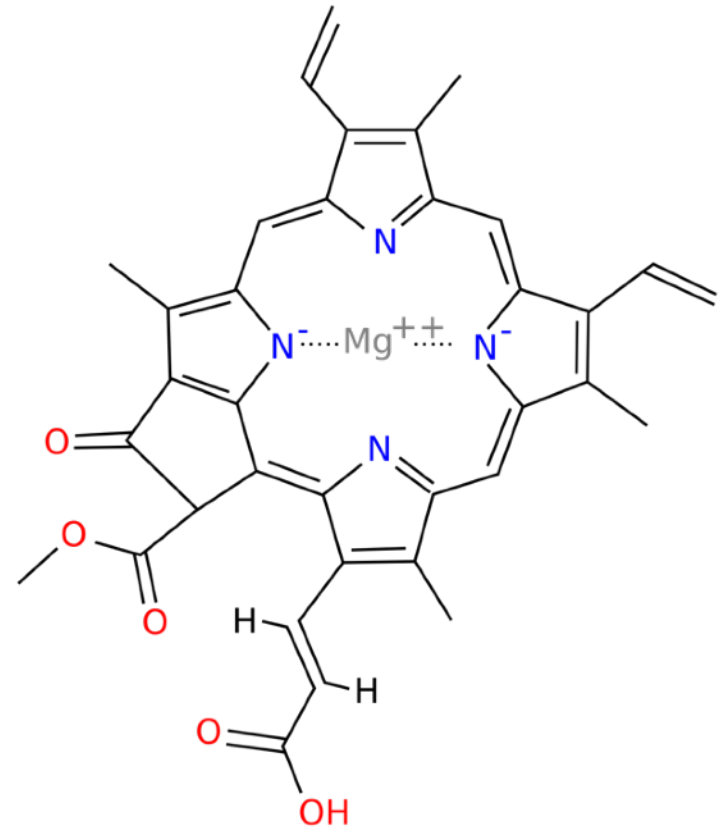


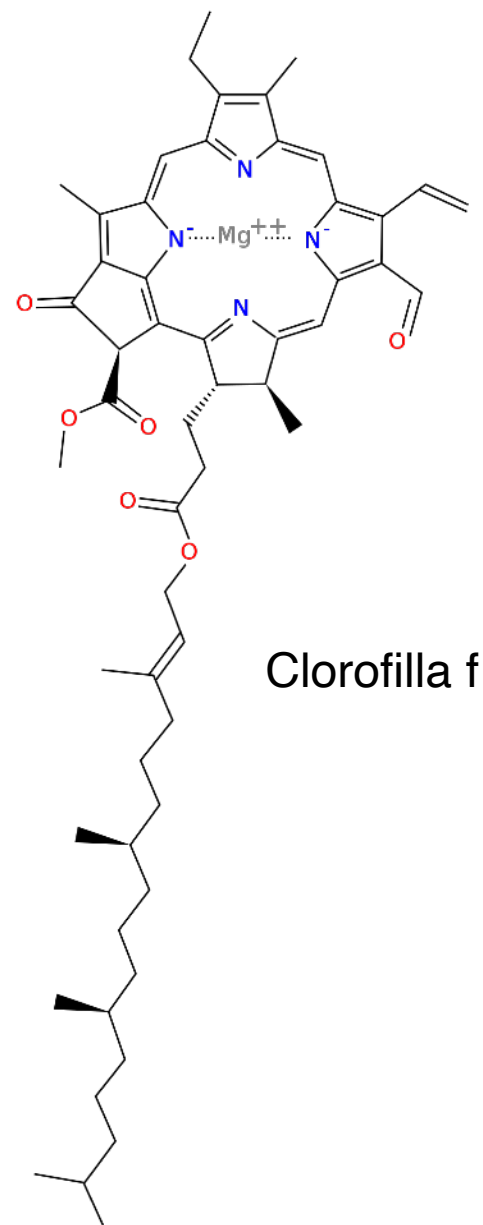
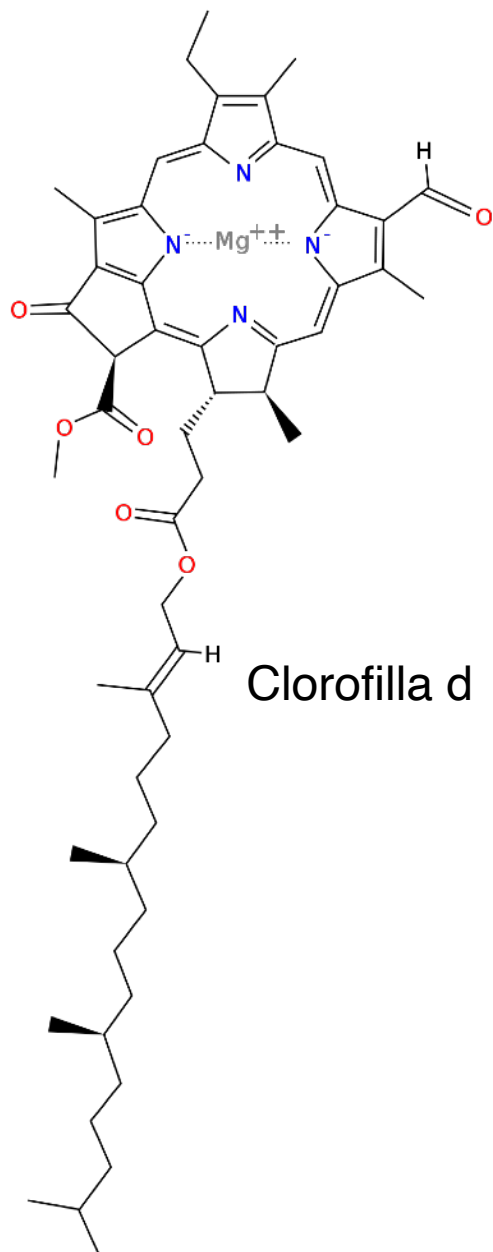


Clorofilla c1



Clorofilla c2







La clorofilla a è universale, presente in tutti gli organismi fotosintetizzanti. Le altre invece sono limitate a alcuni gruppi di organismi. La clorofilla b è presente principalmente nelle piante, mentre le c sono presenti nelle alghe. Le clorofille d e f sono presenti solo nei cianobatteri.

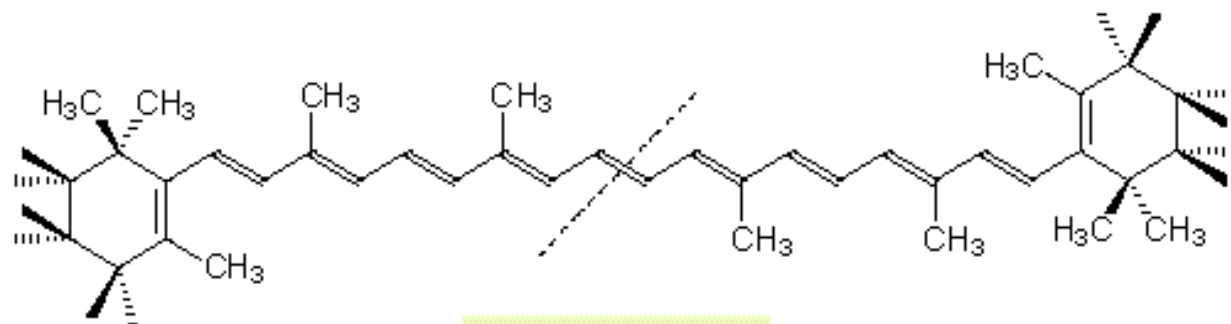
Lo special pair del centro di reazione è normalmente composto da una coppia di molecole di clorofilla a, tranne in alcuni casi come il già citato cianobatterio *Acaryochloris marina*.

Oltre alle clorofille, ci sono poi altri pigmenti accessori, che sono i carotenoidi e le ficobiline. Questi hanno il ruolo aiutare le clorofille a intercettare diverse lunghezze d'onda, ampliando il range di assorbimento dei sistemi antenna dei fotosistemi.

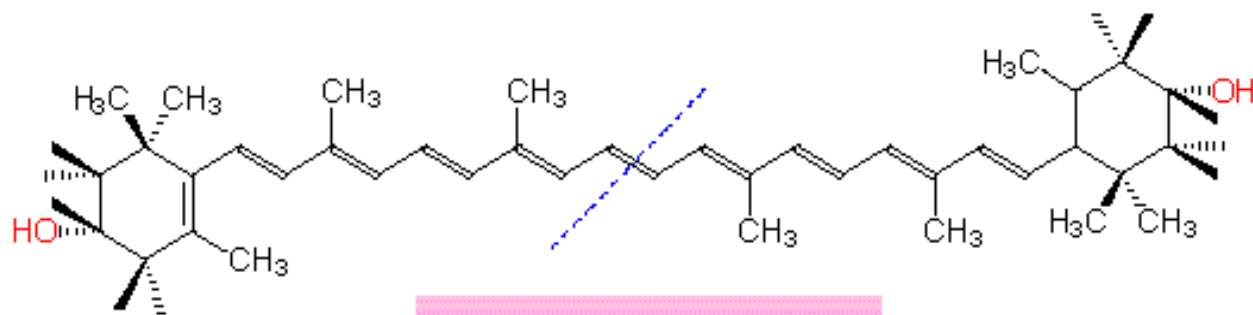
I carotenoidi hanno però anche un ruolo fondamentale nel prevenire danni fotossidativi alle molecole di clorofilla.

Nei cloroplasti sono presenti normalmente due tipi di carotenoidi: i caroteni e le xantofille.





β - carotene



lutein (xanthophyll)

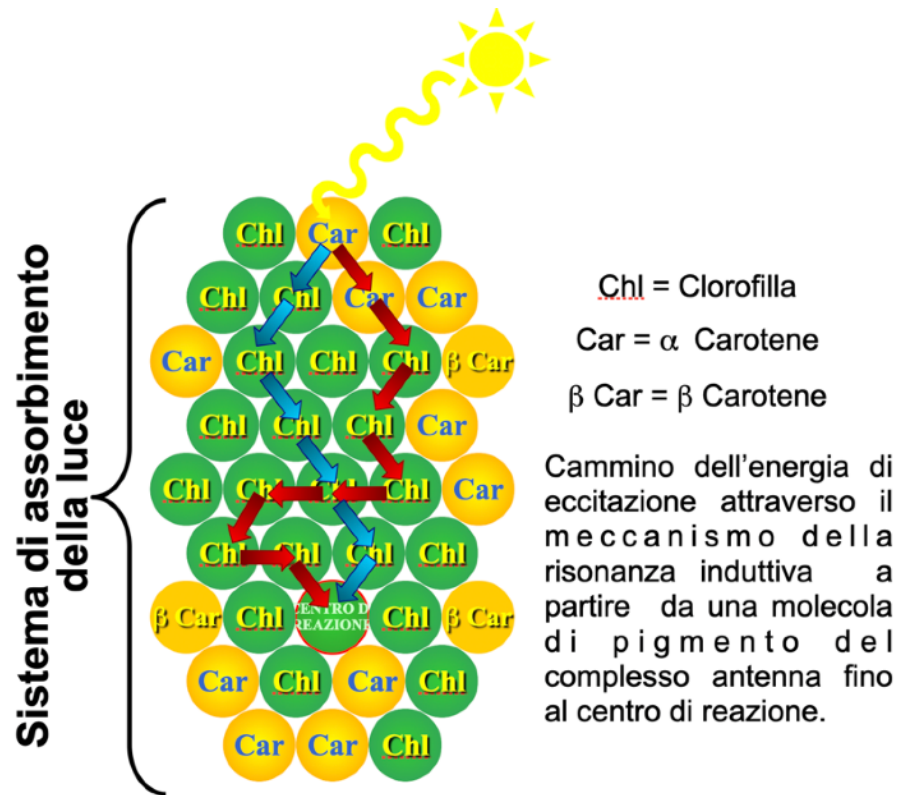




Il beta carotene è la principale fonte di vitamina A, o retinolo, necessaria per l'uomo e per molti altri animali.

Nelle foglie il colore dei carotenoidi è di solito mascherato alle clorofille, fuorché nelle caducifoglie in autunno, quando la degradazione delle clorofille lascia che questo divenga evidente.

Le ficobiline non sono universalmente presenti, ma si trovano solo in cianobatteri e alghe rosse.



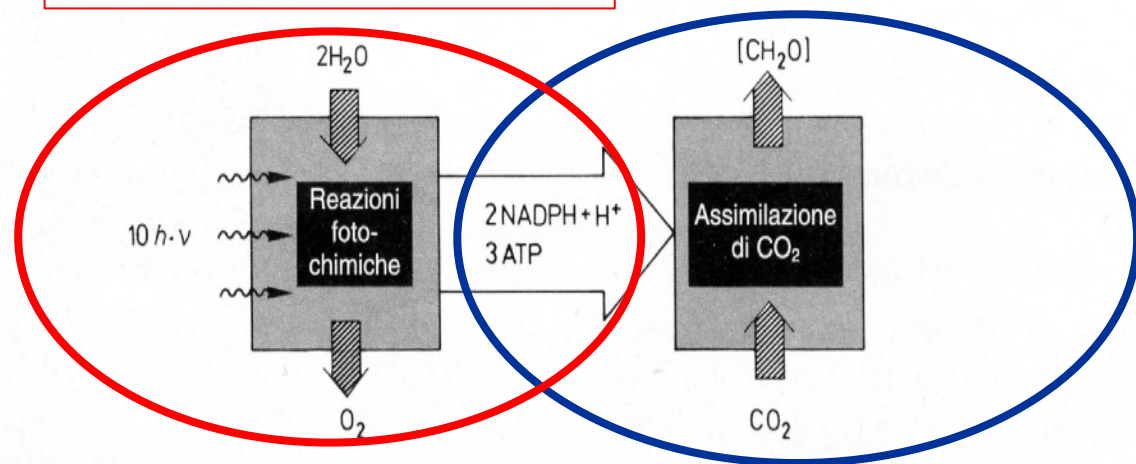


Fotosintesi: la fase “luminosa”



FASE LUMINOSA

FASE OSCURA

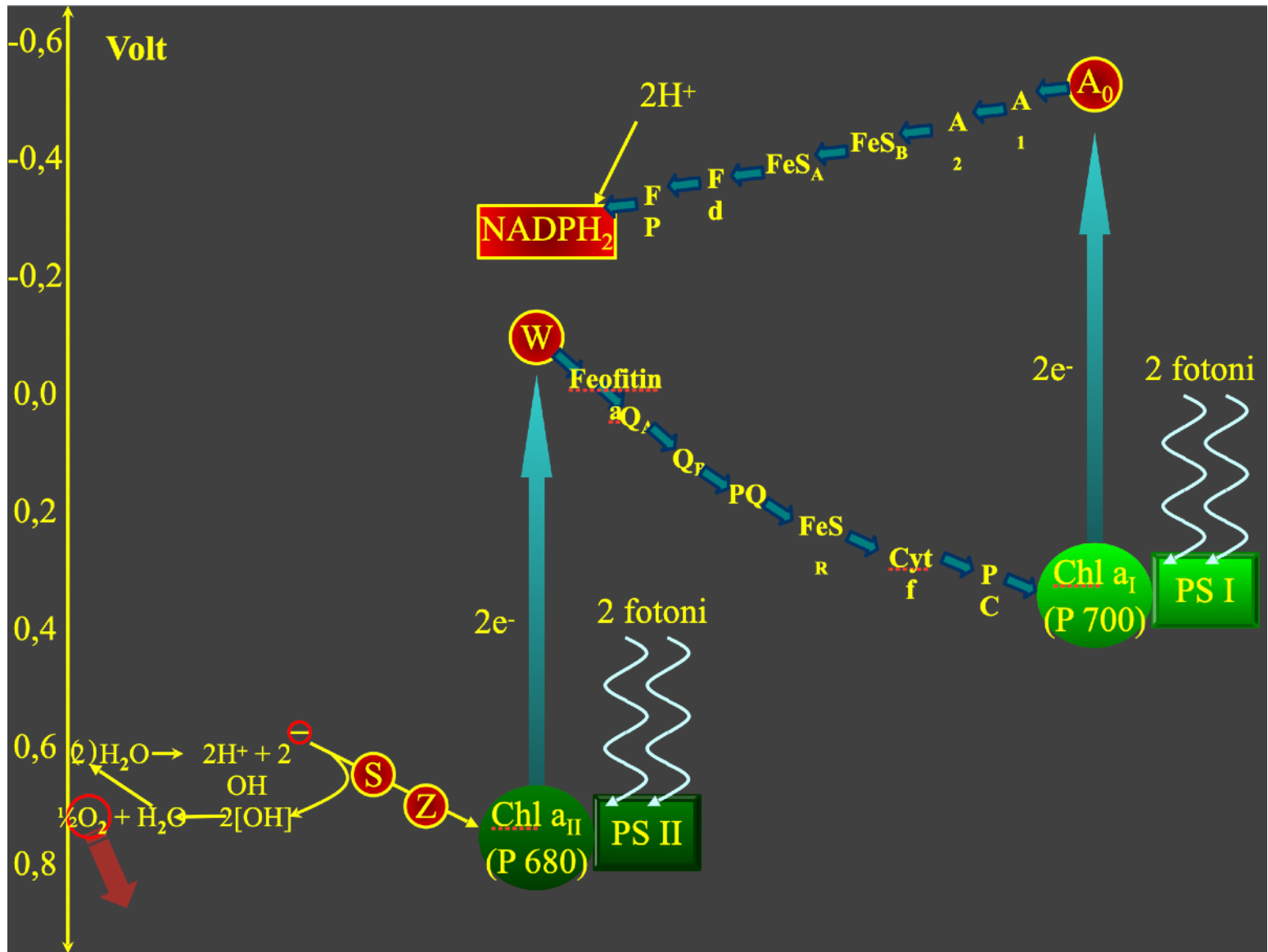


Dipendenza dell'assimilazione fotosintetica di CO_2 dall'apporto di $\text{NADPH} + \text{H}^+$ e di ATP a partire da reazioni fotochimiche. Il consu-

mo di 10 fotoni si spiega per il fatto che 8 fotoni vengono impiegati per la produzione di $2\text{NADPH} + \text{H}^+$ e di 2 ATP attraverso il trasporto non cicli-

co di elettroni, e che 2 fotoni ancora sono impiegati per produrre 1 ATP attraverso il trasporto ciclico degli elettroni.







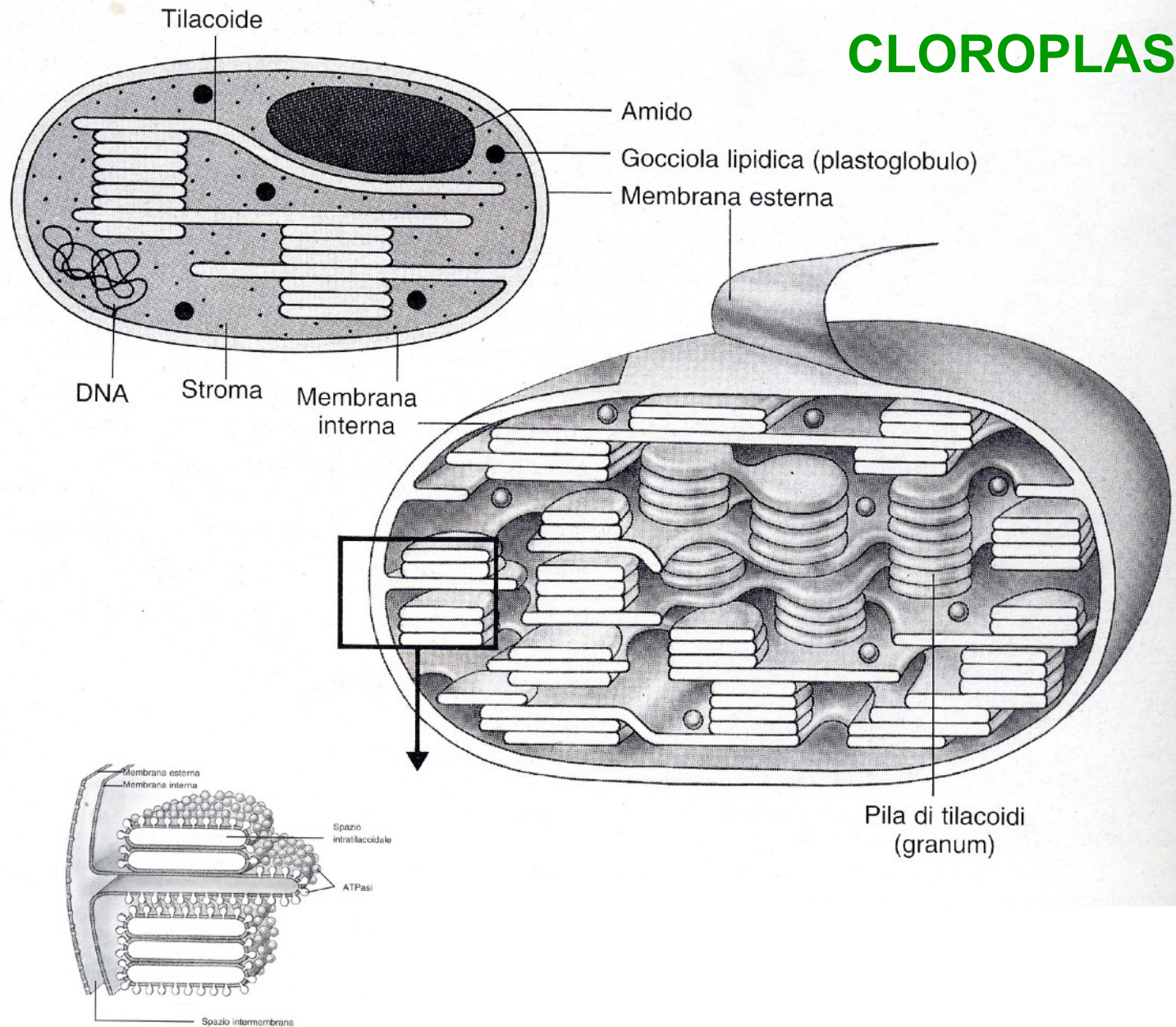
Dove avvengono questi fenomeni?

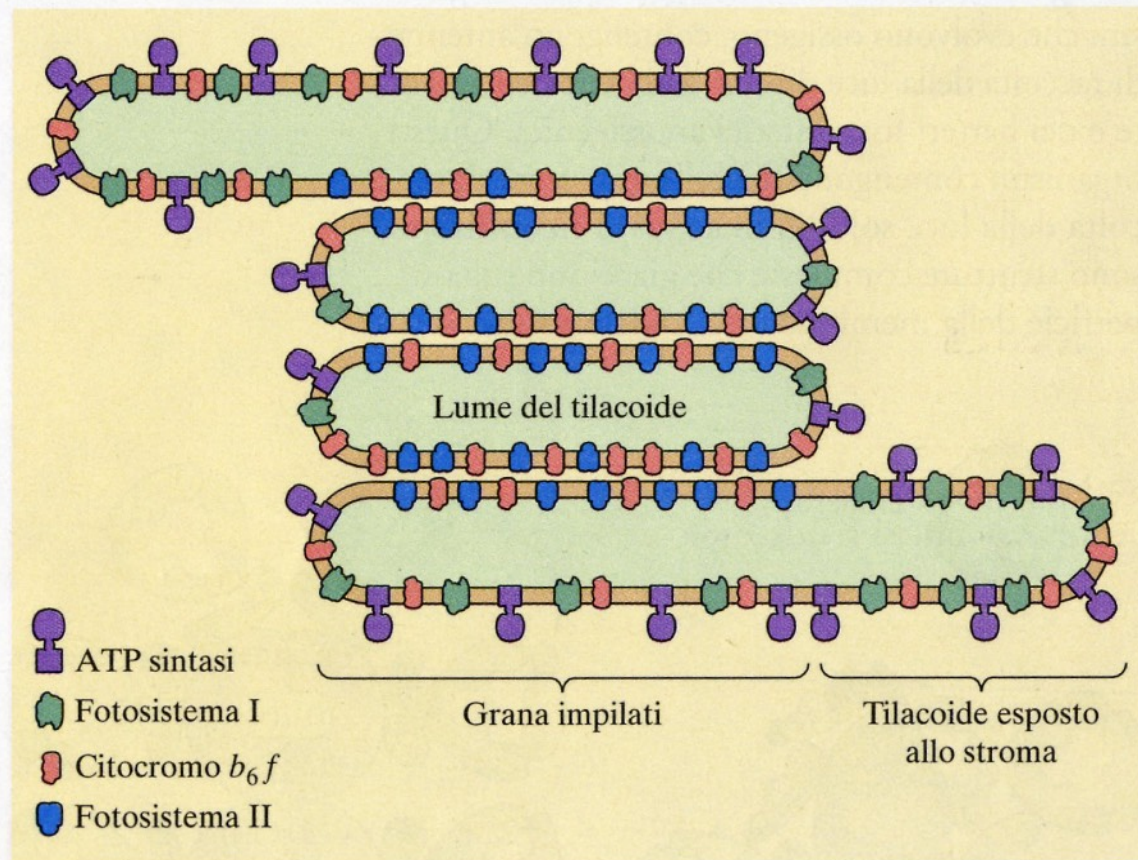
- Riduzione del NADP^+ : a livello dello stroma
- Le catene REDOX e i fotosistemi che assorbono l'energia luminosa sono parti integranti delle membrane tilacoidali
- FOTOLISI dell'ACQUA: negli spazi intratilacoidali (“dentro i tilacoidi”)





CLOROPLASTI

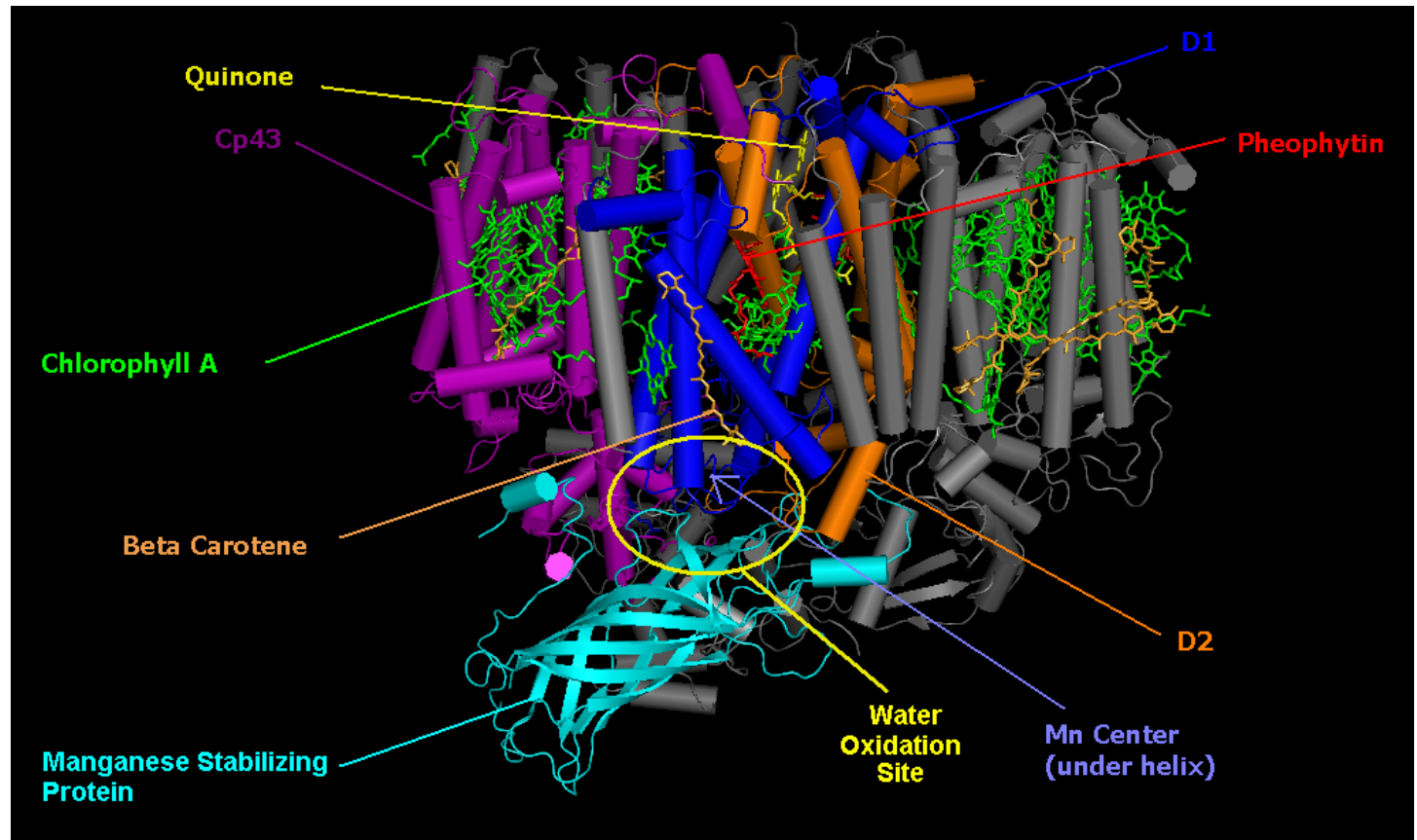




L'eterogeneità laterale dei complessi della membrana del cloroplasto. Il PSII è localizzato soprattutto nelle regioni impilate delle membrane tilacoidali, mentre il PSI e l'ATPasi sono localizzate quasi esclusivamente nelle membrane non impilate. Il complesso del citocromo b_6f è distribuito equamente attraverso le due regioni. La separazione dei fotosistemi necessita di trasportatori elettronici mobili come il plastochinone e la plastocianina, che trasportano gli elettroni tra i complessi della membrana separati spazialmente.



Fotosistema II





Il fotosistema II è il solo capace di ossidare l'ossigeno dell'acqua (fotolisi), e quindi di estrarre da essa elettroni, che poi verranno usati anche dal fotosistema I, fino a ridurre il NADP^+ a NADPH .

Il nome è dovuto al fatto che è stato il secondo fotosistema a essere scoperto.

Nel suo centro di reazione, formato da un omodimero di clorofilla a, la carica positiva dovuta alla perdita di un elettrone è spostata principalmente su una delle due molecole, e non ripartita equamente su tutti e due. Di conseguenza il potenziale ossidativo di questa molecola è molto elevato, e sembra sia questo che permette l'ossidazione dell'ossigeno.

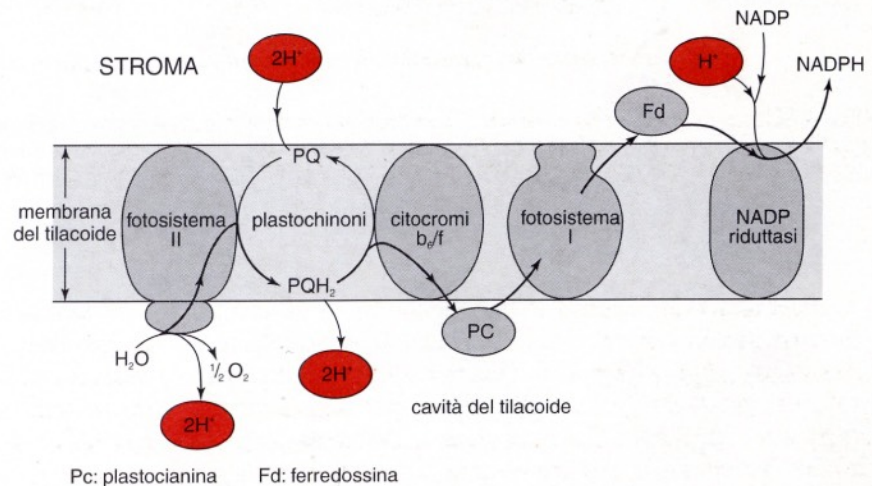
Il complesso di evoluzione dell'ossigeno (*oxygen evolving complex*) non è ancora stato chiarito in tutte le sue parti, per cui il meccanismo esatto è ancora in parte sconosciuto.



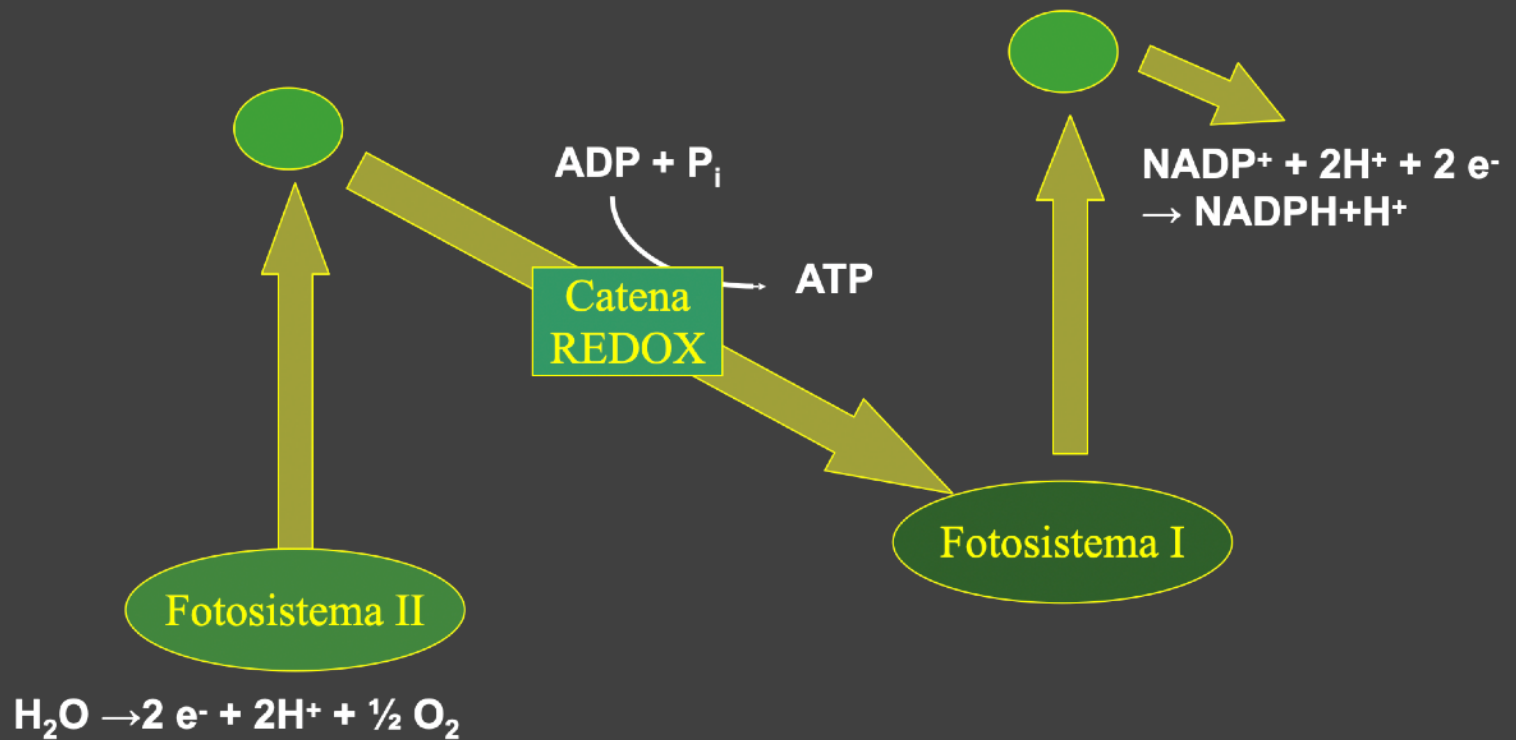
Il fotosistema II trasferisce quindi gli elettroni al fotosistema I tramite una cascata di accettori, il primo dei quali è la feofitina. Gli elettroni vengono poi trasferiti a dei plastochinoni, alla ferridossina, transitano per il complesso del Citocromo b/f, pompando protoni all'interno del lume tilacoidale, per poi fluire alla Plastocianina, e quindi diventare disponibili per il fotosistema I. Il trasporto degli elettroni è necessario perché fotosistema II e I non sono attigui nella membrana tilacoidale.

Fig. 13.22 • Questo schema mostra la disposizione delle molecole che partecipano alla fase luminosa (fotosistemi e trasportatori di elettroni) nello spessore della membrana del tilacoide. Esso illustra anche come si genera il gradiente di pH (di protoni) fra esterno e interno del tilacoide. La reazione di ossidoriduzione dei chinoni comporta assorbimento e rilascio di protoni: i protoni vengono assorbiti sulla faccia della membrana che guarda verso lo stroma e rilasciati da quella che guarda verso la cavità del tilacoide. Protoni vengono inoltre consumati per la riduzione del NADP dalla parte dello stroma mentre vengono generati in seguito all'ossidazione dell'acqua dalla parte della cavità.

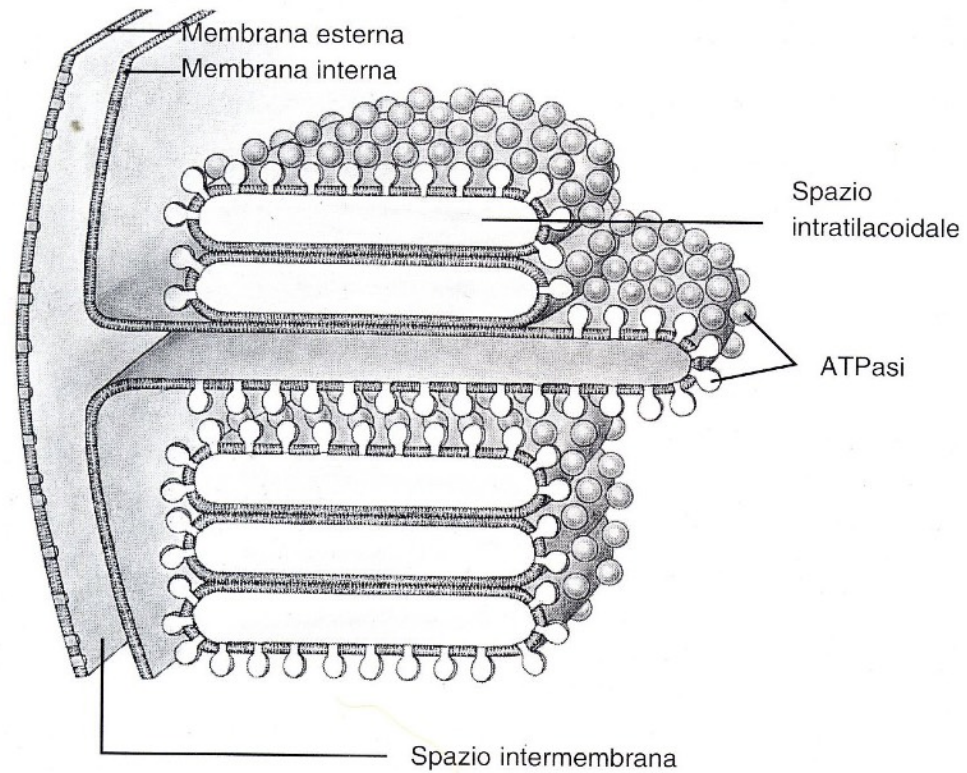
(Da Taiz-Zeiger «Plant Physiology», modificato).



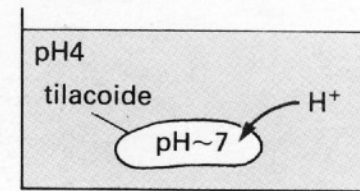
ATP??



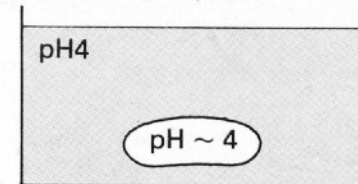
Formazione dell'ATP



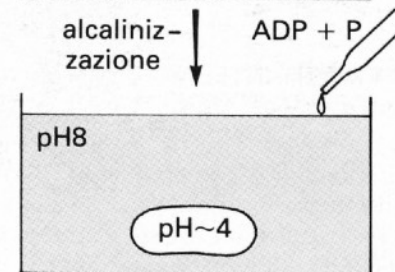
Ipotesi “chemio- osmotica”



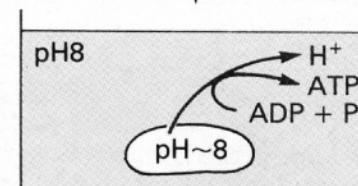
Tilacoidi isolati di spinacio vengono sospesi in una soluzione tamponata a pH 4.



Dopo qualche minuto il pH della cavità interna dei tilacoidi si è equilibrato con quello della soluzione esterna.



La soluzione esterna viene alcalinizzata in modo da portare rapidamente il suo pH a 8. Contemporaneamente si aggiungono ADP e fosfato inorganico. In questo modo si crea artificialmente un gradiente di pH fra tilacoidi e soluzione.



Il pH interno dei tilacoidi si riequilibra con quello della soluzione esterna. Il gradiente di pH si annulla e a sue spese viene formato ATP.

FIG. 13.21 • Questa esperienza fatta dall'americano Jagendorf nel 1966 ha dato sostegno all'ipotesi che la produzione di ATP nei cloroplasti sia mediata da un gradiente di H^+ . Normalmente il gradiente si genera tra lo spazio interno dei tilacoidi e lo stroma del cloroplasto a spese di energia luminosa. Se si impone ai tilacoidi un gradiente di pH artificiale come in questa esperienza è possibile avere sintesi di ATP al buio.



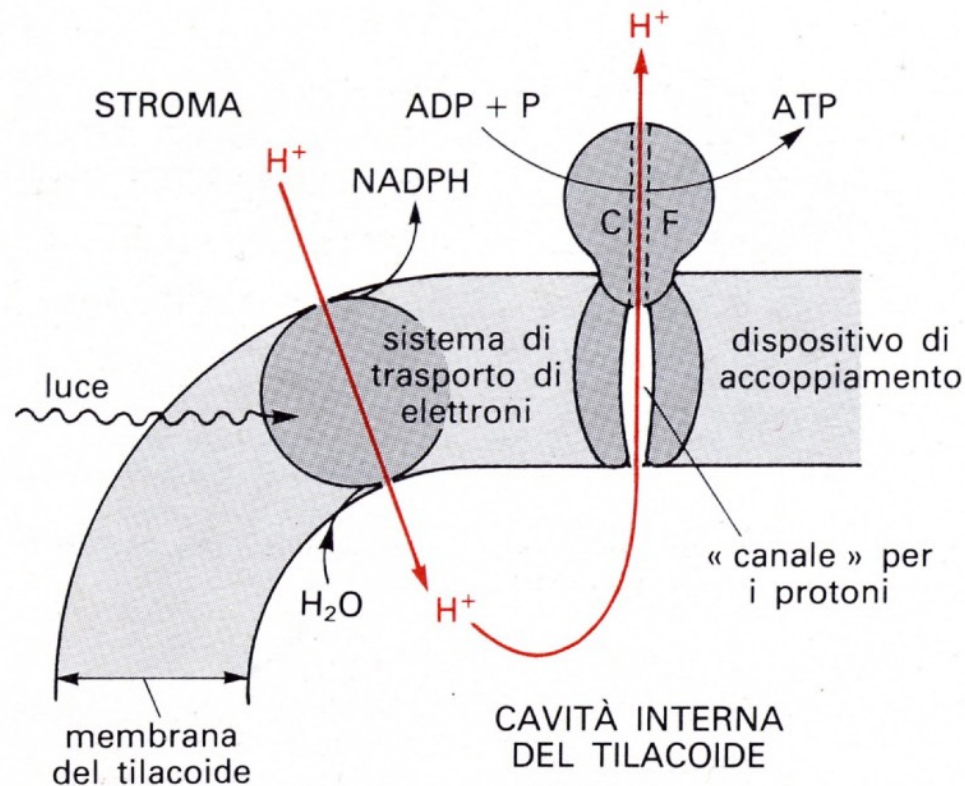


Fig. 13.23 • Nelle membrane dei tilacoidi è contenuta l'ATP sintasi, una «macchina» molecolare per accoppiare il gradiente di protoni alla sintesi di ATP. Di questa «macchina» fa parte un grosso complesso di proteine chiamato CF_1 che sporge sulla faccia esterna della membrana. Questo complesso isolato in provetta catalizza l'idrolisi dell'ATP, ma inserito nel tilacoide illuminato ne catalizza la sintesi. (Per l'accoppiamento fra gradiente di protoni e sintesi di ATP vedi anche la fig. 5-17).





La formazione dell'ATP è quindi legata all'instaurarsi di un gradiente protonico tra le vescicole tilacoidali chiuse e lo stroma.

Fino a quando il gradiente sussiste, le ATP-sintasi di membrana, usando il flusso di protoni in uscita, possono formare ATP che si concentra a livello stromatico.

Cosa genera il gradiente? Sono tre fenomeni spesso concomitanti.

- (1) la fotolisi dell'acqua all'interno dello spazio intratilacoidale, che genera H^+ ;
- (2) la riduzione del $NADP^+$ nello stroma, che si accompagna ad una riduzione di H^+ presenti a livello stromatico;
- (3) il trasporto attivo di H^+ dallo stroma verso l'interno dello spazio intratilacoidale per opera dei PQ (PLASTOCHINONI).





La produzione dell'**ATP** non è quindi un processo ossidoriduttivo, ma è comunque legato ai fenomeni ossidoriduttivi precedentemente descritti.

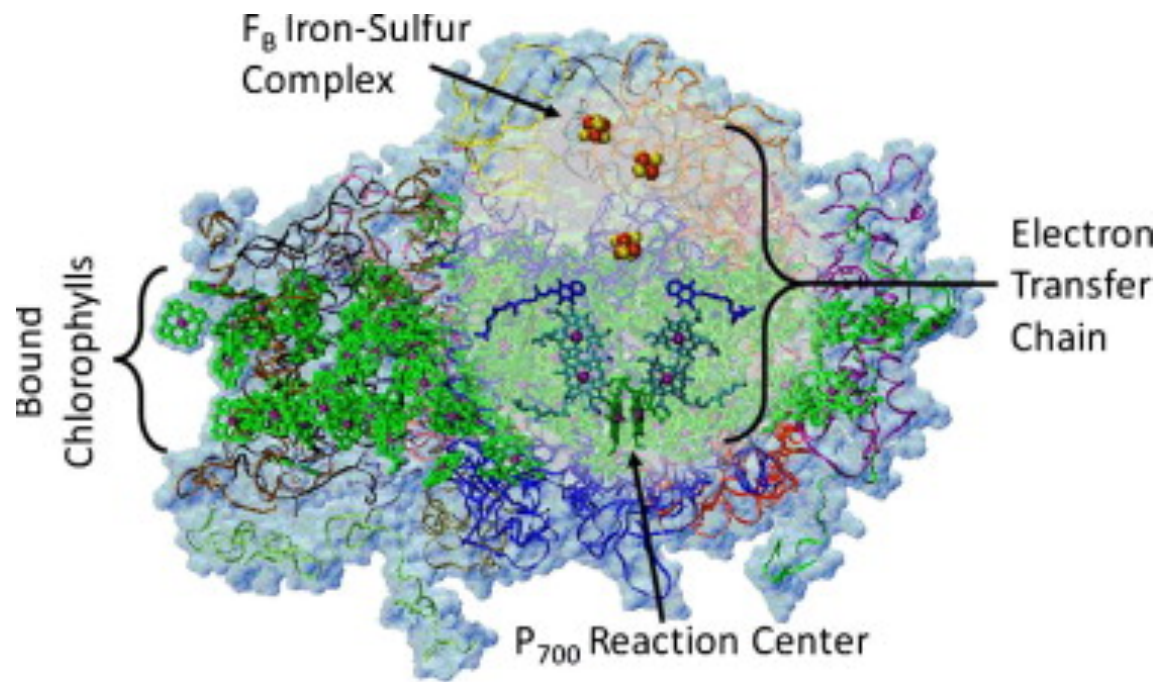
Per avvenire deve essere creato un gradiente di concentrazione di protoni [H^+] tra spazio intratilacoidale e stroma.

Tutto ciò che crea tale gradiente permette il funzionamento delle ATP-sintasi di membrana, che producono ATP a partire da ADP e P_i usando un efflusso di protoni in uscita dallo spazio intratilacoidale.

Va rimarcato che la fotofosforillazione non ciclica da sola non è in grado di produrre tutti i materiali necessari a supportare le reazioni della fase oscura.



Fotosistema I





Il fotosistema I non svolge la fotolisi dell'acqua.

Quindi, nella **fotofosforillazione non ciclica**, gli elettroni che le clorofille del centro di reazione passano alla catena che conduce alla riduzione del NADP^+ devono provenire da qualche altra parte. Nel caso dell'accoppiamento con il fotosistema II, ovviamente, gli elettroni sono prodotti dalla fotolisi dell'acqua.

Tuttavia, il fotosistema I è anche in grado di produrre ATP in un processo definito **fotofosforillazione ciclica**, che prevede un “riciclo” degli elettroni, senza la necessità di attingere a quelli prodotti dalla fotolisi dell'acqua.

Il fotosistema I è composto, come il II, da proteine strutturali, un complesso antenna, e un centro di reazione. Manca ovviamente il centro di ossidazione dell'acqua.

Il complesso antenna contiene clorofille e carotenoidi, che trasferiscono l'energia, andando a eccitare le clorofille del centro di reazione. Queste trasferiscono elettroni a un accettore primario, che in questo caso è una molecola modificata di Chl a, detta a_0 , mentre nel PS II era la feofitina.



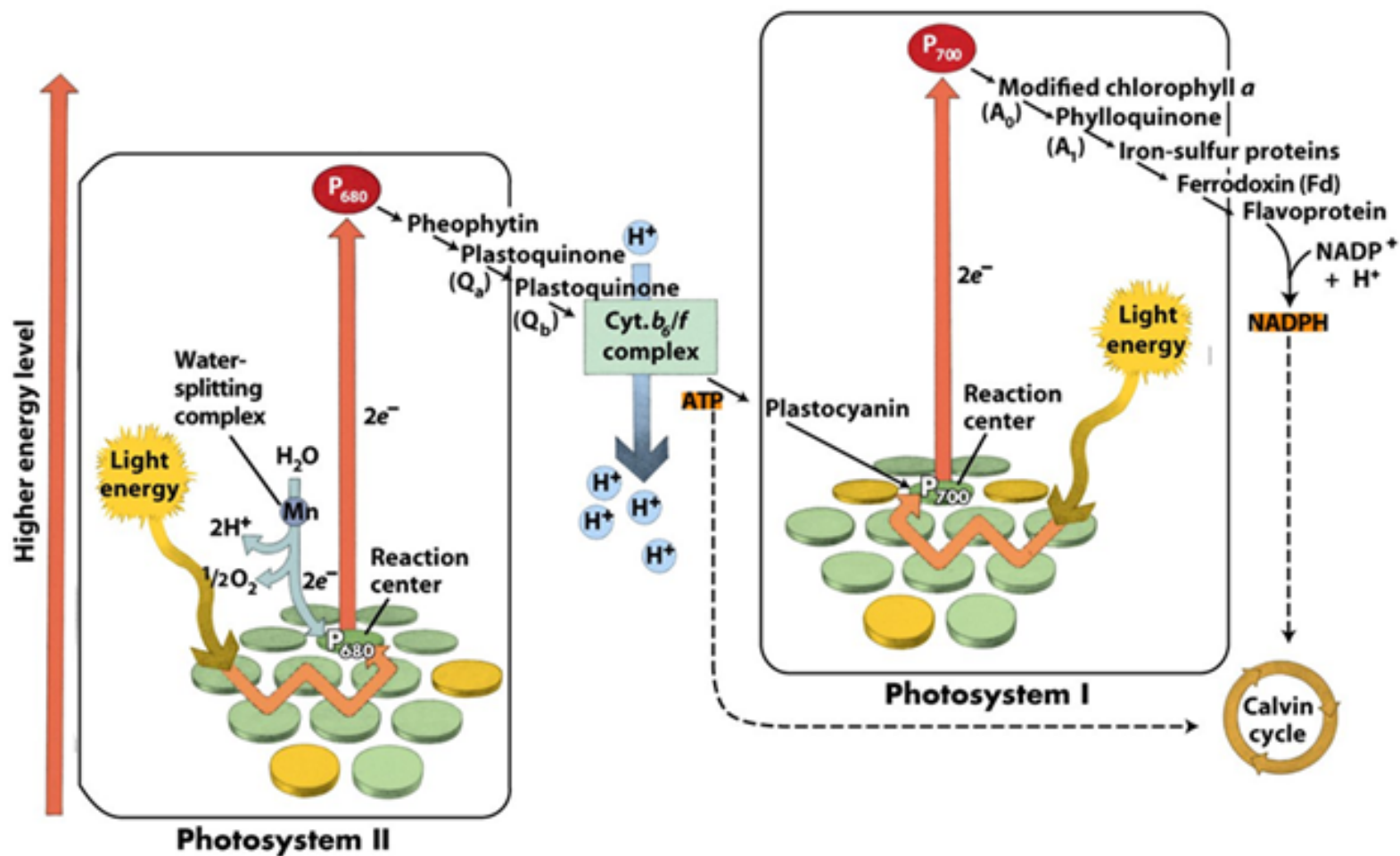


Il centro di reazione del PS I è formato da due molecole di Chl a con massimo di assorbimento a 700 nanometri. Ogni fotone proveniente dal complesso antenna eccita un elettrone. Gli elettroni vengono trasferiti alle molecole di accettore primario in coppia.

Il secondo accettore di elettroni della cascata che conduce alla riduzione del NADP^+ a $\text{NADPH} + \text{H}^+$ è il fillochinone A1, noto anche come vitamina K1. Questo ossida la Chl a0, rendendola disponibile a accettare altri elettroni dal centro di reazione. Passa poi gli elettroni a una cascata di centri di reazione ferro-zolfo, che li incanalano poi alla ferrodossina.

La funzione principale della ferrodossina è quindi quella di trasportare un elettrone dai centri di reazione ferro-zolfo a un enzima, la ferridossina- NADP^+ riduttasi, che, come dice il nome, riduce il NADP^+ .







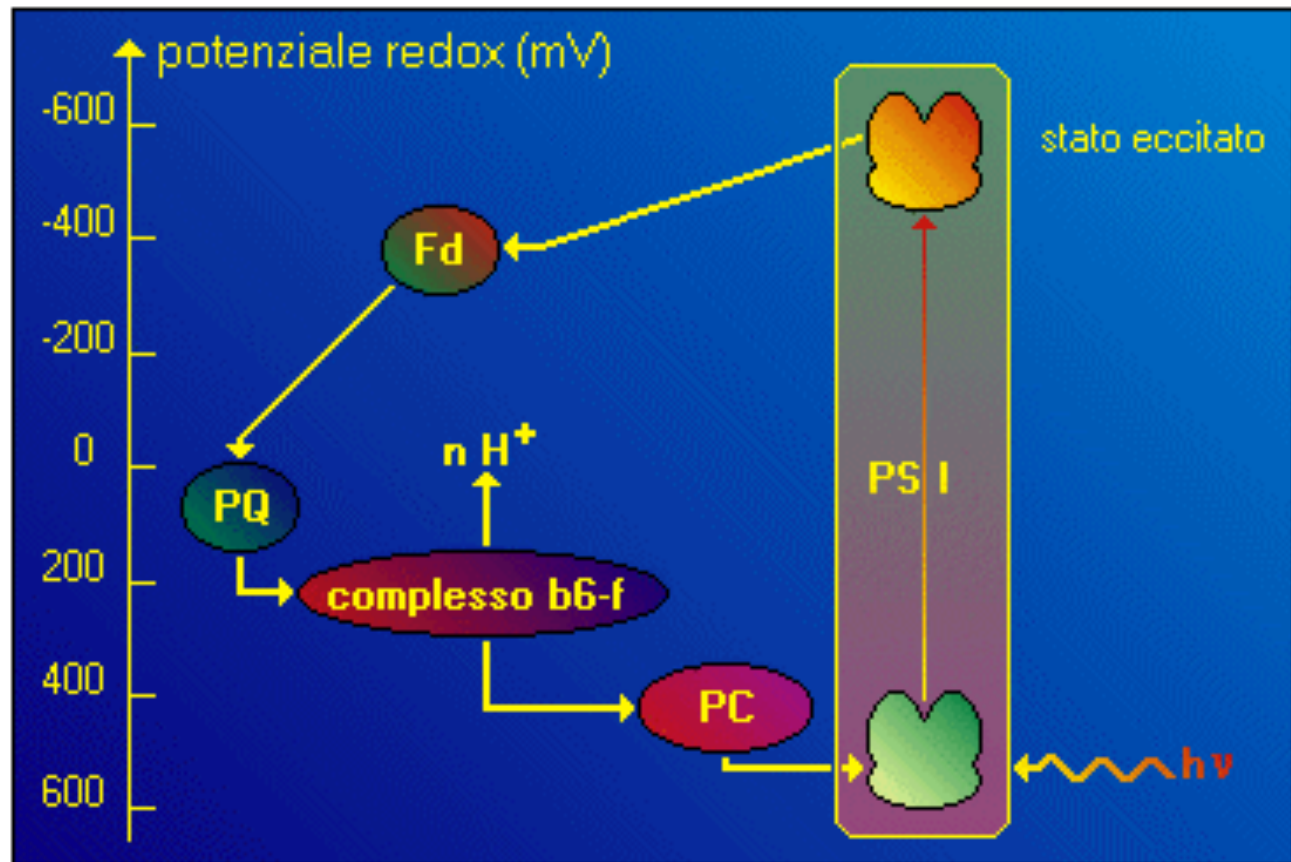
Esiste una via alternativa alla **via Z**, per gli elettroni che arrivano dal centro di reazione **P700** del **fotosistema I**, che aumenta la versatilità della fotosintesi.

L'elettrone ad alto potenziale della **ferrodossina Fd** può essere trasferito al **citocromo bf** (invece che a **NADP⁺**) e ritornare alla forma ossidata del **P700** attraverso la **plastocianina PC**.

Il flusso di elettroni determina solo il trasferimento di **H⁺** nel lume tilacoide da parte del citocromo. In questo processo viene generato **ATP** senza la formazione contemporanea di **NADP**.

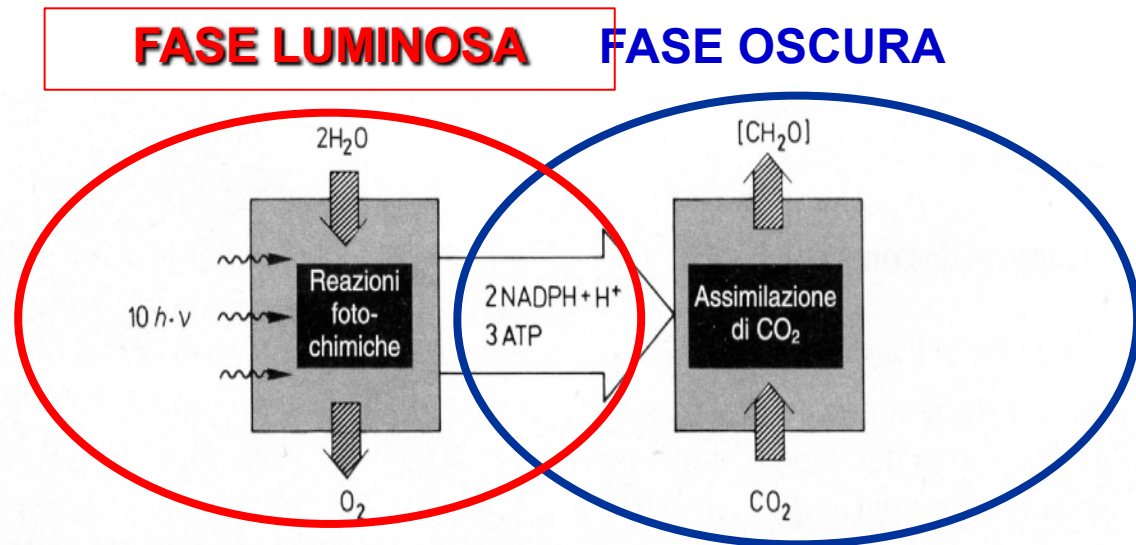
Il **fotosistema II** non partecipa alla fotofosforilazione ciclica; questa avviene quando non vi è più **NADP⁺** per accettare elettroni dalla ferrodossina ridotta.





La fotofosforillazione ciclica produce il quantitativo di ATP “mancante” dalla fotofosforillazione non ciclica per alimentare la fase oscura.

Come visto, questa richiede 2 NADPH e 3 ATP per ridurre un atomo di carbonio, mentre la sola fotofosforillazione non ciclica produce 2 NADPH e 2 ATP.



Dipendenza dell'assimilazione fotosintetica di CO_2 dall'apporto di $NADPH + H^+$ e di ATP a partire da reazioni fotochimiche. Il consu-

mo di 10 fotoni si spiega per il fatto che 8 fotoni vengono impiegati per la produzione di $2 NADPH + H^+$ e di 2 ATP attraverso il trasporto non cicli-

co di elettroni, e che 2 fotoni ancora sono impiegati per produrre 1 ATP attraverso il trasporto ciclico degli elettroni.





Fase “oscura”





Nella fase oscura sono predominanti reazioni biochimiche, catalizzate da enzimi.

Queste sono temperatura – sensibili, e vengono a cessare sopra i 45°C a causa della denaturazione degli stessi.

Alcuni di questi enzimi devono essere attivati dalla luce (al buio non funzionano!).

Il processo continua fino a quando ci sono a disposizione i vari substrati: la CO_2 , l'ATP e il $\text{NADPH} + \text{H}^+$ e un substrato organico «energizzato» da gruppi fosfato.

Il tutto avviene nello STROMA, dove i prodotti finali si accumulano se i processi di “esportazione” sono più lenti di quelli di produzione.



Il cuore dalla fase oscura è un ciclo detto, dal nome del suo scopritore, **Melvin Calvin**, premio nobel nel 1961, **ciclo di Calvin**.

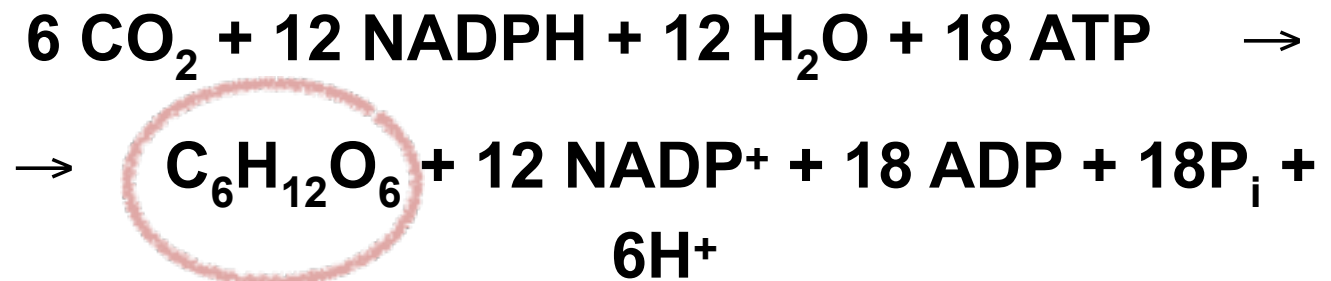




Le reazioni della fase oscura portano alla riduzione biochimica della CO_2 a carboidrati.

Il processo, noto come "**fissazione**" o "**organizzazione della CO_2** ", è fondamentale per la biosfera: piante verdi e alghe producono ogni anno enormi quantità di sostanza organica (**produttività primaria**).

Le reazioni possono essere così riassunte:



Carboidrato ridotto: viene in genere indicato un esoso, intendendo il glucosio (perché viene polimerizzato nell'amido primario)

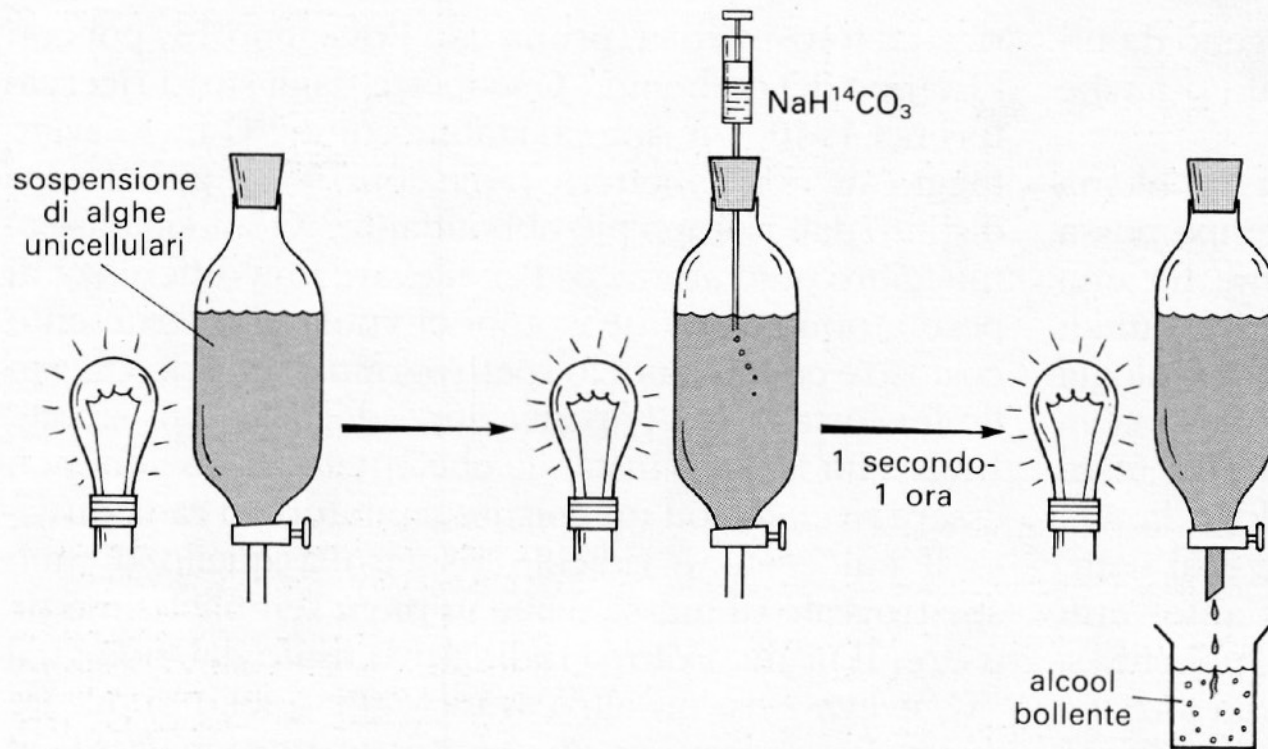




La caratterizzazione delle reazioni e la determinazione delle varie tappe, ciò che viene oggi indicato con il nome di Ciclo di Calvin (-Benson), è il risultato di un enorme lavoro di equipe di un gruppo di 300 scienziati americani che aveva al suo interno i migliori specialisti dei diversi campi, che poterono usare tecnologie allora di assoluta avanguardia.

Siamo negli anni '50, la II guerra mondiale è terminata da poco e ha messo a disposizione i radioisotopi, grazie allo studio dell'atomo.



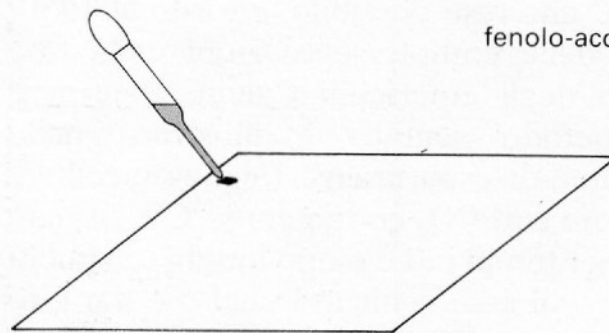


1 – Il recipiente contiene una sospensione di alghe verdi le quali fotosintetizzano usando la CO_2 atmosferica non radioattiva sciolta nell'acqua.

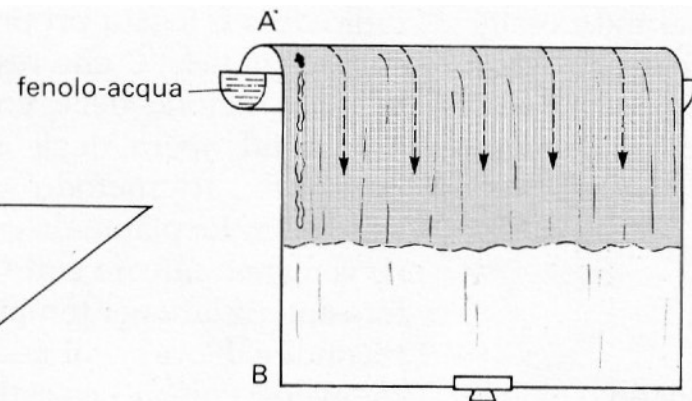
2 – Si immette nel recipiente una certa quantità di CO_2 radioattiva (sotto forma di $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$).

3 – Passato un certo intervallo dalla somministrazione di CO_2 radioattiva si apre il rubinetto. Una parte della sospensione cade nell'alcol bollente. I composti a piccola molecola contenuti nelle cellule (zuccheri, amminoacidi, ecc.) passano in soluzione nell'alcol. L'operazione viene ripetuta varie volte a diversi intervalli di tempo.

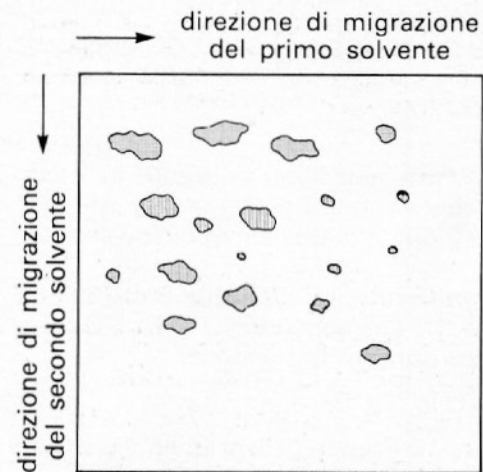




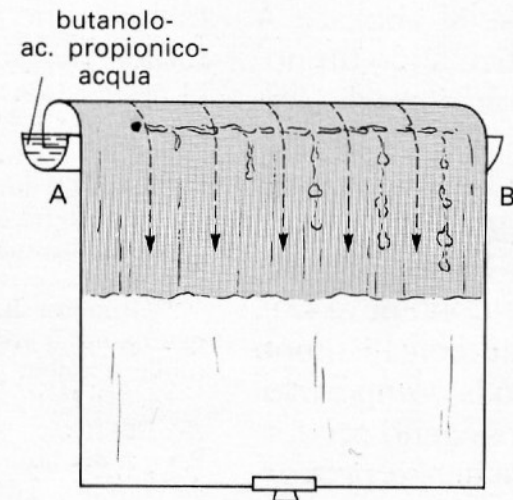
4 – Una piccola quantità dell'estratto alcoolico di alghe viene applicata vicino a un angolo di un foglio di carta cromatografica.



5 – Un lato del foglio pesca in una vaschetta contenente un solvente il quale migra lungo la carta trascinandosi dietro per diverse distanze le varie sostanze contenute nell'estratto, le quali in questo modo vengono parzialmente separate.

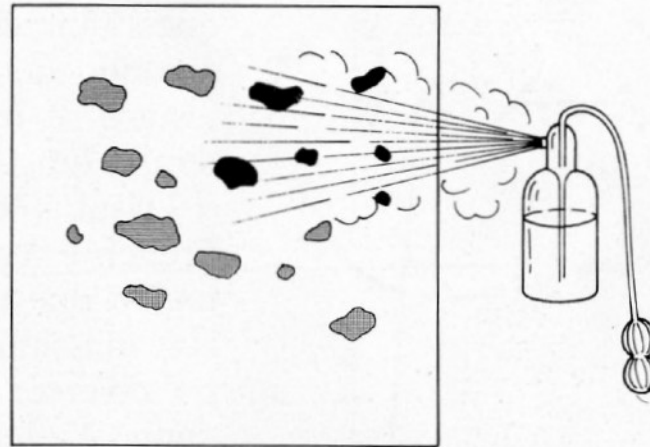


7 – Terminata la separazione cromatografica a ogni sostanza contenuta nell'estratto corrisponde una macchia in una determinata posizione. Ma tutte queste macchie sono praticamente invisibili.

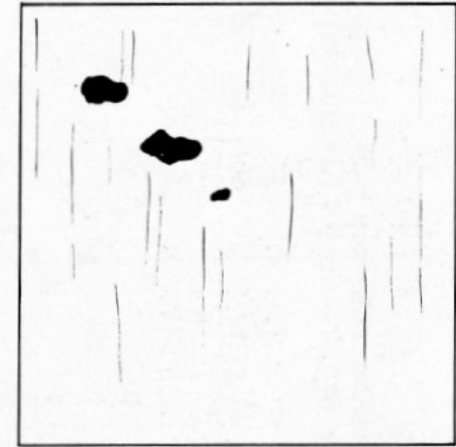


6 – La separazione diventa totale con una seconda cromatografia in direzione perpendicolare alla prima. Il foglio, ruotato di 90°, pesca in un solvente diverso.





8 – Le macchie possono essere messe in evidenza spruzzando la carta con soluzioni di particolari sostanze che reagiscono con i vari tipi di composti dando origine a prodotti colorati. Le macchie vengono identificate cromatografando sostanze note nelle stesse condizioni sperimentali. In questo modo si possono identificare praticamente tutti i composti separati.



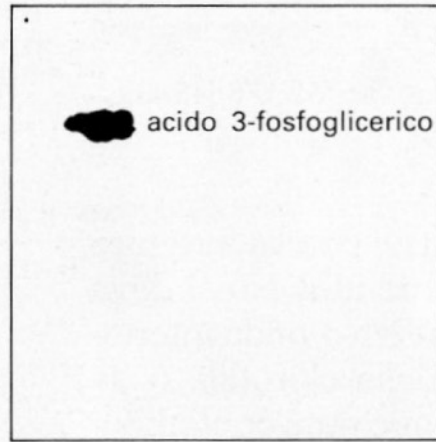
9 – Alternativamente il foglio di carta cromatografica viene coperto con una lastra fotografica e lasciato al buio per alcune settimane. Le radiazioni emesse dal ^{14}C incorporato nei vari composti impressionano la lastra che viene poi sviluppata. In questo modo vengono messe in evidenza solo le sostanze che sono state sintetizzate DOPO l'immissione di CO_2 radioattiva.

I composti marcati con il ^{14}C vennero quindi separati e identificati a seconda della posizione che raggiungono in una cromatografia bidimensionale su carta. In questo modo, vennero identificati come intermedi del processo della fissazione numerosi acidi e zuccheri fosfati.



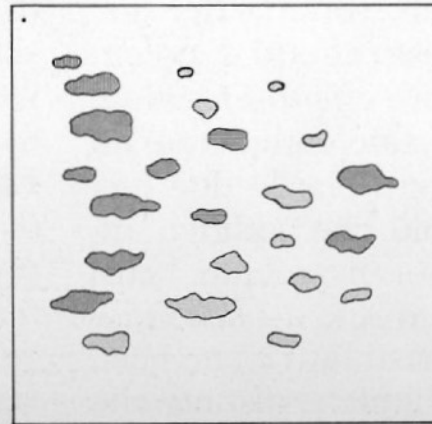


identificazione delle
sostanze radioattive
attraverso l'autoradiografia

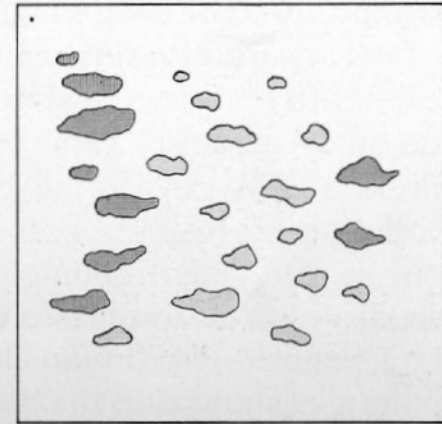


Esponendo le cellule alla $^{14}\text{CO}_2$ per periodi di tempo via via sempre più brevi, Calvin fu in grado di identificare come primo composto intermedio stabile l'acido 3-fosfoglicerico.

identificazione delle
sostanze attraverso
reazioni chimiche che
generano composti colorati



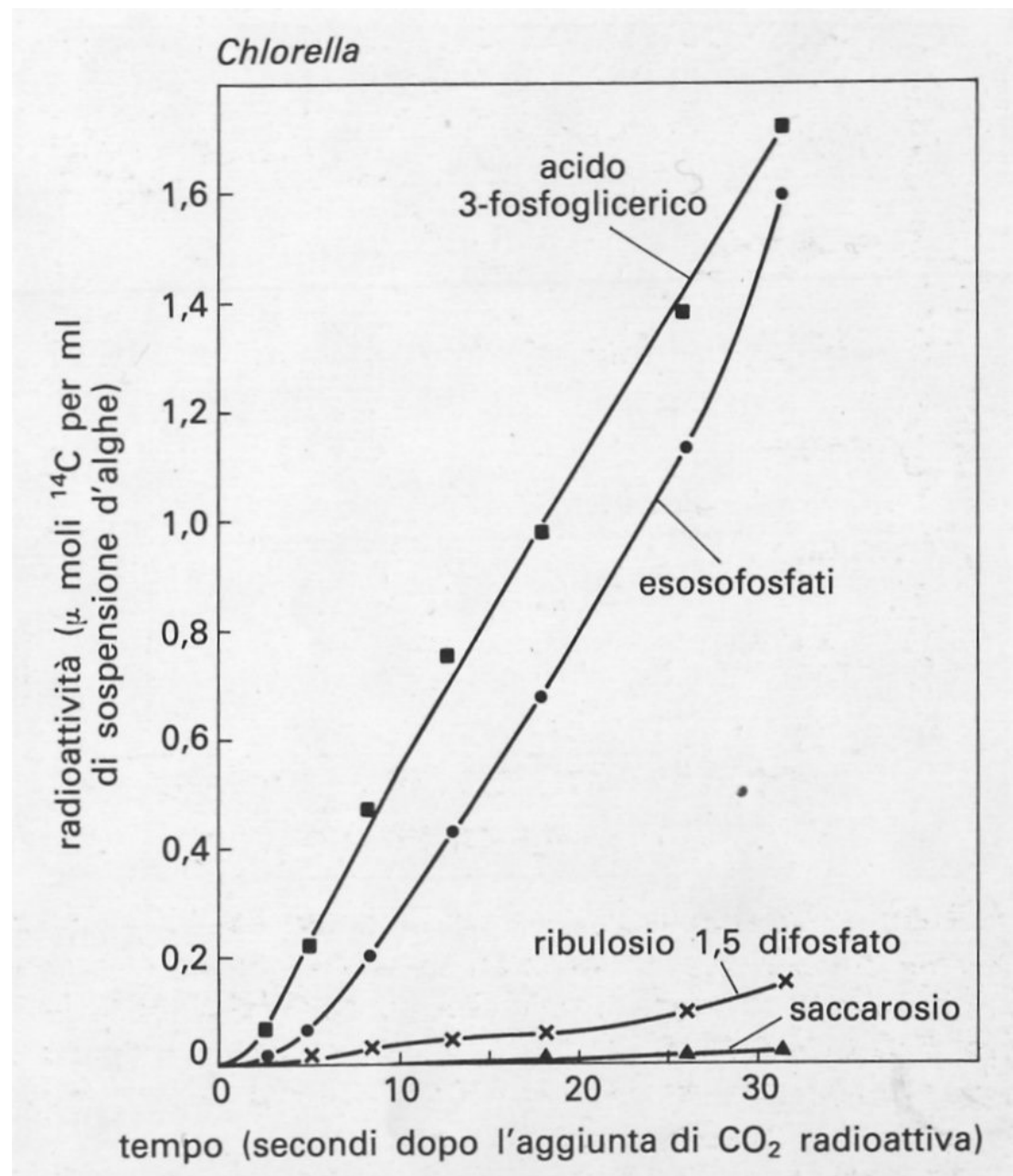
1" dopo l'immissione
di CO_2 radioattiva



10" dopo l'immissione
di CO_2 radioattiva

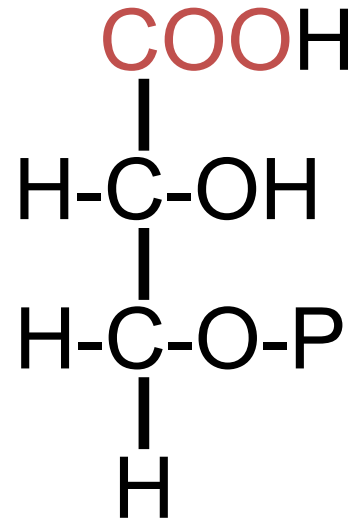
A questo punto furono progressivamente ridotti i tempi di esposizione







I risultati dimostrarono che l'acido 3-fosfoglicerico era marcato principalmente nel gruppo carbossilico.

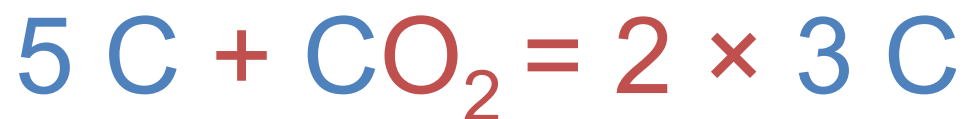


Questo suggerì che l'accettore iniziale della CO_2 fosse un composto a 2 atomi di C, generando una estenuante, futile ricerca di questo composto.



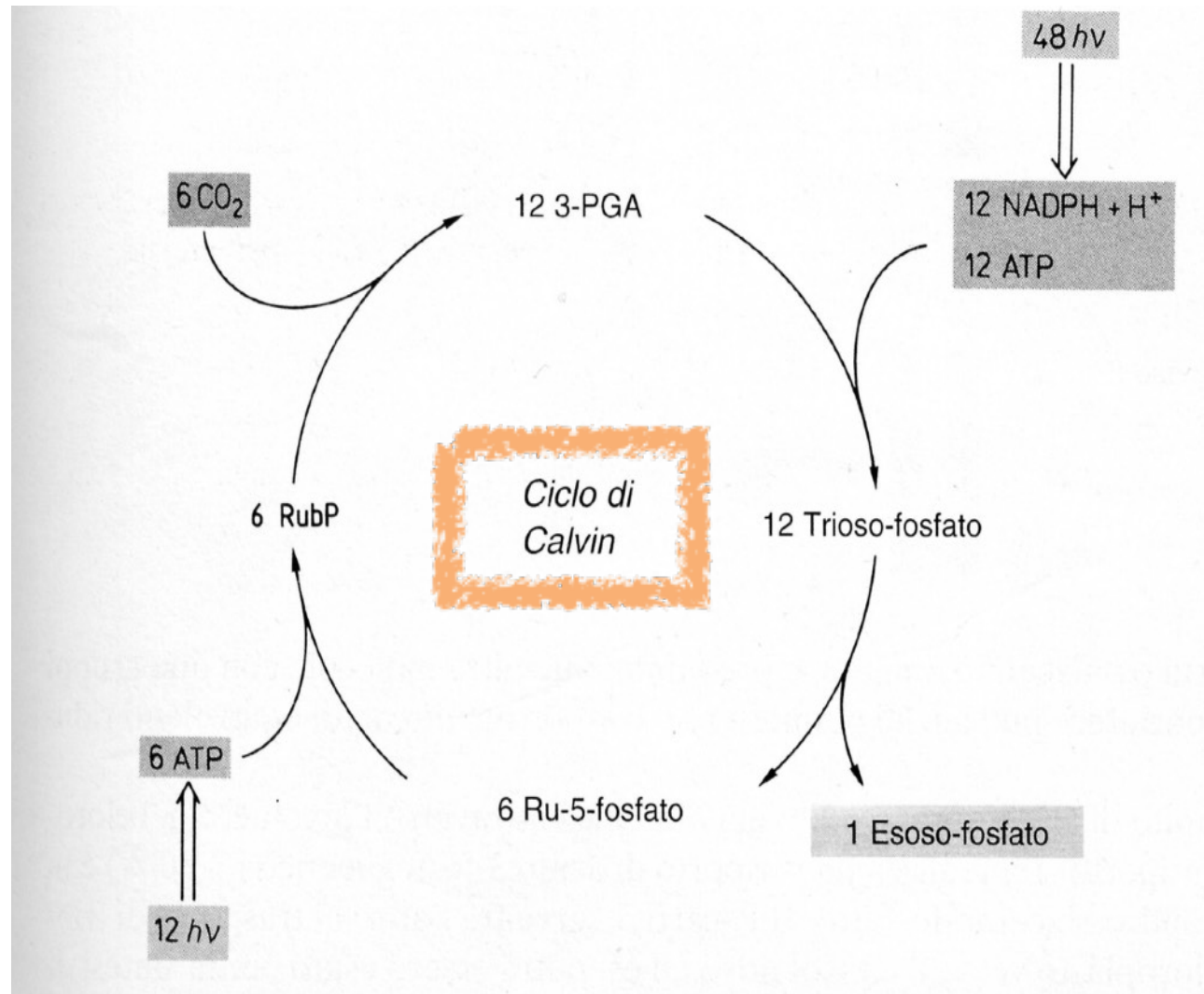


La seguente scoperta che i pentosi monofosfati partecipano al ciclo suggerì la possibilità che l'accettore iniziale della CO₂ fosse un composto a 5 atomi di C che, dopo aver reagito con la CO₂, generava 2 molecole di acido 3-fosfoglicerico.



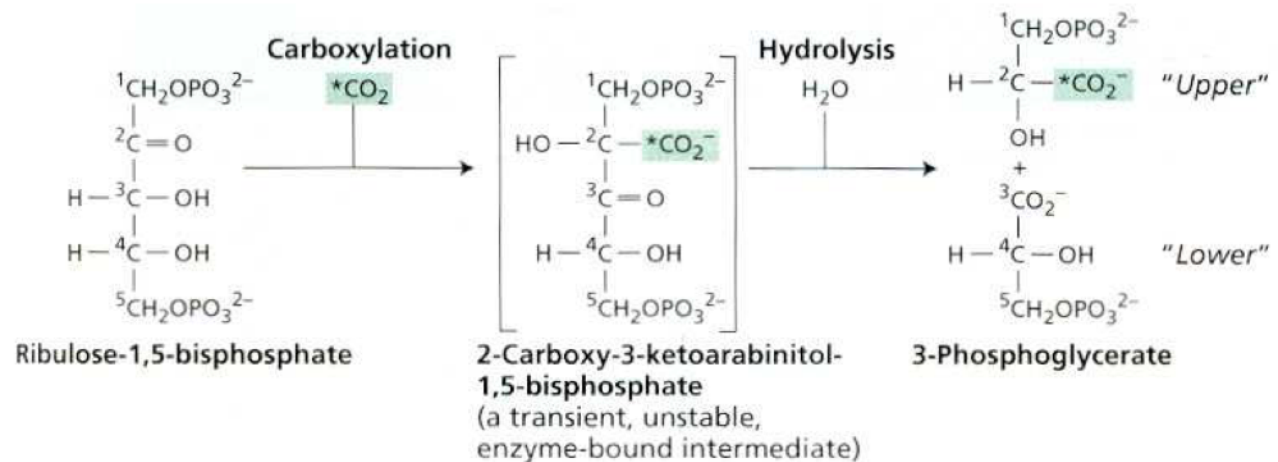
Questo sconvolgimento concettuale portò rapidamente all'identificazione del **ribulosio 1,5-difosfato** (un pentoso) come l'accettore della CO₂ e alla formulazione completa del ciclo.





Fase di carbossilazione

La prima reazione è una fissazione di **CO₂** su un accettore organico, il **pentoso ribulosio 1,5-difosfato (RuDP)**. Si forma così un intermedio esoso fosfato instabile, che si decompone quasi istantaneamente per idrolisi dando due molecole di **acido 3-fosfoglicerico (PGA)**.



$$\Delta G = -51 \text{ kJ mol}^{-1}$$





Una piccola parte delle molecole di PGA sono destinate alla **conversione del PGA in glucosio**, la grande maggioranza alla **rigenerazione del RuDP**, in **un rapporto 1:5**.

Catalizzatore della carbossilazione è l'enzima Ribulosio bifosfato carbossilasi-ossigenasi, detto anche **RUBISCO**, l'enzima più abbondante in natura.

In molti cloroplasti esso costituisce infatti anche il 50% delle proteine totali e, nella biosfera, fino al 20% di tutte le proteine presenti.

La caratteristica più particolare di questo enzima multi-catena sta nel fatto che esso lega al substrato sia CO_2 che O_2 , a seconda della concentrazione dei due gas.





Gli stadi del processo che portano da **PGA** a **glucosio**, e quindi a **saccarosio** e **amido** sono esattamente opposti a quelli della glicolisi.

Infatti il **PGA**, oltre a formarsi nella fotosintesi è anche un intermedio nella **glicolisi**, dato che le principali vie metaboliche possono essere percorse nei due sensi: in questo caso, se è possibile ottenere **PGA** da **glucosio** sarà anche possibile ottenere **glucosio** da **PGA**.

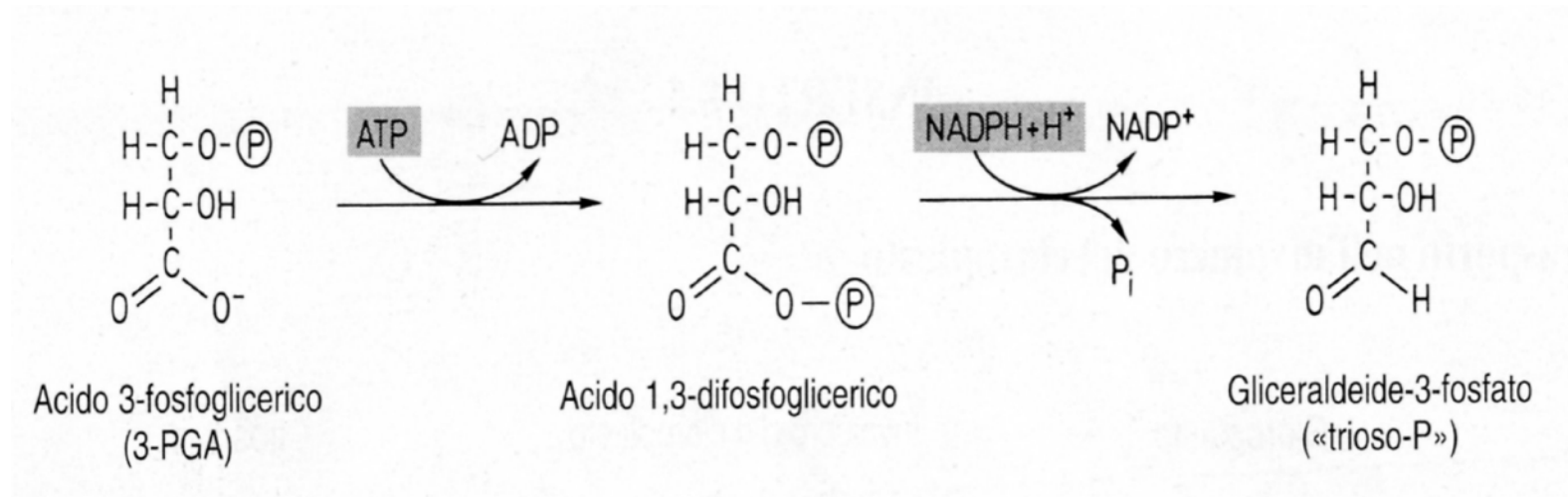
L'unica diversità tra i due opposti processi consiste nel **coenzima riducente**, che nel caso della fotosintesi è l'**NADPH**, nel caso della glicolisi l'**NAD**.

Questo conferma la regola secondo la quale **NAD** è il tipico coenzima delle vie metaboliche degradative in cui prevalgono le ossidazioni, mentre **NADP** è il tipico coenzima delle vie biosintetiche in cui prevalgono le riduzioni.

Le **reazioni di riduzione del PGA** possono essere sintetizzate in un semplice schema.



Riduzione del PGA



Il **PGA** deve essere ridotto, con spesa di energia (ATP+NADPH). Il **PGA** viene dapprima attivato dall'**ATP**, che gli dona il gruppo **fosfato**, quindi ridotto a GLICERALDEIDE-3-P (**GP3**) dall'**NADPH**.





Quale è quindi il destino della G3P?

In linea teorica, ogni due molecole di trioso fosfato potrebbe essere prodotto un glucosio, che potrebbe entrare nelle vie di biosintesi del saccarosio o dell'amido.

Tuttavia, se ciò avvenisse, sarebbe al contempo necessario trovare un modo per rigenerare il ribulosio 1-5 difosfato per vie esterne al ciclo di Calvin. Ma il ciclo di Calvin, è, appunto, un **ciclo**. Questo vuol dire che gli intermedi di reazione, alla fine del ciclo, si riformano.

Questo accade anche per il ribulosio 1-5 difosfato. Le vie metaboliche che portano alla sua rigenerazione sono complesse, e coinvolgono zuccheri fosfati a 4, 5, 6, 7 atomi di C, oltre al consumo di un ATP per molecola rigenerata.

All fine, ogni tre “giri” del ciclo di Calvin, viene liberata una molecola di G3P.





Conversione della GP3 in esosi

La **GP3** prodotta nella fase oscura della fotosintesi viene poi trasformata in zuccheri esosi.

La **GP3** ha già il numero di ossidazione di uno zucchero e quindi la sua successiva trasformazione non richiede altre tappe riduttive endoergoniche (con spesa di energia).

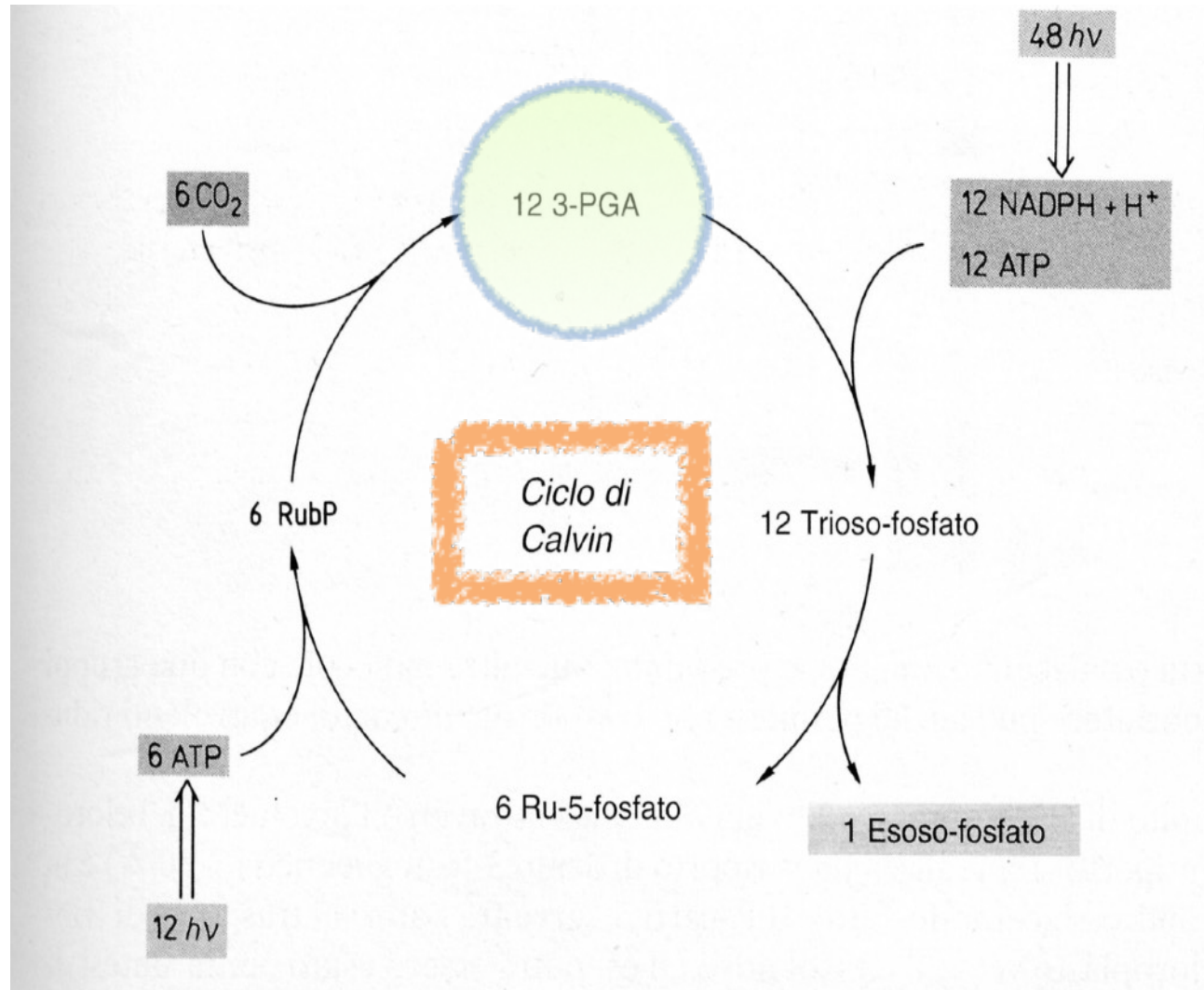
Nel processo bilanciato di costruzione di una molecola di **esoso** (glucosio), 6 molecole di **CO₂** si combinano con 6 di **RuDP** per formarne 12 di **PGA**.

Solo 2 molecole di **GP3** sono destinate alla sintesi di esosi, mentre le altre dieci (!!!) possono proseguire il ciclo per diventare, alla fine, 6 molecole di **RuDP**, pronte ad essere utilizzate di nuovo («rigenerazione del substrato»).

I conti tornano: 10 **GP3** significano 30 atomi di C ($10 \times 3 = 30$), così come 6 RuDP ($6 \times 5 = 30$).



METABOLISMO C3 o delle piante C3



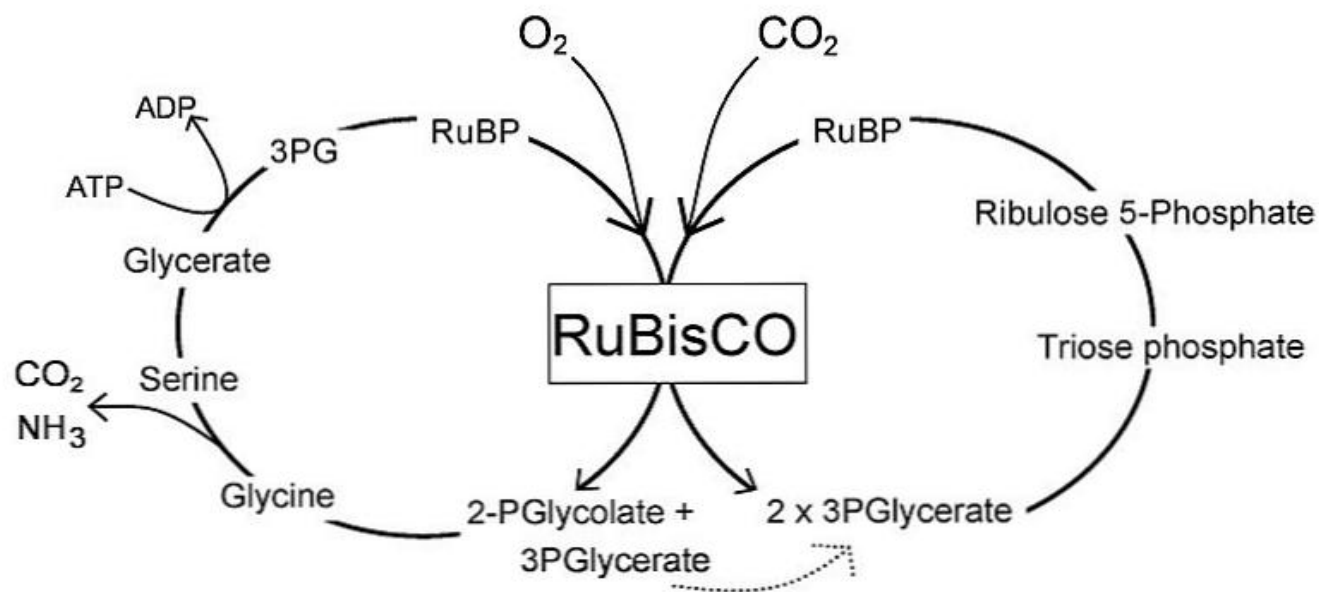
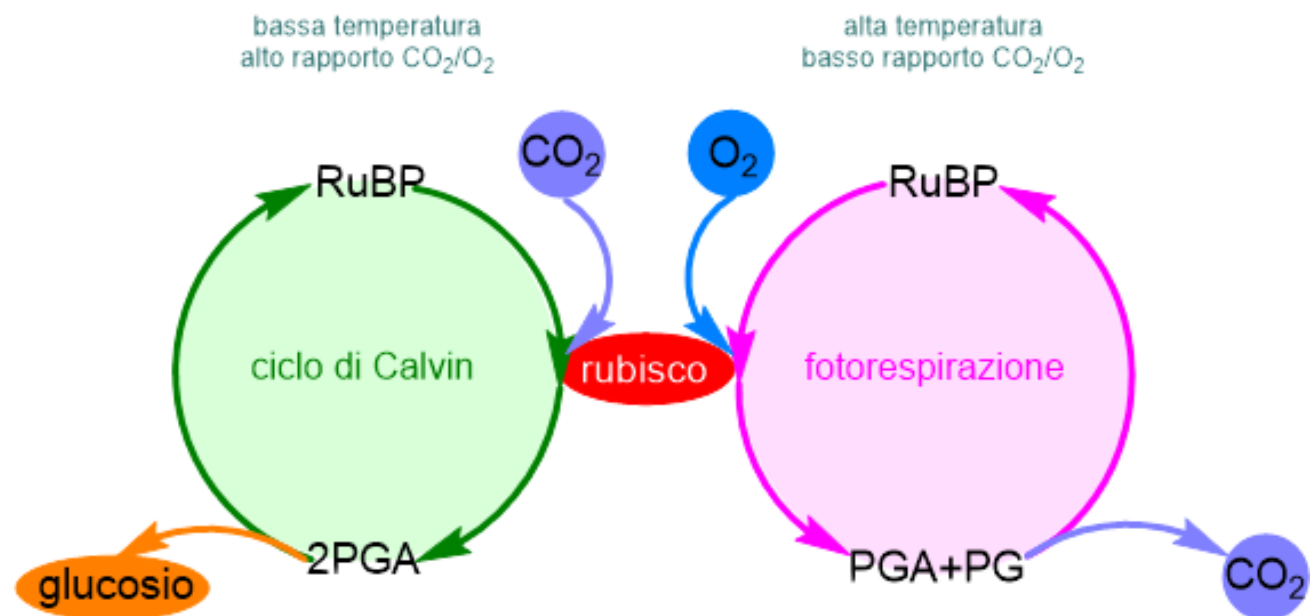


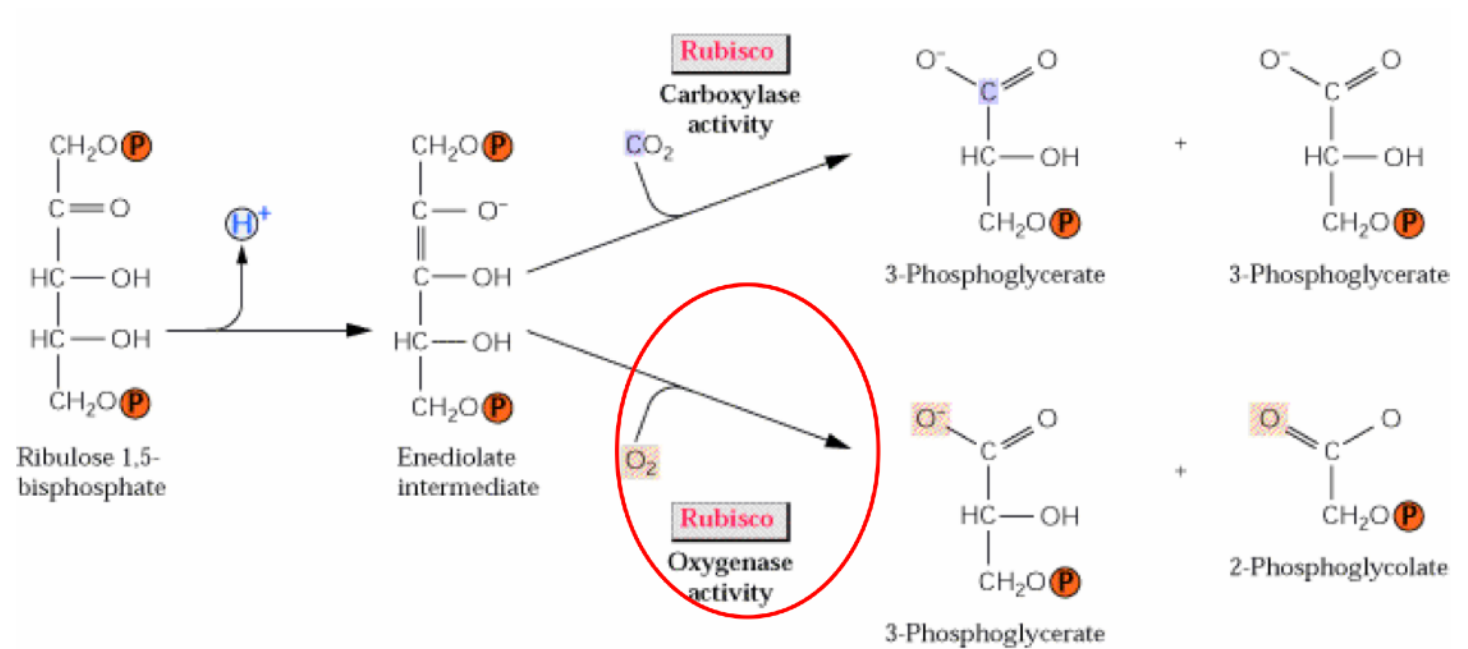
La **RibUlosio BlfoSfato Carbossilasi - Ossigenasi**, come dice il nome, ha la capacità di catalizzare l'unione del **RuDP** sia a una molecola di anidride carbonica, che a una molecola di ossigeno. Questa sua mancanza di specificità è probabilmente dovuta al fatto che questo enzima si è evoluto quando sul pianeta la quantità di ossigeno in atmosfera era molto bassa, e quella di anidride carbonica al contrario molto alta. Di conseguenza, questa sua mancanza di specificità non era un problema.

Tuttavia, le condizioni in cui l'enzima si trova a operare fanno sì che spesso il problema della ossigenazione del RuDP sia molto importante.

Perché è un problema? Perché l'ossigenazione del RuDP produce non due molecole di **3-fosfoglicerato**, ma una di 3-fosfoglicerato, e una di **2-fosfoglicolato** ($C_2O_3H_2$). Di conseguenza, il quantitativo di triosi prodotto è 1, e non 2. Questo ha ovvie conseguenze a cascata sui passaggi successivi, e in particolare impedisce la rigenerazione del RuDP, che deve essere prodotto per altre vie, con conseguente "spesa" in termini di energia.









A 25° Carbossilazione/ossigenazione = 3:1

Cosa succede quando la temperatura aumenta?



A 35° Carbossilazione/ossigenazione = 1:1





Per la LEGGE DI HENRY, a temperatura costante, la solubilità di un gas in un liquido è proporzionale alla pressione che il gas esercita sulla soluzione.

$$C = P \times \alpha$$

α = coefficiente di assorbimento alla temperatura T

C = volume di gas (riportato a 0°), assorbito alla pressione di 1 atmosfera da un volume unitario di acqua

Il coefficiente di assorbimento è diverso per ogni gas e diminuisce all'aumentare della temperatura; quindi un aumento di T determina una diminuzione della concentrazione di gas nella soluzione in misura diversa da gas a gas

A 25°C è di 1.3×10^{-3} mol/atm·L per l'ossigeno, e 3.4×10^{-2} mol/atm·L per l'anidride carbonica.

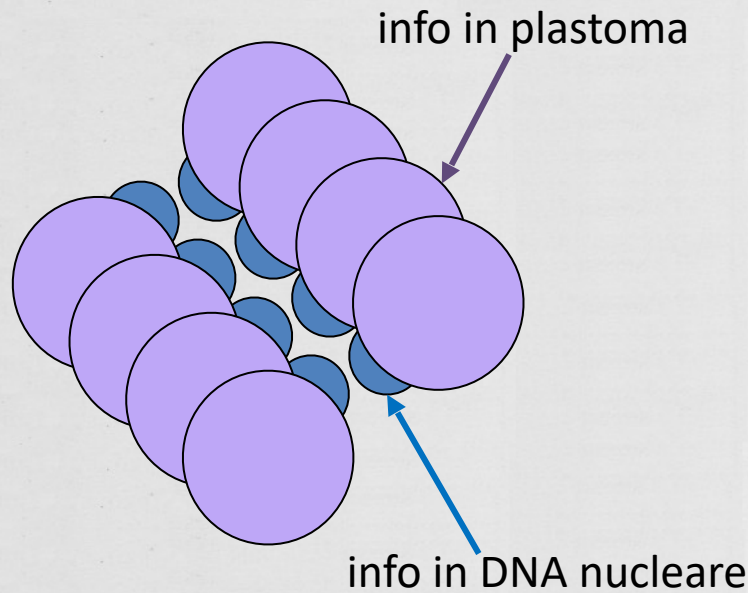




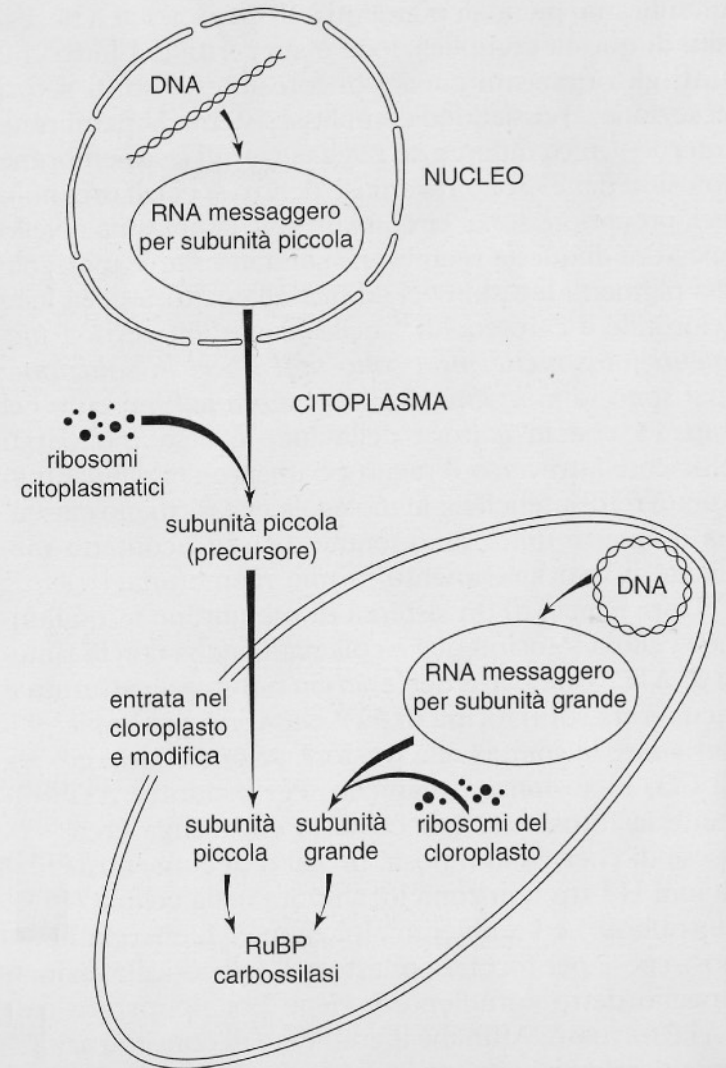
Temperature (°C)	α (CO ₂)	[CO ₂] (μ M in solution)	α (O ₂)	[O ₂] (μ M in solution)	$\frac{[\text{CO}_2]}{[\text{O}_2]}$
5	1.424	21.93	0.0429	401.2	0.0515
15	1.019	15.69	0.0342	319.8	0.0462
25	0.759	11.68	0.0283	264.6	0.0416
35	0.592	9.11	0.0244	228.2	0.0376



PS: il DNA che codifica per la RUBISCO sta in parte nel cloroplasto, in parte nel nucleo della cellula.



La ribulosibisfosfato carbossilasi (RuBP carbossilasi) dei cloroplasti è fatta da 8 subunità grandi e 8 subunità piccole. L'informazione per costruire la subunità grande è contenuta nel DNA dei cloroplasti, quella per costruire la subunità piccola nel DNA nucleare. Nel citoplasma viene sintetizzato un precursore della subunità piccola, di dimensioni maggiori di quelle definitive: una parte di questa molecola viene idrolizzata nel passaggio attraverso l'involucro del cloroplasto. Lo schema illustra in quali compartimenti cellulari avvengono le diverse fasi del «montaggio» della RuBP carbossilasi.





Tuttavia, non è solo “colpa” della temperatura.

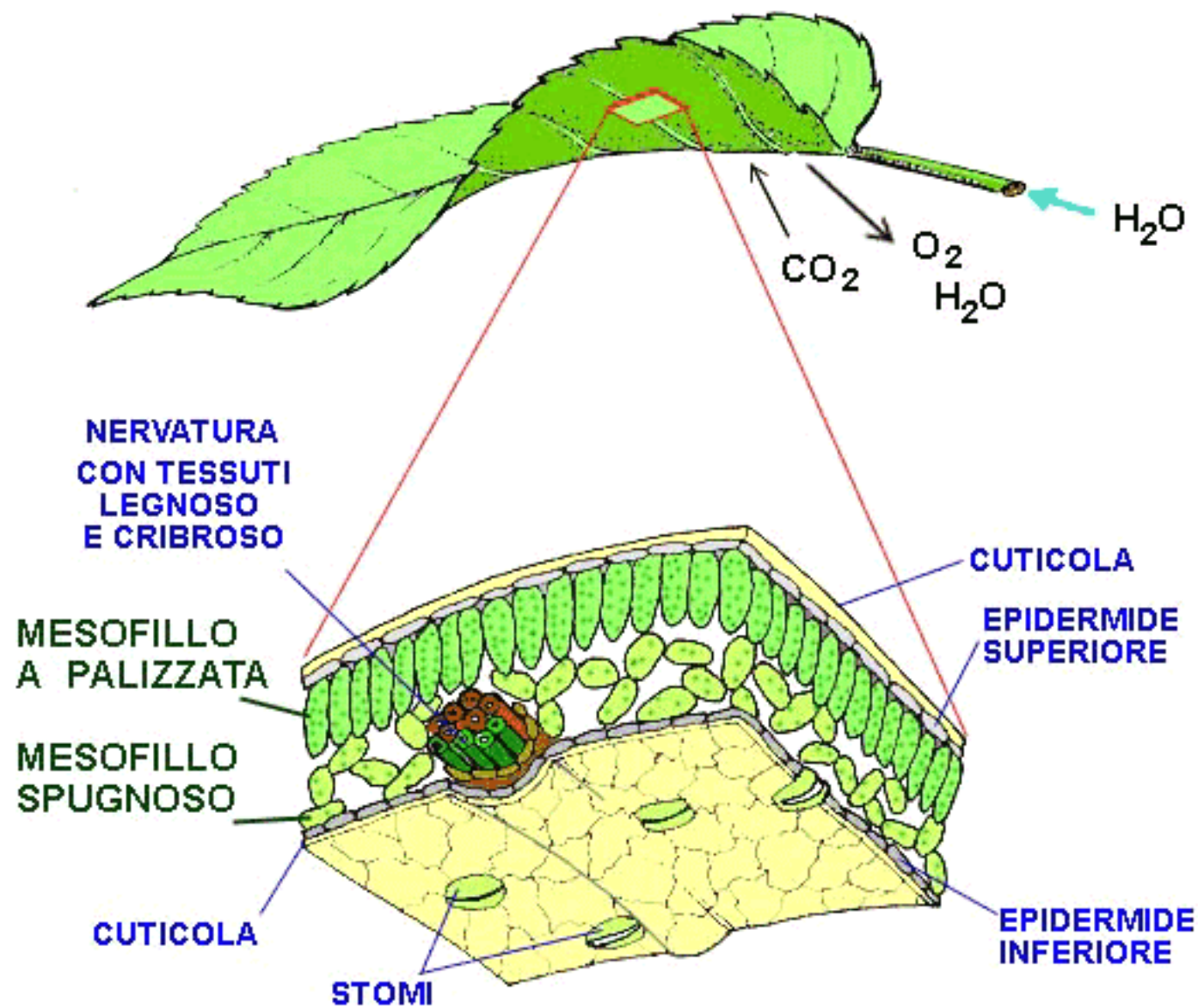
O meglio, la temperatura non agisce esclusivamente da sola, e solo direttamente sulla solubilità dei gas.

Conta anche l'acqua.

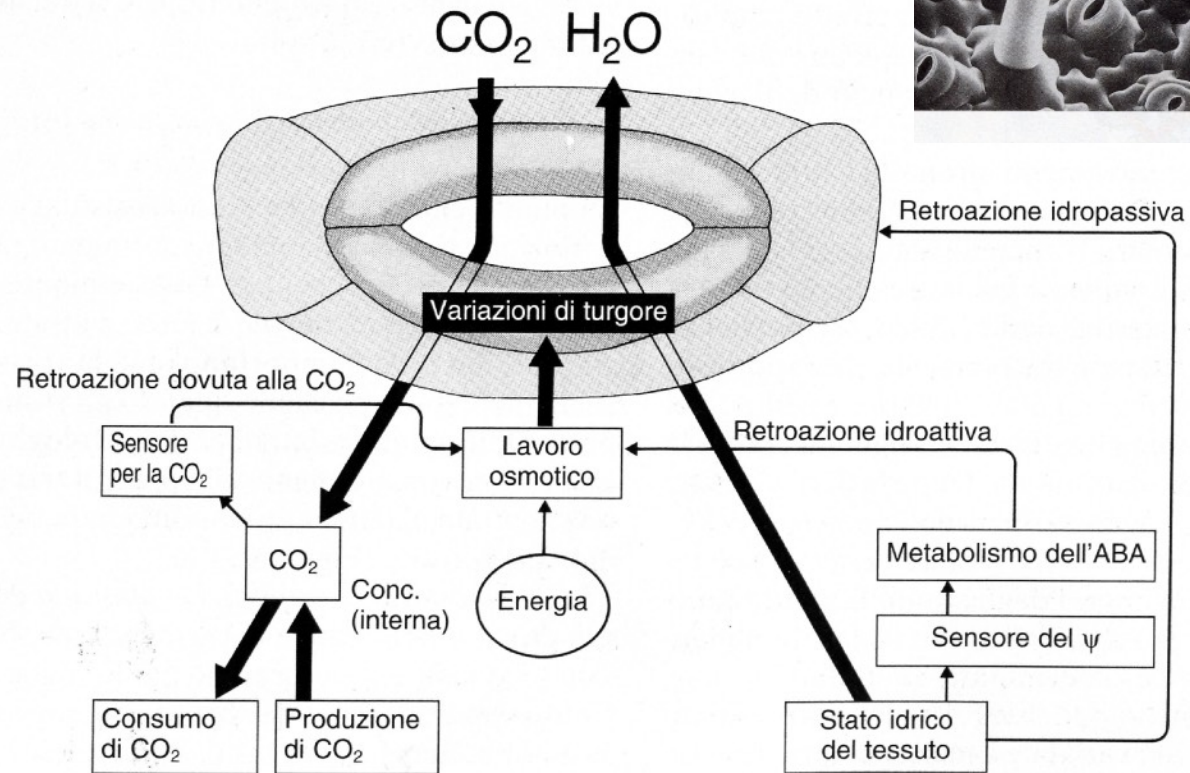
Sul pianeta il clima varia molto, specialmente in senso latitudinale dall'equatore ai poli. Abbiamo climi che variano da caldi e aridi, in particolare nei deserti, ai climi tropicali, caldi ma con abbondanza d'acqua, ai climi temperati, come il nostro, ove raramente hanno eventi di eccessiva aridità, a climi continentali freddi come quelli del nord Europa.

La disponibilità idrica, combinata con la temperatura, è un'altro fattore importante per l'equilibrio tra fotorespirazione e ciclo di Calvin.





Gli stomi



Modello di sistema di retroazione che interviene nel controllo dei movimenti di apertura degli stomi. I sensori per la concentrazione di CO_2 e per il potenziale idrico fogliare (ψ) sono situati nelle cellule stomatiche. ABA: acido abscissico (da RASCHKE).





Le piante si trovano costrette a gestire anche la quantità d'acqua che hanno a disposizione.

Se vi è abbondanza d'acqua, tenere gli stomi aperti anche a alte temperature non è un grosso problema, visto che le perdite possono essere compensate facilmente.

Tuttavia, in condizioni di scarsa disponibilità idrica o comunque quando l'evapotraspirazione non riesce a essere compensata, le piante si trovano costrette a chiudere gli stomi durante porzioni del giorno, o per l'intera giornata, per evitare perdite letali di acqua.

Tuttavia, la fotosintesi non si ferma, causando un aumento della concentrazione dell'ossigeno, e una diminuzione della concentrazione di anidride carbonica. A stomi chiusi non vi è ricambio dell'aria arricchita di ossigeno della foglia, con conseguente incremento della fotorespirazione, e consumo di energia per ripristinare gli intermedi di reazione del ciclo di Calvin.

Per questo, in alcuni gruppi di piante si sono evoluti metabolismi additivi al ciclo di Calvin, detto C₃. Questi sono i metabolismi C₄ e CAM.



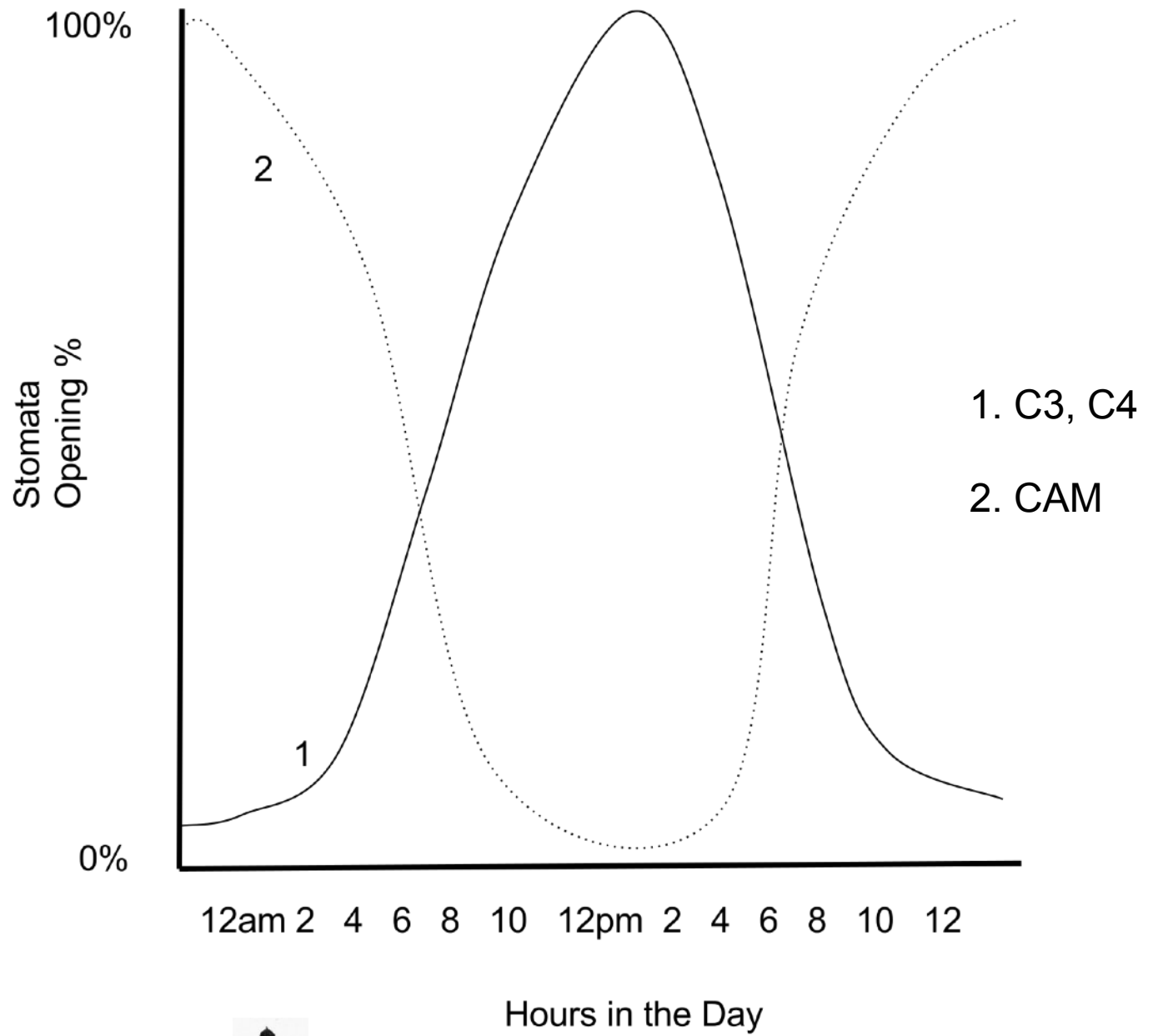


Le piante "CAM" aprono i loro stomi di notte, quando, negli ambienti in cui vivono, fa più freddo, e quindi l'acqua evapora più lentamente, e fissano l'anidride carbonica in composti a 4 atomi di carbonio che vengono conservati in grandi vacuoli.

Di giorno chiudono gli stomi e rilasciano l'anidride carbonica, saturando la RuBisCO e limitando la fotorespirazione. Questo metabolismo è fortemente limitato dalla capacità di immagazzinare carbonio nei vacuoli, e risulta quindi vantaggioso solo in ambienti con forte limitazione di disponibilità idrica.

Le altre piante (C3, C4) apre gli stomi durante il giorno, in risposta all'intensità della luce, l'umidità e la concentrazione di anidride carbonica.





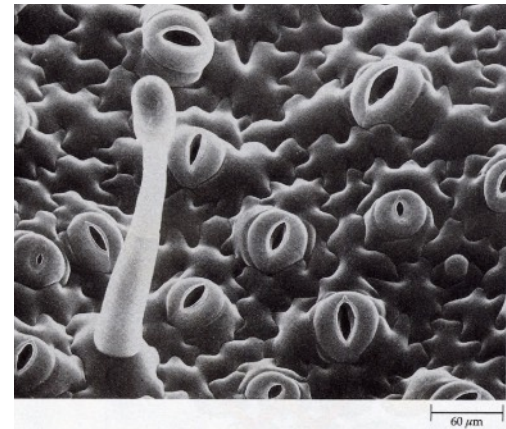


Nelle piante C3 e C4, quando le condizioni sono favorevoli all'apertura (ad esempio, elevata intensità di luce e alta umidità), una pompa protonica favorisce la fuoriuscita di protoni (H^+) dalle celle di guardia, con conseguente negativizzazione del potenziale elettrico. Questo fa aprire canali voltaggio-dipendenti per il potassio (K^+).

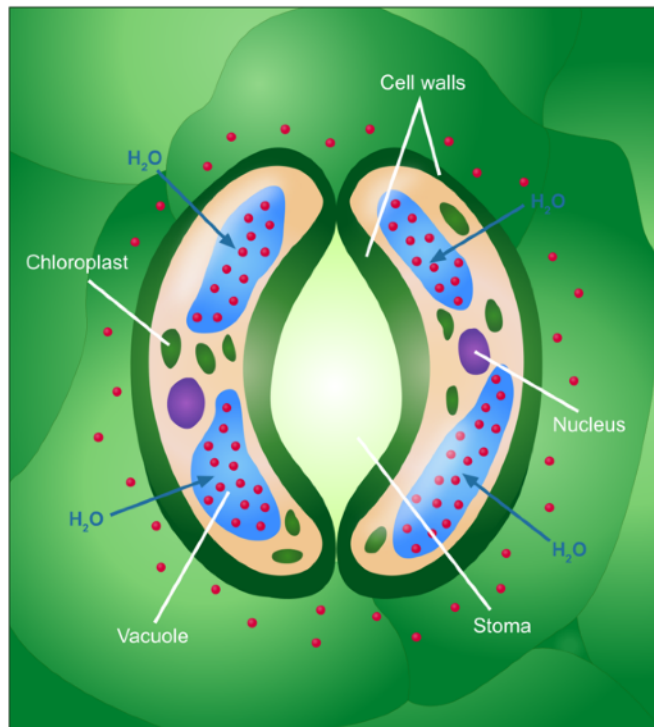
Per mantenere questa tensione negativa, anioni bilanciano l'afflusso di potassio. L'aumento della concentrazione di soluto abbassa il potenziale idrico della cellula, con conseguente afflusso d'acqua per osmosi, e aumento di volume e della pressione del turgore.

Quindi, a causa degli anelli di microfibrille di cellulosa che impediscono un aumento in larghezza, e al fatto che le estremità delle cellule di guardia sono tenute saldamente in posizione dalle cellule epidermiche circostanti, queste possono solo incurvarsi, creando un poro attraverso il quale i gas possono entrare e uscire dalla cellula.



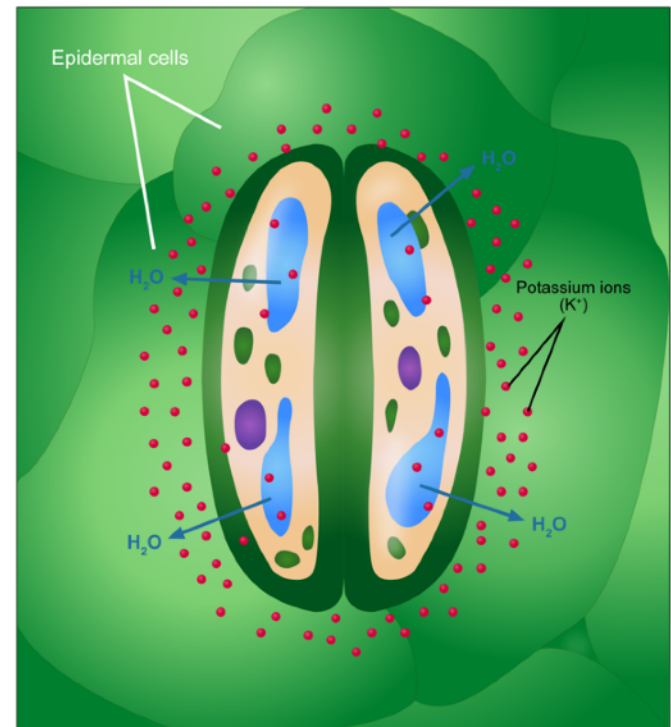


Guard cells (swollen)



Stoma opening

Guard cells (shrunken)



Stoma closing



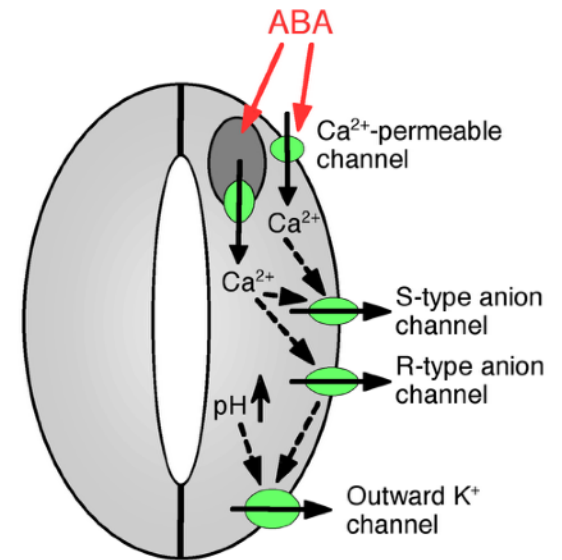
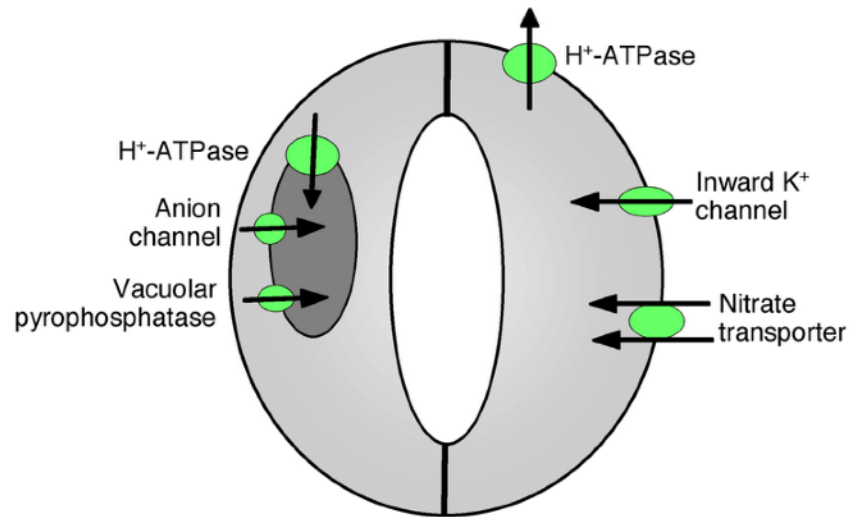
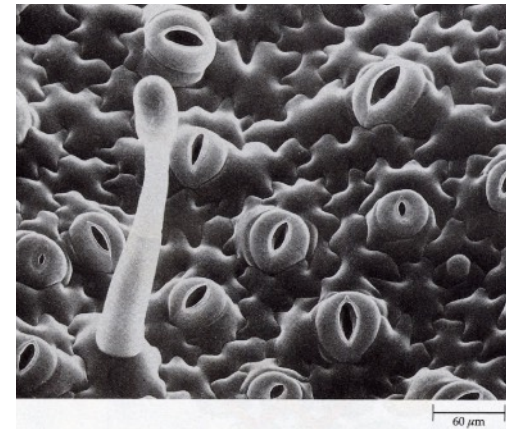


Quando le radici iniziano a percepire una carenza d'acqua nel terreno viene rilasciato acido abscissico (ABA).

Questo si lega alle proteine recettrici nella membrana plasmatica e del citosol delle cellule di guardia. Questo porta a un aumento del pH del citosol, e fa aumentare la concentrazione di ioni calcio (Ca^{2+}) liberi nel citosol tramite afflusso dall'esterno della cellula, e rilascio da depositi interni, come il reticolo endoplasmatico e i vacuoli.

Questo arresta l'assorbimento di ioni potassio (K^{+}) e, successivamente, la perdita di K^{+} . La conseguenza è un aumento del potenziale idrico, che si traduce nella diffusione dell'acqua fuori dalla cellula per osmosi, che si traduce nella chiusura dei pori stomatici.

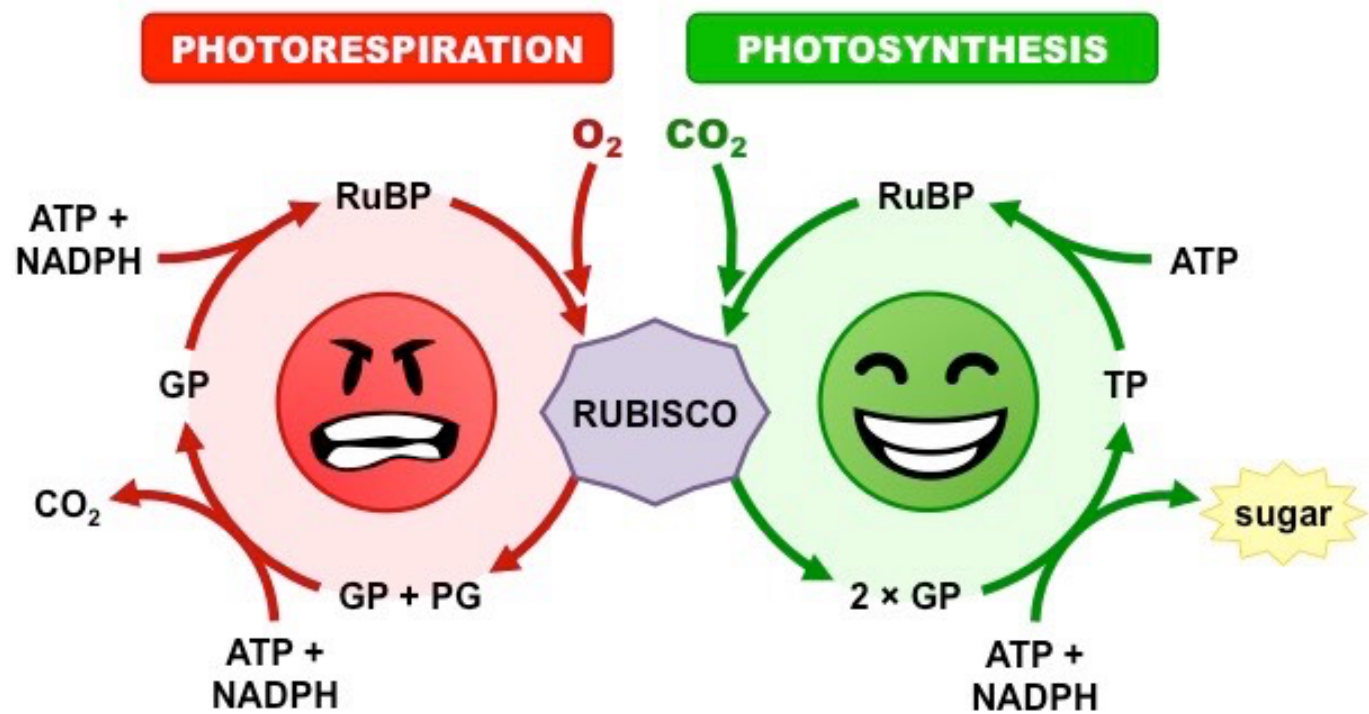






Fotosintesi C3, C4 e CAM







La estrema variabilità delle condizioni ambientali sul pianeta ha spinto le piante ad adattarsi per prosperare in ambienti diversi, sviluppando adattamenti che incrementassero l'efficienza fotosintetica anche in condizioni ove la fotorespirazione renderebbe la strategia C3 limitante, o addirittura inadatta alla sopravvivenza. Per questo si sono evoluti dei metabolismi aggiuntivi al classico ciclo **C3**, denominati **C4** e **CAM**.

La fotosintesi nelle piante **C4** prevede una **separazione spaziale** della fase luminosa da quella oscura, separazione che consente il “distanziamento” della fotolisi dell'acqua dal ciclo di Calvin.

Le piante **CAM** invece operano una **separazione temporale** tra la cattura dell'anidride carbonica (di notte) e la fotosintesi (di giorno), con conseguente possibilità di tenere gli stomi chiusi durante tutto il giorno.



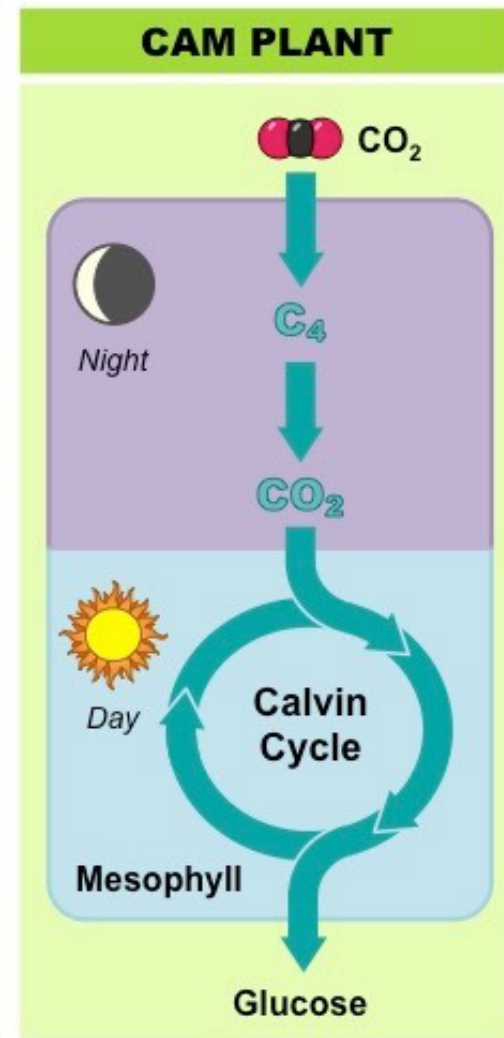
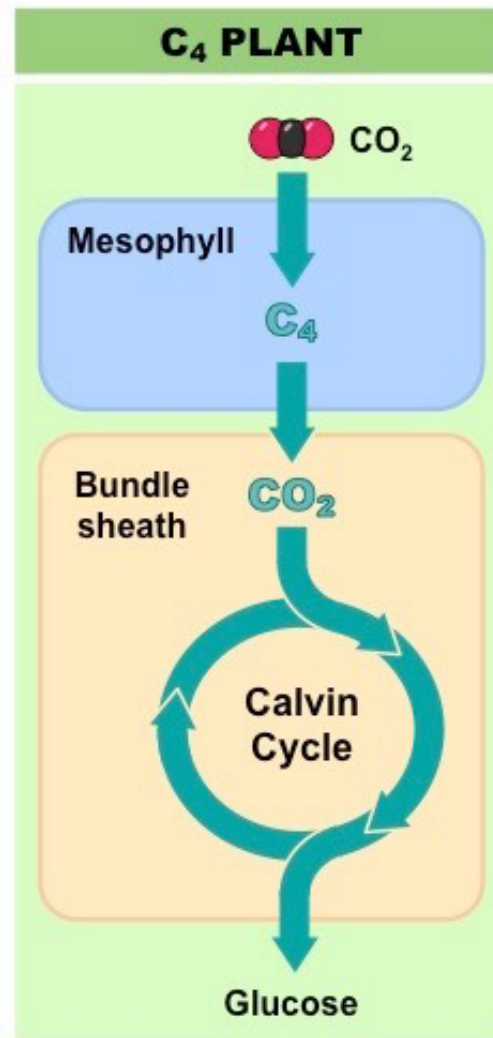
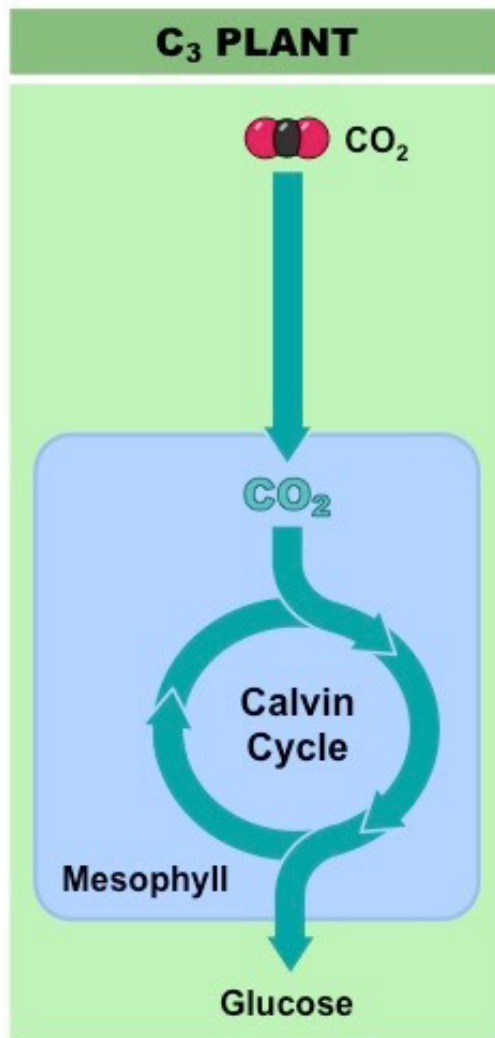


Si tratta di adattamenti fisiologici di piante che vivono in ambienti caratterizzati in genere da forte irraggiamento luminoso e temperature elevate.

Introducendo delle fissazioni temporanee pre-Ciclo di Calvin, alcune specie hanno raggiunto:

- i più elevati ratei fotosintetici (piante C4);
- il più efficiente uso dell'acqua (piante CAM).





Comparison of C₃, C₄, and CAM plants

C3 plants	C4 plants	CAM plants
Most plants	Tropical grasses like corn, sugarcane	Succulents, pineapple, agave
Fix carbon in Calvin cycle - attach CO ₂ to RuBP	Fix carbon in cytoplasm - attach CO ₂ to PEP	Fix carbon at night only, fix it to organic molecules
Enzyme - Rubisco	Enzyme - PEP-ase	Enzyme - PEP-ase
Most energy efficient method	1/2 way between these two	Best water conservation
Loses water through photorespiration	Loses less water ←→	Loses least water

