ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXIV — Nr 2
1955

Badanie syntezy i hydrolizy sacharozy w żywych komórkach

Investigations on the synthesis and hydrolysis of sucrose in living cells

Z. TURNOWSKA-STARCK

WSTĘP

Pierwotnym celem niniejszej pracy było dokładne zbadanie, w jaki sposób kształtuje się stosunek syntezy do hydrolizy sacharozy w różnych fazach rozwoju owsa. (Praca wykonana w 1951 r. i 1952 r.) Chodziło nam o uchwycenie zależności pomiędzy zmianami biochemicznymi w roślinie a jej stadialnym rozwojem.

By rozwiązać powyższe zagadnienie, należało zbadać działanie inwertazy „in vivo". W tym celu postanowiliśmy zastosować do naszych badań metodę infiltracji próżniowej Kursanowa, przy pomocy której wielu badaczy radzieckich z powodzeniem badało działanie enzymów hydrolitycznych.

Niestety jednak z dokładnym opisem powyższej metody nie mogliśmy się zapoznać, gdyż odnośny tom „Biochimiji" z 1936 roku nie znajduje się w żadnej z naszych bibliotek. Kierując się więc ogólnymi wskazówkami, zamieszczonymi w pracy Oparina i Zenczenki (1949) oraz w podręczniku Biełozjerskiego i Proskuriakowa (1951) zmuszeni byliśmy wypracować techniczne szczegóły metody, wyszukać źródła błędów i ich wielkość oraz określić warunki, w jakich metoda ta daje wyniki najbardziej dokładne.

Oparin i Zenczenko w swej pracy podają następujący opis metody infiltracji próżniowej w zastosowaniu do badania działania inwertazy. Do badanych roślin wprowadzano 0,2 molarny roztwór cukru inwertowanego — przy badaniu syntetycznej działalności inwertazy, lub 0,1 molarny roztwór sacharozy, przy oznaczaniu działalności hydrolitycznej. Kontrolę stanowiła identyczna odważka roślin infiltrowana w takich samych warunkach wodą destylowaną.

W podręczniku Biełozjerskiego i Proskuriakowa podane jest, że infiltrację przeprowadza się w 150 ml zlewkach, w których

badaną próbkę zalewa się 80—100 ml badanego roztworu lub wody destylowanej. Przygotowane próbki umieszcza się w eksykatorze próżniowym, z którego przy pomocy pompy próżniowej usuwa się powietrze, zmniejszając ciśnienie do 20—40 mm Hg. Usuwanie powietrza przeprowadzać należy tak długo, aż z liści przestaną się wydobywać pęcherzyki powietrza. Po odłączeniu eksykatora od pompy do środka wpuszcza się (pomału, w ciągu 1—2 min.) powietrze. Wzrastające stopniowo ciśnienie wpycha badany roztwór do przestworów międzykomórkowych roślin. Dobrze zinfiltrowany liść nie powinien wykazywać po infiltracji jasnych plam, do których nie wniknął roztwór. Po wyrównaniu ciśnień liście powinny leżeć 2—3 min. w tych samych roztworach.

W obu pracach autorzy zalecają szybkie i dokładne opłukanie wodą powierzchni liści bezpośrednio po wyjęciu ich z badanego roztworu, po czym umieszczenie ich w przewiewnych szafach, by nadmiar wody, wprowadzony w czasie infiltracji do przestworów międzykomórkowych, wyparował w stosunkowo krótkim czasie. By przyspieszyć przesychanie liści, Biełozjerski i Proskuriakow radzą nanizanie liści na nitkę i zawieszenie w przewiewnym termostacie o temp. 26—28°C. Okres podsuszania może być dość różny i wahać się według wspomnianych autorów od 8—25 min. Po podsuszeniu roślin umieszcza się je w termostacie w 22—24°C w ciemności pod szklanym kloszem w atmosferze nasyconej wilgocią. Czas trwania doświadczenia od infiltracji do zabicia tkanek wynosi od 2—3 godz., a w wyjątkowych wypadkach dłużej.

W toku pracy nasuwały się coraz nowe problemy i obok pierwotnego celu — prześledzenia syntezy i hydrolizy sacharozy w różnych okresach rozwoju owsa, postanowiliśmy zbadać kinetykę syntezy i hydrolizy sacharozy „in vivo" oraz wpływ szeregu czynników chemicznych na równowagę działania enzymów syntetyzujących i hydrolizujących sacharozę.

Część doświadczalna

I. OPIS METODY

1. *Dobór próbek*

Pierwszym zagadnieniem, które nastręczyło pewne trudności był dobór próbek. Najczęściej badaliśmy 2—3 g świeżej masy liści pozbawionych nerwu głównego lub w wypadku roślin młodych (do 30 dni) brano całą część nadziemną. We wstępnych doświadczeniach stwierdziliśmy, że w liściach pochodzących z różnych pięter, a nawet z tych samych pięter, lecz z różnych roślin zawartość cukrów ulega znacznym wahaniom. Dlatego też w wypadku liści starszych stosowaliśmy metodę połówek liściowych; jedną połówkę infiltrowaliśmy wodą — (kontrolna), a drugą — odpowiednim roztworem. Po upływie 1 do 2 godzin rośliny zabijaliśmy przez

wrzucenie ich do wrzącej wody i gotowanie w ciągu 5 min.; po ostudzeniu rośliny poddawano 3 min. homogenizacji. We wszystkich wypadkach cukry oznaczaliśmy mikrometodą Fujita Akiji i Danzo Iwotake (1931). W metodzie tej żelazicjanek potasu utlenia cukry redukujące w alkalicznym roztworze na gorąco. Nadmiar żelazicjanku miareczkuje się jodometrycznie tiosiarczanem, używając skrobi jako wskaźnika. Odbiałczenie materiału roślinnego przeprowadza się przy pomocy wodorotlenku kadmu. By sprawdzić dokładność metody, oznaczyliśmy zawartość cukrów w połówkach liściowych (tabela 1) owsa nieinfiltrowanego. Cukry proste oznaczaliśmy bezpośrednio, natomiast dwucukry (sacharozę) po 2-godzinnej hydrolizie inwertazą drożdżową w temp. 56—60°C.

Tabela 1
Analiza zawartości cukrów w połówkach liściowych 91 dniowych liści owsa
(25.VII.51 r.)

Rodzaj cukrów	Zawartość cukrów w mg na 1g świeżej masy		% błędu
	I połówka	II połówka	
Proste	5,096	5,184	0,8
dwucukry	19,156	19,244	0,2
ogółem	24,252	24,428	0,4
proste	6,502	6,414	0,8
dwucukry	19,507	19,771	0,7
ogółem	26,009	26,185	0,4

Z tabeli 1 widać, że powyższa metoda jest dostatecznie dokładna, ponieważ różnice w zawartości cukrów w połówkach liściowych nie przekraczają 0,8% (licząc od średniej arytmetycznej).

2. *Stężenie roztworów użytych do infiltracji*

Chcąc badać wielkość hydrolizy i syntezy sacharozy rośliny infiltrowaliśmy:

1) wodą destylowaną — kontrola
2) 2,5% sacharozą — badanie hydrolizy sacharozy
3) 2,5% cukrem inwertowanym (hydrolizowano sacharozę przy pomocy inwertazy drożdżowej, po czym roztwór gotowano 15 min. i sączono) — badanie syntezy sacharozy.

Przy użyciu takiej koncentracji, do roślin wprowadzaliśmy od 6 do 10 mg cukru na 1 g świeżej masy roślin.

3. *Warunki infiltracji*

Infiltrację przeprowadzaliśmy w dużych probówkach, w których umieszczano odważoną próbkę, zalewano odpowiednim roztworem i przykrywano z wierzchu siatką, by rośliny nie wypływały na powierzchnię w czasie infiltracji. Roztworu używaliśmy ok. 50 ml. Probówki zamykaliśmy szczelnie korkiem gumowym i łączyli z pompą ssącą, wyciągając powietrze do ok. 20 mm Hg.

Po ok. 2 min. pompę odłączaliśmy i powoli wprowadzaliśmy powietrze do probówki. Rośliny młode infiltrowały się bardzo łatwo, co można poznać po zmianie zabarwienia liści (ciemne, przezroczyste), natomiast przy badaniu starszych roślin usuwanie powietrza z probówek powtarzano 2, a czasem 3-krotnie. Po infiltracji pozostawialiśmy rośliny w roztworze jeszcze w ciągu 2—3 min. (zgodnie z podanym opisem metody Kursanowa), po czym listki opłukiwaliśmy, a w dalszych doświadczeniach tylko obsuszali bibułą i ważyli.

W pierwszym roku doświadczeń rośliny po infiltracji trzymaliśmy przez cały czas na świetle. Wówczas szparki otwierają się, co ułatwia szybkie wytranspirowanie nadmiaru wody (Mothes, 1933) z przestworów międzykomórkowych. Z drugiej strony na świetle, dzięki procesowi asymilacji, liść, w którym przestwory międzykomórkowe są pozbawione powietrza, ma lepsze warunki tlenowe (tlen wydzielany w procesie asymilacji może być przez roślinę wykorzystany (Kursanow, Isajew, Potapenko, 1947). Na świetle jednak intensywnie przebiega kondensacja glukozy na skrobię, co może dość znacznie zmieniać obraz przemiany glukozy na sacharozę, a prócz tego w czasie fotosyntezy powstają cukry, których ilości nie kontrolujemy. Dlatego też w drugim i trzecim roku doświadczeń po infiltracji przechowywaliśmy rośliny w ciemności początkowo w termostacie z przewiewem (w temp. 26—28^{0}C), a po odparowaniu nadmiaru wody, pod kloszem szklanym w wilgotnej atmosferze wstawionym do ciemnego termostatu o tej samej temperaturze (zgodnie z opisem metody Kursanowa).

4. *Wpływ infiltracji na rośliny*

By przekonać się, jak wpływa sama infiltracja próżniowa na rośliny, czy komórki nie są przy tym uszkadzane, poddaliśmy 10 min. infiltracji próżniowej siewkę 30-dniowego owsa (wyjętą delikatnie z wazonów, starano się jak najmniej uszkodzić system korzeniowy), po czym umieszczaliśmy ją w pożywce Knopa, umieszczając obok analogiczną roślinę nieinfiltrowaną. Roślina infiltrowana rosła nieco wolniej i straciła kilka dolnych listków. Liście młodsze nie wykazywały żadnych uszkodzeń.

Analogiczne doświadczenia wykonał Björksten (1930) z siewkami pszenicy, hodowanymi w wacie szklanej w małych kolbkach. Po poddaniu pewnej serii roślin infiltracji próżniowej obserwował on wzrost przez 6 tygodni i nie zauważył żadnych różnic pomiędzy serią infiltrowaną a kontrolną.

W doświadczeniach Björksteną przytoczony jest również wpływ infiltracji na intensywność oddychania. Dane umieszczono w tabeli 2.

Tabela 2

Ilość wydzielonego CO_2 przez 50g etiolowanych roślin wg Björkstena

Rodzaj próbki	po 0,0 godz.	po 3 godz.	po 6 godz.
Nieinfiltrowane	22,8	49,3	54,2
Infiltrowane wodą	21,6	—	52,4

Z danych tych wynika, że sama infiltracja nie wpływa na oddychanie.

Nieco inne dane przytacza Mothes (1933), który zaobserwował znaczny spadek ilości wydzielonego CO_2 bezpośrednio po infiltracji. Po upływie 3—4 godzin rośliny infiltrowane oddychały intensywniej niż kontrolne.

W przytoczonej pracy Mothes podaje również, że współczynnik oddechowy $\left(\frac{CO_2}{O_2}\right)$ u roślin infiltrowanych wzrasta do 4—6, co świadczy o niedostatecznym dopływie tlenu do komórek po infiltracji.

By stwierdzić, jak wpływa infiltracja próżniowa na kierunek działania enzymów, oznaczyliśmy cukry w połówkach liściowych, z których jedne infiltrowano wodą destylowaną (tabela 3).

Tabela 3

Analiza cukrów w połówkach liściowych 80 dniowych siewek owsa a) połówki liściowe infiltrowane wodą, b) nieinfiltrowane (doświadczenie prowadzone na świetle 14.VII.5)

Rodzaj cukrów	a Infiltr. wodą	b Nieinfiltr.	Różnica w zawartości cukrów
proste	6,243	5,843	+0,400
	5,523	5,363	+0,160
dwucukry	22,251	24,092	—1,841
	16,568	18,809	—2,241
ogółem	28,494	29,935	—1,441
	22,091	24,172	—2,081

w mg na 1 g świeżej masy

Z tabeli wynika, że w czasie infiltracji wodą, część cukrów przechodzi z rośliny do wody (od 1,44 do 2,08 mg na 1 g świeżej masy). Pomimo tej

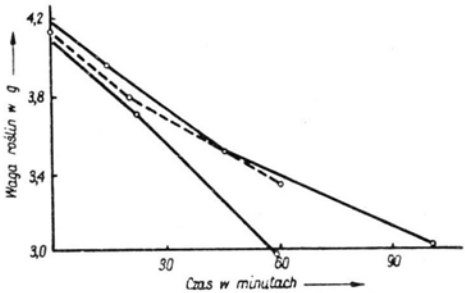
dość znacznej straty w zawartości cukrów, analizy wykazały wzrost ilości cukrów prostych, co nasuwa przypuszczenie, że wprowadzenie wody do przestworów międzykomórkowych powoduje przesunięcie równowagi enzymatycznej w kierunku hydrolizy z powodu nadmiernego uwodnienia komórek, a być może i częściowego zahamowania oddychania. Podobne zaburzenia spowodowane infiltracją stwierdzili McCready i W. Z. Hassid (1941) w pracy, w której badano syntezę sacharozy z różnych cukrów.

W dalszych doświadczeniach zbadaliśmy, czy w czasie infiltracji sacharozą nie wypłukują się cukry proste. W tym celu zanalizowaliśmy roztwór po infiltracji i stwierdziliśmy w nim pewną ilość cukrów prostych, co w przeliczeniu na 1 g św. masy wynosiło 1,26 mg cukrów prostych.

W pracy na temat udziału fosforu w syntezie skrobi Rubin i Sokołowa (1947) stwierdzają, że infiltracja wodą powoduje zmiany w zawartości skrobi i fosforu nieorganicznego, co również świadczy o pewnych zaburzeniach spowodowanych nadmiernym uwodnieniem lub samą infiltracją.

Zarówno Kursanow jak i Mothes (1933) podkreślają wyraźnie, że powodzenie metody infiltracji próżniowej uzależnione jest od tego, w jakim czasie wyparuje z roślin nadmiar wody, wprowadzonej w czasie infiltracji do przestworów międzykomórkowych.

W naszych doświadczeniach rośliny powracały do początkowej wagi po 1—2 godz. w temperaturze 26—28°C. Kilka takich doświadczeń ilustruje rycina 1.



Ryc. 1. Przebieg transpiracji liści owsa po infiltracji wodą. Waga roślin przed infiltracją 3,00 g; doświadczenie z dn. 2.IV.53.

— — — — liście nanizane na nitki i zawieszone

———— liście umieszczone na bibule

W przytoczonym doświadczeniu stwierdziliśmy, że rośliny szybciej tracą nadmiar wody, jeżeli umieszczone są na bibule bezpośrednio na półkach termostatu z przepływem powietrza, niż w przypadku nanizania liści na nitki, co zresztą jest nieco uciążliwe, zwłaszcza wtedy, gdy do doświadczeń bierze się drobne listki. Niestety nigdy nie stwierdzaliśmy, by rośliny nadmiar wody traciły już po kilku minutach, jak to podają Białozjerski i Proskuriakow (1951) w swoim podręczniku.

5. *Sposób obliczania wyników*

Wielkość syntezy oraz hydrolizy oznaczano w procentach, w stosunku do cukrów zaabsorbowanych przez roślinę. Na przykładzie wyników zamieszczonych w tabeli 4 podaję sposób obliczania wyników hydrolizy.

Tabela 4
Doświadczenia prowadzono w temp. 25°C w ciągu 2 godzin w ciemności

Rodzaj próbki	Cukry w mg na 1 g św. masy		
	proste	dwucukry	ogółem
Inf. sacharozą	11,311	5,837	17,148
Inf. H_2O	8,513	1,338	9,851
Różnica	2,798	4,499	7,297

Jeśli cukrów prostych przybyło 2,798, a ogółem przybyło 7,297 mg/1 g, to hydroliza wynosi $\frac{2{,}798 \cdot 100}{7{,}297} = 38{,}3\%$. Analogicznie obliczamy syntezę wyrażając ją w procentach zwiększenia ilości dwucukrów w stosunku do ogólnej ilości cukrów zaabsorbowanych przez 1 g roślin. Taki sam sposób obliczania podaje Biełozjerski i Proskuriakow, natomiast w pracach innych radzieckich autorów zarówno synteza jak i hydroliza jest wyrażona w mg cukrów prostych.

II. ANALIZA WYNIKÓW

Doświadczenia nad syntezą i hydrolizą sacharozy prowadziliśmy w 1951, 1952 i 1953 r. Początkowo chcieliśmy stwierdzić, jak kształtuje się stosunek syntezy do hydrolizy w różnych okresach wegetacji owsa i tytoniu. Prace nad owsem prowadziliśmy w 1951 i 1952 r. z odmianą Proporczyk. Niestety wyniki doświadczeń z roku 1951 i 1952 obrazujące stosunek syntezy do hydrolizy w różnych fazach rozwoju owsa różniły się bardzo znacznie między sobą, a nawet były sprzeczne. Z doświadczeń tych nie można wyciągać żadnych wniosków, ponieważ w obu latach doświadczenia przeprowadzano w nieco inny sposób (w pierwszym roku liście opłukiwano po infiltracji i doświadczenia prowadzono na świetle, w drugim roku w ciemności i liści po infiltracji nie płukaliśmy).

Poważnym błędem przy oznaczaniu stosunku syntezy do hydrolizy, w ciągu całego okresu wegetacji, mogą być zmiany w zawartości cukrów w roślinach w zależności od wieku. W obu latach stwierdzono, że ilość cukrów ogółem wzrasta od ok. 2,5 mg na 1 g świeżej masy w młodych stadiach do ok. 36 mg u roślin starszych. W czasie infiltracji natomiast zaw-

sze wprowadzaliśmy jednakową ilość cukrów ok. 6—10 mg czyli w liściach młodych roślin przez infiltrację odpowiednim roztworem zwiększaliśmy zawartość cukrów 2 do 3-krotnie, podczas gdy pod koniec okresu wegetacji wprowadzone cukry stanowiły 1/6 do 1/4 ilości cukrów znajdujących się w roślinie. Dlatego też przebieg reakcji enzymatycznych na początku i na końcu wegetacji śledzonych w ten sposób, nie może dać porównywalnych wyników.

Być może, że sprzeczne wyniki otrzymane w 1951 i 1952 roku wypływają również z nieprawidłowego doboru próbek branych do doświadczeń, to zagadnienie bowiem nastręczało nam bardzo wiele trudności.

Z roślin młodych (do ok. 30 dni) braliśmy całą część nadziemną, natomiast z roślin starszych braliśmy zawsze 3 najmłodsze listki. Oczywiście przy takim wyborze próbki popełnialiśmy błąd, ponieważ najmłodsze listki nie reprezentowały całej rośliny.

Liczne prace badaczy radzieckich, wykonywane tą metodą, wykazały, ze poszczególne piętra a nawet poszczególne części liści różnią się dość znacznie pod względem równowagi enzymatycznej.

Wyniki analiz prowadzonych w różnych okresach rozwoju roślin posłużyły jednak jako materiał do zestawienia, w jakich warunkach metoda infiltracji daje dobre wyniki i jak przedstawia się zgodność oznaczeń syntezy i hydrolizy w 2 równoległych próbkach (tzn. analogiczne odważki infiltrowano takimi samymi roztworami). Procent błędu obliczano od średniej arytmetycznej.

Tabela 5

Błąd w % pomiędzy dwoma równoległymi próbkami obliczony w stosunku do średniej arytmetycznej

(Zestawienie ogólne z doświadczeń dokonanych na różnych roślinach i w różnych warunkach)

% błędu	Synteza		Hydroliza	
	ilość dośw.	w %	ilość dośw.	w %
0—10	19	41,5	37	65,0
10—20	11	23,9	14	24,5
20—30	8	17,4	2	3,5
30—40	2	4,3	2	3,5
40—50	2	4,3	1	1,75
50—60	2	4,3	0	0,0
pow.60	2	4,3	1	1,75
	Σ 46	100,0	Σ 57	100,0

Z powyższego zestawienia widać, że metoda ta daje wyniki nie zawsze zgodne, przy czym rzuca się w oczy większa zgodność przy oznaczaniu hydrolizy.

Prócz 57 wyników hydrolizy i 46 syntezy zaobserwowano w 5 doświadczeniach przy badaniu syntezy w równoległych próbkach wyniki całkiem nieporównywalne (w jednej próbce synteza wynosiła 0%, a nawet próbki infiltrowane cukrem inwertowanym wykazywały niższą zawartość dwucukrów od próbek kontrolnych, infiltrowanych wodą, a w drugiej równoległej wynosiła od 15 do 56%) i w trzech doświadczeniach, w których wyniki wielkości hydrolizy były nieporównywalne.

Do powyższego zestawienia wzięto wyniki doświadczeń przeprowadzanych na różnych roślinach. Przeważającą ilość doświadczeń przeprowadzano z owsem, tytoniem oraz po dwa doświadczenia z pomidorami, po jednym z burakami cukrowymi, cebulą Wolską, ziemniakami, marchwią, fasolą. Zwraca na siebie uwagę fakt, że najgorsze wyniki otrzymaliśmy w doświadczeniach z tytoniem. Stwierdzono, że tytoń w liściach zawiera bardzo duże ilości skrobi i być może część wprowadzanych cukrów prostych zostaje przerabiana na polisacharydy.

Lepsze też na ogół wyniki otrzymywaliśmy w doświadczeniach wykonywanych na roślinach młodych.

By stwierdzić, skąd pochodzą poważne błędy między równoległymi próbkami, staraliśmy się zawsze obliczać bilans cukrów to znaczy obliczaliśmy, ile cukrów weszło do rośliny w czasie infiltracji i ile tych cukrów oznaczono analitycznie na końcu doświadczenia.

Przybliżoną ilość cukrów zaabsorbowanych oznaczaliśmy z różnicy wagi przed i po infiltracji; rośliny przed doświadczeniem ważyły 2 g, a po infiltracji 2,5 g czyli do roślin weszło 0,5 g roztworu np. 2,5% sacharozy czyli 12,5 mg sacharozy na 2 g roślin, a stąd 6,25 mg na 1 g roślin.

W celu stwierdzenia, z jaką dokładnością można obliczać ilość zaabsorbowanych cukrów z różnicy wagi, zinfiltrowano liście owsa sacharozą o koncentracji 1,25, 2,5 i 5,0%, zabito bezpośrednio po infiltracji i oznaczono analitycznie ilość pobranych cukrów (tabela 6).

Tabela 6

Wpływ stężenia roztworu na ilość pobranych cukrów przez roślinę

(roślin nie płukano po infiltracji; doświadczenie wykonano na świetle—26.II.1915

46-dniowe siewki owsa

Infiltrowane sacharozą	Cukrów przybyło w mg na 1 g św. masy	
	oznaczenie analit.	z różnicy wagi
1,25%	4,202	4,500
2,50%	8,039	8,500
5,00%	16,900	16,750

Jak widać, metoda ta daje całkowicie zgodne wyniki i może być używana do przybliżonego oznaczenia bilansu cukrów.

Widzimy też, że ilość zaabsorbowanych cukrów jest ściśle proporcjonalna do stężenia użytego roztworu.

Analogiczny wniosek wyciągają Kursanow i Pawlinowa (1952) ze swoich doświadczeń prowadzonych nad burakiem cukrowym.

W wielu wypadkach jednak analitycznie nie stwierdziliśmy takiej samej ilości cukrów. Początkowo przypuszczano, że część cukrów wypłukuje się wodą w momencie, gdy po infiltracji obmywano liście wodą wodociągową. Przeprowadziliśmy więc szereg doświadczeń, w których nie płukano roślin po doświadczeniu, a zamiast płukania wycierano bardzo dokładnie powierzchnię liści bibułą filtracyjną.

Tabela 7

Bilans cukrów w liściach płukanych i niepłukanych po infiltracji

Wyniki zebrano z doświadczeń prowadzonych w 1951, 52, 53 r. na różnych roślinach.

Średnie z oznaczeń	Cukry w mg na 1 g świeżej masy	
	Płukane—średnia z 71 doświadczeń	Niepłukane—średnia z 114 doświadczeń
Oznaczenia analit.	5,564	9,472
„ z różnicy wagi	7,405	9,145
Różnica	+1,841	+0,327
Niezgodność powyżej 2 mg na 1 g świeżej masy	w 42 doświadczeniach co stanowi 59%	w 20 doświadczeniach co stanowi 18%
Maksymalne różnice	—4,678 do +3,926	—5,385 do + 6,811

Wyniki doświadczeń zebrano w tabeli 7.

Z powyższych danych wynika, że istotnie duże ilości cukrów wypłukiwały się w czasie obmywania roślin po infiltracji (średnio 1,841 mg na 1g świeżej masy). Widzimy jednak, że i w doświadczeniach, w których roślin nie opłukiwano, również nie we wszystkich przypadkach bilans był zgodny. Ubytek cukrów w czasie doświadczenia można by częściowo tłumaczyć wzmożonym oddychaniem tkanek po wprowadzeniu dodatkowej ilości cukrów.

Kursanow i Pawlinowa (1950) stwierdzili w swych doświadczeniach, że w czasie syntezy sacharozy wyraźnie wzmaga się oddychanie tkanek. Niejasne jest jednak, dlaczego w naszych doświadczeniach obserwowano tak nierównomierne zmiany w zawartości cukrów.

Najwięcej wątpliwości wzbudzają wyniki, wskazujące na wzrost zawartości cukrów w czasie doświadczenia. Np. w jednym z doświadczeń stwierdzono, że przybyło 6,811 mg na 1 g świeżej masy (doświadczenie prowadzone na liściach cebuli). Wyniki te nasuwają przypuszczenie, że w niektórych wypadkach infiltracja próżniowa powoduje w komórkach

daleko idące zmiany — być może gwałtowną hydrolizę dwucukrów i polisacharydów. Fakt ten nasuwa wniosek, że w tego rodzaju doświadczeniach należałoby uwzględnić również zmiany w zawartości polisacharydów.

Wpływ stężenia substratu na przebieg syntezy i hydrolizy sacharozy w żywych komórkach

W doświadczeniach in vitro wielokrotnie stwierdzono, jak wpływa stężenie substratu na przebieg reakcji enzymatycznych. Michaelis i Menten sformułowali po raz pierwszy przebieg katalizy enzymatycznej ujmując go we wzory matematyczne, określające zależność pomiędzy stężeniem substratu i szybkością reakcji.

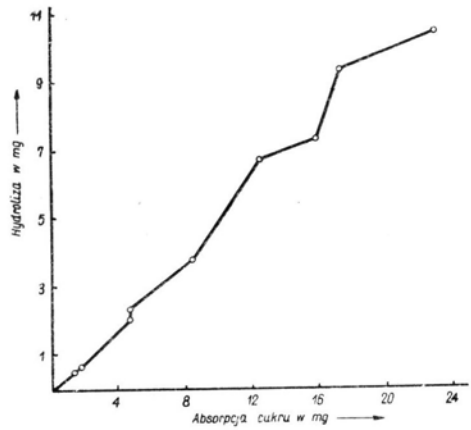
Z wzorów tych wynika, że szybkość ta wzrasta wg hyperboli, której asymptotą jest graniczna szybkość danej reakcji.

W naszych doświadczeniach chcieliśmy sprawdzić, czy metodą infiltracji próżniowej uda się wykazać doświadczalnie podobną zależność w żywych komórkach. Gdybyśmy mogli otrzymać krzywą podobną do krzywej otrzymywanej w doświadczeniach in vitro, byłoby to potwierdzeniem, że metoda infiltracji daje nam wierny obraz przebiegu enzymatycznych reakcji. W tym celu infiltrowaliśmy liście sacharozą o różnych stężeniach (od 0,625% do 7,5%) przy badaniu hydrolizy oraz cukrem inwertowanym (0,625% do 5%) — przy określaniu syntezy sacharozy.

Wyniki doświadczeń przedstawione są na ryc. 2, 3 i 4.

Na ryc. 2 przedstawiliśmy przebieg hydrolizy sacharozy u 20-dniowych siewek owsa. Wielkość hydrolizy wyrażono w mg cukru inwertowanego czyli w ilościach bezwzględnych a nie w procentach, jak to podawaliśmy w innych doświadczeniach.

Jak widać z załączonej ryciny, hydroliza jest ściśle uzależniona od stężenia substratu (w tym wypadku od ilości cukrów zaabsorbowanych przez 1 g liści). Wszystkie punkty układają się wokół linii prostej.

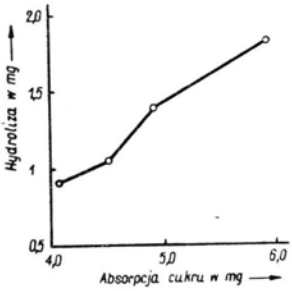


Ryc. 2. Wpływ stężenia cukrów na hydrolizę sacharozy. Doświadczenie z 20-dniowymi siewkami owsa z dn. 19.II.53. Cukry wyrażone w mg cukru inwertowanego w przeliczeniu na 1 g świeżej masy.

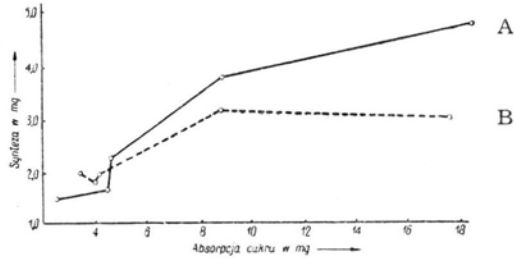
Podobne doświadczenia wykonaliśmy z 19 dn. siewkami owsa, rośliny infiltrowaliśmy 2,5% roztworem sacharozy; analitycznie

oznaczyliśmy ilość cukrów zaabsorbowanych oraz wielkość hydrolizy. I w tym wypadku stwierdziliśmy liniową zależność pomiędzy wielkością hydrolizy i stężeniem substratu (ryc. 3).

Analogiczne doświadczenia przeprowadzono, badając zależność pomiędzy stężeniem substratu i wielkością syntezy.



Ryc. 3. Wpływ stężenia cukrów na hydrolizę sacharozy. Doświadczenie z 19-dniowymi siewkami owsa z dn. 23.IV. 52 r. Cukry wyrażone w mg cukru inwertowanego w przeliczeniu na 1 g świeżej masy.



Ryc. 4. Wpływ stężenia cukrów na syntezę sacharozy. A — doświadczenie z 41-dniowymi siewkami owsa (3.VII.53 r.), B — doświadczenie z 30-dniowymi siewkami owsa (23.VI.53).

W tych doświadczeniach wprowadzano do roślin cukier inwertowany w koncentracji od 0,625 do 5%.

Wyniki doświadczeń przedstawiono na ryc. 4.

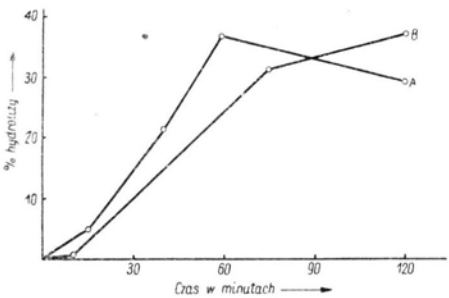
Na rycinie tej widać również zależność pomiędzy ilością cukrów zaabsorbowanych a wielkością syntezy wyrażoną w mg. Gdybyśmy jednak i tu syntezę obliczyli w procentach, przekonalibyśmy się, że przy wyższych koncentracjach procentowo synteza jest mniejsza czyli proces jest wówczas jakby mniej wydajny.

Przy porównaniu wielkości syntezy zależnie od ilości cukrów zaabsorbowanych w przypadku, gdy infiltrowano dwie równoległe próbki 2,5-procentowym cukrem inwertowanym, stwierdzono w 11 przypadkach na 52 doświadczenia (co stanowi 21,6% doświadczeń), że przy większej absorbcji cukrów synteza nie wzrastała. Przy badaniu hydrolizy na 51 doświadczeń w 12 przypadkach nie stwierdzono takiej zależności (23,5% doświadczeń). W pozostałych przypadkach wzrastała zarówno synteza jak i hydroliza wraz ze wzrostem absorbcji cukrów.

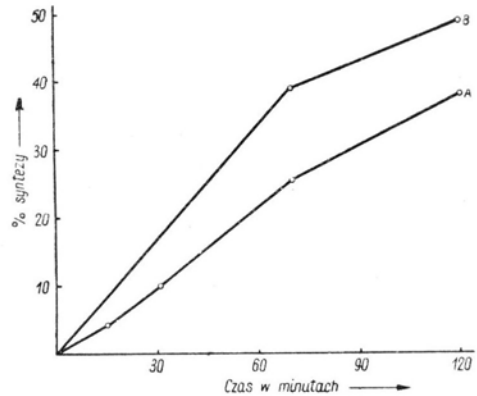
Prócz wpływu koncentracji, badaliśmy również wpływ czasu trwania doświadczenia na wielkość syntezy i hydrolizy.

W celu prześledzenia, jak przebiega w czasie hydroliza sacharozy, wprowadzonej do liści owsa, rośliny zabijano w różnym czasie po infiltracji i oznaczano wielkość hydrolizy (ryc. 5).

Z powyższych dwóch doświadczeń wynika, że hydroliza przebiega stopniowo, przy czym w ciągu pierwszej godziny proces ten zachodzi intensywniej, po czym stopniowo ulega zahamowaniu.



Ryc. 5. Przebieg hydrolizy sacharozy w czasie. A — doświadczenie z 34-dniowymi siewkami owsa (3.IV.52), B— doświadczenie z 38-dniowymi siewkami owsa (13.V.52).



Ryc. 6. Przebieg syntezy sacharozy w czasie. A — doświadczenie z 22-dniowymi siewkami owsa (8.V.52), B — doświadczenia z 26-dniowymi siewkami owsa (20.V.52). Na osi x — minuty od czasu infiltracji.

Analogiczne doświadczenia, w których badano syntezę sacharozy, dały całkowicie zgodne wyniki. I tu również zaobserwowaliśmy zwolnienie tempa syntezy w ciągu drugiej godziny doświadczenia (ryc. 6).

Aby sprawdzić, jak przebiega synteza i hydroliza sacharozy w doświadczeniach długotrwałych, badaliśmy szybkość tych przemian, zabijając rośliny po 15 godz. W celu zabezpieczenia roślin przed zaschnięciem, liście trzymano w torebkach z wilgotnej bibuły filtracyjnej pod szklanym kloszem, umieszczonym w termostacie w temp. 24°C. Uprzednio doprowadzaliśmy liście do pierwotnej wagi w termostacie z przepływem powietrza.

Tabela 8

Wielkość syntezy i hydrolizy sacharozy oznaczona po 15 godz. od infiltracji (w %%)

Doświadczenia wykonane 5—6.III.52 r. na 28 dniowych siewkach owsa.

	W ciągu 15 godz.	W przeliczeniu na 1 godz.
Synteza	55,2 54,7 śred. 54,95	3,66%
Hydroliza	34,1 23,0 śred. 28,5%	1,9%

Jeśli porównamy wielkość hydrolizy przeliczoną na 1 godz. z wynikami doświadczeń robionych z takimi samymi roślinami poprzedniego dnia (4.III.52 r.), to stwierdzimy (tabela 9), że przy zbyt długotrwałych doświadczeniach szybkość reakcji bardzo znacznie maleje, co zresztą zgodne jest z ogólnymi prawami kinetyki reakcji enzymatycznych.

Tabela 9

Wielkość hydrolizy sacharozy — oznaczona po 3 godz. 20 min. wyrażona w %

Doświadczenia z 7-dniowymi kiełkami owsa 4.III.52 r., temp. 25°C

	Po 3 godz. 20 min.	W przeliczeniu na 1 godz.
Hydroliza	19% 15% śred. 17%	5%

Podobne wyniki otrzymał w swych doświadczeniach Kursanow (1941) stwierdzając, że o ile do rośliny wprowadzić jakiś cukier, przez co naruszy się równowagę między syntezą i hydrolizą, to roślina, zgodnie z prawem działania mas, uruchamia jednostronne działanie enzymów, celem przywrócenia zakłóconej równowagi. Kursanow stwierdza, że przywrócenie równowagi następuje dopiero po ok. 20 godzinach, nie uwidacznia jednak nierównomierności przebiegu syntezy i hydrolizy w czasie.

Wpływ pH *na hydrolizę sacharozy*

Prócz badania kinetyki reakcji syntezy i hydrolizy sacharozy staraliśmy się prześledzić wpływ różnych substancji chemicznych na działanie inwertazy.

Podstawowym doświadczeniem było prześledzenie przebiegu hydrolizy przy różnych wartościach pH i wpływu pH infiltrowanych roztworów na równowagę chemiczną w komórce.

W tym celu zinfiltrowaliśmy liście 35-dniowego owsa sacharozą z odpowiednimi buforami. Jako buforów używaliśmy mieszaniny kwasu cytrynowego i Na_2HPO_4. Po sporządzeniu roztworów sprawdzaliśmy pH pehametrem. Doświadczenie trwało 1 godzinę (tabela 10).

Z powyższych danych wynika, że pH wprowadzanego roztworu prawie nie wpływa na hydrolizę. Wahania co prawda są dość duże, lecz bardzo nieprawidłowe i najprawdopodobniej wypływają z błędów doświadczenia.

Porównując zawartość cukrów w poszczególnych doświadczeniach przy infiltrowaniu roztworami o różnym pH stwierdziliśmy, że wprowadzenie do liści roztworu o różnym pH nie wpływa na przesunięcie równowagi enzymatycznej i dlatego nie zmienia się stosunek cukrów prostych do dwucukrów.

Z powyższego wynika, że rośliny posiadają ogromne własności buforowe i wprowadzenie roztworu o różnym pH nie zmienia widocznie pH komórek, a stąd nie wpływa też na procesy biochemiczne.

Tabela 10

Wpływ pH na wielkość hydrolizy sacharozy

Doświadczenie wykonane metodą połówek liściowych na 35-dniowych siewkach owsa, 29.V.1952, w ciemności, w temp. 26—28°C.

pH	Hydroliza w %	Zawartość cukrów w liściach infiltrowanych buforem w mg na 1 g św. m.		
		cukry proste	dwucukry	ogółem
4,3	63,9	2,463	2,888	5,351
5,2	57,5	2,533	3,062	5,595
6,5	67,3	2,290	3,000	5,290
7,0	52,9	2,856	3,833	6,689
8,6	56,3	2,679	2,976	5,655

Analogiczny wniosek podaje Keyssner (1931) w pracy, w której stwierdza wpływ pH środowiska na pH soku komórkowego wyciśniętego z liści i korzeni różnych roślin. Dla przykładu przytoczymy liczby wskazujące na wpływ pH środowiska na odczyn soku z liści i korzeni owsa:

pH środowiska	3,8	5,5	7,6	
pH soku komórk. liści	5,9	6,5	6,2	max. różnice 0,6
pH „ „ korzeni	5,9	6,1	6,0	max. różnice 0,2

Również Lundegårdh i Burström (1944) nie stwierdzili wyraźnego wpływu pH na wielkość oddychania, co tłumaczą ogromnymi własnościami buforowymi żywej komórki.

Wpływ eteru na syntezę i hydrolizę sacharozy

Kursanow i Kriukowa (Kursanow, 1941) badali wpływ narkotyków na działanie enzymów. Narkotyki są związkami wpływającymi na aktywność powierzchniową struktur komórki. W wyżej wymienionej pracy stwierdzono, że eter wpływa na kierunek działania inwertazy, przesuwając równowagę w kierunku syntezy lub hydrolizy w zależności od stężenia eteru.

W naszych doświadczeniach zastosowaliśmy dużą dawkę eteru (3 ml eteru na 50 ml roztworu), dodając go do roztworów cukrów, używanych do infiltracji 3 g roślin. Wyniki przedstawiono w tabeli 11: doświadczenie wykonano 26.VI.51 r. z liśćmi 62-dniowego owsa. Nie stosowano tu metody połówek liściowych, tylko oznaczano 2 kontrolne (infiltrowane wodą).

Jak widać z powyższych danych, narkoza eterowa spowodowała znaczny wzrost hydrolizy sacharozy i całkowite zahamowanie syntezy.

Tabela 11

Wpływ eteru na syntezę i hydrolizę sacharozy

Synteza w %		Hydroliza w %	
inf. cukrem inwert.	inf. cukrem inwert. + eter	inf. sacharozą	inf. sacharoza + eter
36,0%*	0,0%	33,5%*	61,0%

* średnie z 2 równoległych próbek.

Wpływ cjanku potasu na syntezę i hydrolizę sacharozy

W celu stwierdzenia, jak wpływa KCN na działanie inwertazy, wraz z cukrami wprowadziliśmy do liści owsa 0,01 m KCN, sądząc, że cjanek potasu zahamuje oddychanie, a w związku z tym zmaleje również synteza sacharozy.

Na skutek zahamowania oddychania spodziewaliśmy się, że bilans cukrów obliczony na podstawie różnicy wagi i oznaczeń analitycznych będzie bardziej zgodny. By wyniki lepiej były widoczne, doświadczenie trwało 15 godzin. Wyniki przedstawione są w tabeli 12.

Tabela 12

Wpływ KCN na syntezę i hydrolizę sacharozy

Doświadczenie z 23-dniowymi liśćmi owsa, czas trwania doświadczenia 15 godzin, 19/20–III—52 r., w ciemności, temp. 26—28°C.

Synteza w %		Hydroliza w %		Cukry w mg na 1 g św. masy					
				proste		dwucukry		ogółem	
Kontr.	+KCN	Kontr.	+KCN	Kontr.	+KCN	Kontr.	+KCN	Kontr.	+KCN
86% 86%	59,5* 61,2	22	1,2*	2,850	2,800	5,755	6,169	8,605	8,969

* — wyniki obliczono wg kontrolnej — infiltrowane wodą destylowaną (bez KCN)

Doświadczenie to dało wyniki dla nas zupełnie nieoczekiwane. Bilans cukrów i w tym przypadku nie zgadzał się, a ponadto stwierdziliśmy niewielki wpływ KCN na zawartość cukrów, zahamowanie syntezy było dość znaczne, natomiast obniżenie hydrolitycznych własności było dla nas największą niespodzianką.

Ponieważ KCN w środowisku alkalicznym wykazuje bardzo słabe właściwości trujące, powtórzyliśmy doświadczenie doprowadzając wszystkie roztwory używane do infiltracji do pH 5,8—6,2 (zakwaszano HCl). Doświadczenie prowadzono 2 godziny, używając liści 30-dniowego owsa.

W wyniku doświadczenia otrzymano następujące dane:

Tabela 13

Wpływ KCN na syntezę i hydrolizę sacharozy (przy pH—5,8—6,2.) (28.III.52 r.) w ciemności, w temp. 26—28°C.

Synteza w %		Hydroliza w %		Cukry w mg na 1 g św. masy					
				proste		dwucukry		ogółem	
Kontr.	+KCN	Kontr.	+KCN	Kontr.	+KCN	Kontr.	+KCN	Kontr.	+KCN
41	34,1	38	71,0	1,121	2,412	0,916	0,811	2,037	3,223
—	—	35	58,0						

(Doświadczenia nie robiono połówkami liściowymi—brano całe roślinki).

Jak widać, w środowisku słabo kwaśnym KCN spowodował wzrost hydrolizy i nieznaczny spadek syntezy sacharozy. Analizując zmiany w zawartości cukrów po wprowadzeniu KCN w czasie infiltracji stwierdzono wyraźny wzrost zawartości cukrów prostych i cukrów ogółem, co być może wynika z przesunięcia równowagi enzymatycznej w kierunku hydrolizy.

Sisakian i Wasiliewa (1950) badając wpływ KCN na syntezę sacharozy nie stwierdzili hamującego wpływu cjanku, natomiast Oparin i Gelman (1952) wykazują zahamowanie syntezy sacharozy spowodowane $1 \cdot 10^{-2}$ m KCN.

WNIOSKI

1. Metoda infiltracji próżniowej daje dobre rezultaty, o ile do doświadczeń bierze się młode roślinki, zawierające niewielką ilość cukrów. Taki materiał jest bardziej wyrównany i łatwiej dobrać reprezentatywną próbkę.

2. O ile do doświadczeń trzeba użyć roślin starszych, dość dobre rezultaty daje metoda połówek liściowych, przy zastosowaniu tej metody znamy początkową zawartość cukrów, a stąd dokładniej można ocenić wielkość syntezy i hydrolizy.

3. Metoda infiltracji próżniowej jest obciążona dość dużymi błędami niekontrolowanymi. Być może w grę tu wchodzi wpływ samej infiltracji na metabolizm w pierwszych godzinach po wprowadzeniu do przestworów międzykomórkowych roztworów wodnych badanej substancji lub przesunięcie równowagi enzymatycznej w kierunku hydrolizy.

4. Niemały wpływ mogą też mieć zmiany w zawartości polisacharydów w czasie doświadczenia. Na poparcie tego przypuszczenia można przytoczyć fakt, że rośliny zawierające dużo skrobi w liściach dają bardziej niezgodne wyniki pomiędzy równoległymi próbkami, np. liście tytoniu.

5. W metodzie tej lepsze wyniki dają oznaczenia hydrolizy; 65% wyników mieści się w granicach błędów do 10% od średniej arytmetycznej, a 90% wyników zawiera się w granicach poniżej 20%.

Oznaczanie syntezy jest zwykle obarczone większym błędem. Do 10% błędu mieści się tylko 41% wyników, a 90% wyników mieści się dopiero w granicach do 45% błędu.

6. Doświadczenia krótkotrwałe — jednodniowe, których celem jest stwierdzenie wpływu jakiegoś czynnika na syntezę i hydrolizę sacharozy (np. wpływ eteru, pH, KCN, stężenie substratu) dają wyniki bardziej zgodne, niż doświadczenia długotrwałe.

7. Metoda powyższa nie nadaje się do śledzenia przebiegu syntezy lub hydrolizy w całym okresie wegetacji, ponieważ małe próbki niedostatecznie reprezentują całą roślinę oraz ze względu na zmieniającą się zawartość cukrów w roślinie.

8. W wyniku badania powyższą metodą syntezy i hydrolizy sacharozy w owsie stwierdzono: a) zarówno synteza jak i hydroliza wzrastają wraz ze wzrostem stężenia wprowadzonego do rośliny roztworu cukru i są proporcjonalne do czasu trwania doświadczenia, b) wprowadzając wraz z cukrami bufory o różnym pH stwierdzono, że wielkości hydrolizy nie zależą od pH roztworu, c) przy wprowadzeniu do roślin eteru następuje zahamowanie syntezy i znaczny wzrost hydrolizy, d) KCN wprowadzony wraz z cukrami w odczynie alkalicznym powoduje obniżenie hydrolizy i syntezy, natomiast w odczynie słabo kwaśnym — znaczny wzrost hydrolizy i nieznaczny spadek syntezy.

Panu Profesorowi dr M. Korczewskiemu pragnę wyrazić głęboką wdzięczność za cenne rady i wskazówki udzielane mi w czasie wykonywania niniejszej pracy.

Zakład Fizjologii Roślin SGGW. (Wpłynęło dn. 22.V.1954 r.)

SUMMARY

In the present work Kursanov's vacuum-infiltration method was used. This method consists on introducing of sucrose or inverted sugars solutions into the intercellulary spaces of the leaves and measuring the changes in the sugars contens (synthesis or hydrolysis of sucrose). As controls leaves infiltrated with destilled water were used.

Using oat as test plant following results were obtained:

1. The infiltration method gives better results with young plants which have low sugar content. From such material it is easier to have more representative samples.

2. With older plants it is advised to use only the method of leaves-halves; in this method we know the initial content of sugars and we can more precisely evaluate the rate of hydrolysis and synthesis.

3. The infiltration method is charged with many uncontrolled sources of errors. Probably the mere infiltration causes changes in the metabolism of the plant (especially in first hours) shifting the enzymatic balance towards the hydrolytic processes.

4. Great influence on the results of the experiments excersise also the changes in the content of polysaccharides in the investigated plants. The plants with high content of starch in the leaves (e. g. tobacco) give more inadequate results in parrallel samples.

5. Using this method better results are obtained with hydrolysis than with synthesis. In the case of hydrolysis 65% of parallel samples show errors to 10% (calculated from arithm. mean) and 90% of samples show errors to 20% whereas in the case of synthesis only 41% of samples show errors to 10% and 90% of samples show errors as high as to 45%.

6. Short-lasting experiments of one day give more accurate results than the long-lasting ones. This method is rather suitable for studying the influence of some factors on the synthesis or hydrolysis of sucrose (eg. ether, pH, KCN a. s. o.).

7. This method is unsuitable for studying the course of synthesis or hydrolysis during the whole vegetation period because small samples do not represent the whole plant and the content of sugars in the plant is always changing.

8. In studying the rate of hydrolysis and synthesis of sucrose it was found that a) both synthesis and hydrolysis increase with the increasing concentrations of the infiltrated sugar solutions and are proportionate to the time of the experiment, b) introducing together with the sugars buffers having different pH values the rate of hydrolysis is independent on the pH values, c) introducing into the leaves ethylene-ether causes an inhibition of synthesis and marked increase of hydrolysis and d) KCN solution introduced into the leaves in alcaline medium causes the decrease of hydrolysis and synthesis whereas in acid medium it causes the great increase of hydrolysis and small decrease of synthesis.

LITERATURA

Biełozjerski A. i Proskuriakow N., 1951, Prakticzeskoje rukowodstwo po biochimii rastienij, Tł. polskie 1954, str. 251—253.

Björksten J., 1930, „Biochemische Zeitschrift", 225.

Mc Cready i Hassid W. Z., 1941, „Plant physiology" 16, 599—609.

Fujita Akiji i Danzo Iwotake, 1931, „Biochem. Zeitschrift", 242, str. 43.

Keyssner E., 1931, „Planta", 12, 575—587.

Kobiakowa A. i Sisakian N., 1941, „Biochimija", 6, 51—57.

Kursanow A., 1941, „Advances in enzymology", 1. Tł. polskie Problemy biochemii, „Post. Wiedzy Roln." Zesz. 8, 1952, 42—77.

Kursanow A., Isajew, Potapenko, 1947, „Biochimija", 12, str. 7.

Kursanow A., Pawlinowa O., 1950, „Biochimija" 15, 178—185.

Kursanow A., Pawlinowa O., 1952, „Biochimija", 17, 446—455.

Lundegårdh H. i Burström H., 1944, „Annals of the Agricultural College of Sweden", 12, 51—69.

Mothes K., 1933, „Planta", 19, str. 117.

Oparin A., Zenczenko W. A., 1949, Problemy biochimii w miczurinowskoj biołogii, 81—91.

Oparin A. i Gelman, 1952, „D. A. N.", 85.

Rubin B., Sokołowa, 1947, „D. A. N.", 58, 1993—1996.

Rubin B., 1949, Problemy biochimii w miczurinowskoj biołogii „Izdatielstwa Ak. Nauk SSSR", str. 113—150.

Sisakian N. i Wasiliewa N., 1950, „Biochimija", 15, 394—400.