Kwasy jabłkowy i winowy jako substraty w fotosyntezie roślin zielonych

*Malic and tartaric acids as substrates in the photosynthesis
of green plants*

B. GOMÓŁKA

Współczesne badania nad chemizmem fotosyntezy, wykonane przez Calvina i współpracowników (Bassham J. A., Benson A. A., Calvin M. 1950, Calvin M., Benson A. A. 1948, Calvin M., Bassham J. A., Benson A. A., Lynch V. A., Quillet C., Schou L., Stepka D., Tolbert N. E. 1951), przy zastosowaniu radioczynnego węgla, wykryły obecność kwasu jabłkowego wśród związków wyekstrahowanych z asymilujących roślin i zawierających węgiel izotopowy. Wynik ten nasunął przypuszczenie, że kwas ten jest jednym z metabolitów w procesie fotosyntezy. Gdyby tak istotnie było, to należałoby oczekiwać, że kwas jabłkowy będzie łatwo przyswajalny przez rośliny na świetle, jeżeli się go wprowadzi do otoczenia zamiast dwutlenku węgla. Podjęte badania miały na celu rozstrzygnięcie, czy to przypuszczenie jest uzasadnione, to znaczy zbadanie, w jakiej mierze kwas jabłkowy jest przyswajany przez rośliny w nieobecności dwutlenku węgla. Do badań włączono również zbliżony strukturalnie kwas winowy.

Badania przeprowadzono nad mchem wodnym *Fontinalis antipyretica* L., który ze stanowiska naturalnego był dostępny przez większą część roku. Kolbki z gałązkami mchu, szczelnie zamknięte i kompletnie wypełnione wodnym roztworem kwasów lub CO₂, umieszczano w termostacie wodnym oświetlonym od dołu żarówkami. Do oświetlania używano żarówek „Polam“ 220 V 100 W dających różne natężenia światła w zależności od ich ilości. Pomiarów natężenia światła dokonano przy pomocy fotoelementu Langego typu S 60. Dało to następujące wyniki:

$$1 \times 100 \text{ W} = 1500 \text{ luxów}$$

$$2 \times 100 \text{ W} = 2000 \text{ luxów}$$

$$4 \times 100 \text{ W} = 4000 \text{ luxów}$$

Światło było rozpraszane przez matówkę umieszczoną na drodze światła. Kolbki były naświetlane światłem białym przez 90 minut. Liście *Fontinalis* są zbudowane z komórek ułożonych w jednej warstwie, wskutek czego natężenie światła docierającego do wszystkich komórek jest mniej więcej jednakowe. Doświadczenie przebiegało w temperaturze 20°C. Intensywność fotosyntezy badano metodą pomiarów wydzielonego tlenu. Tlen oznaczono metodą Winklera według Treadwella (1945). Brak przestworów międzykomórkowych u *Fontinalis* sprawiał, że cały tlen asymilacyjny rozpuszczał się w wodzie nie tworząc baniek gazowych. Zjawisko wytwarzania baniek jest niekorzystne przy badaniu natężenia fotosyntezy, gdyż tlen wydzielany tą drogą nie rozpuszcza się w wodzie. Ważąc masę mchu można wyznaczyć ilość O_2 wydzielanego na jednostkę czasu (90 min) na 100 mg świeżej masy.

Substraty: badania przeprowadzono z kwasem l-jabłkowym pochodzącym z firmy C. A. F. Kahlbaum i z kwasem d-winowym produkcji krajowej oraz — w celu porównania wyników — użyto próbek z dwutlenkiem węgla. Stosowano cztery dawki kwasów organicznych i dwutlenku węgla zestawione w poniższej tabelce. Ilości tych substancji dano równoważne w proporcjach atomów C, tzn. na jeden mol kwasu jabłkowego przypadał jeden mol kwasu winowego lub cztery mole CO_2 . Ilościowo podawano następujące dawki w mg na 50 ml:

dawka	kwas jabłkowy mg	kwas winowy mg	CO_2 mg
1	67	7	18
2	134	150	176
3	201	225	264
4	268	300	352

Jako rozpuszczalnika używano wody destylowanej, pozbawionej CO_2 przez przedestylowanie raz jeszcze z dodatkiem NaOH dla pochłonięcia dwutlenku węgla. Podczas destylacji odbieralnik był zabezpieczony przed wnikaniem CO_2 atmosferycznego rurką z wapnem sodowanym. Do badań używano erlenmajerek o pojemności 50 ml. Roztwory robiono bezpośrednio w kolbkach służących do badania fotosyntezy. Ponieważ według Steemann—Nielsena (1947) *Fontinalis* jest niezdolny do korzystania z dwuwęglanów jako źródła CO_2 , w seriach kontrolnych stosowano roztwory dwutlenku węgla, otrzymane przez rozłożenie dwuwęglanu sodu starannie obliczoną ilością kwasu solnego. Do roztworów kwasów dodawano chlorku sodu w ilościach równoważnych tym, jakie powstają podczas rozkładu $NaHCO_3$ przez HCl. W ten sposób starano się stworzyć możliwie zbliżone warunki asymilacyjne we wszystkich seriach. Przeprowa-

dzono cykl dwunastu doświadczeń różniących się między sobą wysokością dawki i natężeniem światła. W jednych seriach badań stałe było stężenie substratu, a zmienne natężenie światła, w innych zaś odwrotnie. Tabele 1 i 2 oraz wykresy na ryc. 1—2 streszczają wyniki badań. W tabelach każda pozycja jest średnią czterech powtórzeń. Wyniki tych badań nie pozostawiają wątpliwości, że kwas 1-jabłkowy i kwas d-winowy mogą w opisanych powyżej warunkach spełniać rolę substratów wyjściowych w procesie fotosyntezy zachodzącym u *Fontinalis antipyretica*. Świadczy o tym z jednej strony sam fakt wydzielania tlenu, a z drugiej zależność natężenia tego procesu od natężenia światła lub stężenia substratów. Gdyby

Tabela 1

Zależność fotosyntezy od natężenia światła dla różnych dawek CO₂ i kwasów organicznych

Natężenie światła w luxach	CO ₂	Kwas 1-jabłkowy	Kwas d-winowy
----------------------------	-----------------	-----------------	---------------

D a w k a 1

1500	0,167	0,208	0,232
2000	0,182	0,240	0,257
4000	0,212	0,324	0,332

D a w k a 2

1500	0,199	0,282	0,249
2000	0,216	0,299	0,282
4000	0,240	0,398	0,365

D a w k a 3

1500	0,216	0,289	0,274
2000	0,232	0,315	0,294
4000	0,316	0,440	0,398

D a w k a 4

1500	0,216	0,289	0,274
2000	0,224	0,327	0,315
4000	0,340	0,523	0,490

Dane dla *Fontinalis antipyretica* L. naświetlanego przez 90 minut światłem o różnym natężeniu. Natężenie fotosyntezy mierzono w mg wydzielonego O₂ na 100 mg świeżej masy. Dane liczbowe dawek substratów podane są w tekście.

stwierdzone wydzielanie się tlenu nie było wynikiem procesu asymilacyjnego i fotochemicznego, zależność natężenia wydzielania tlenu od natężenia światła i stężenia substratów nie byłaby zrozumiała. Stwierdzono doświadczalnie, że reakcje te mają charakter fotochemiczny, gdyż wzrost wydajności fotosyntezy jest słaby przy ilościowym wzroście dawek, natomiast silnie wzrasta przy wzroście natężenia światła. Przy małych natężeniach światła 1500 i 2000 luxów wzrost intensywności fotosyntezy jest

Tabela 2

Zależność fotosyntezy od stężenia substratu: CO₂ i kwasów organicznych

D a w k a	CO ₂	Kwas l-jabłkowy	Kwas d-winowy
1500 luxów			
1	0,167	0,208	0,232
2	0,199	0,282	0,249
3	0,216	0,289	0,274
4	0,216	0,289	0,274
2000 luxów			
1	0,182	0,240	0,257
2	0,216	0,299	0,282
3	0,232	0,315	0,294
4	0,224	0,327	0,315
4000 luxów			
1	0,208	0,324	0,332
2	0,240	0,398	0,365
3	0,316	0,440	0,398
4	0,340	0,523	0,490

Dane dla *Fontinalis antipyretica* L. naświetlanego przez 90 minut światłem o różnym natężeniu. Natężenie fotosyntezy mierzono w mg wydzielonego O₂ na 100 mg świeżej masy. Dane liczbowe dawek substratów podane są w tekście.

zahamowany dla dawek 3 i 4, natomiast silnie wzrasta dla natężenia światła 4000 luxów dla obu tych dawek substratów. Dowodem, że w niniejszych doświadczeniach zachodzi proces fotosyntezy, może być także wydajność tych reakcji pod względem ilości wydzielanego tlenu, którą porównano z wydajnością dla fotosyntezy u *Cabomba caroliniana* według badań Smitha (1937). Wydajności te są tego samego rzędu wielkości. Charakter uzyskanych doświadczalnie krzywych wskazuje na to, że re-

akcje, które one przedstawiają są reakcjami enzymatycznymi, co również może być pośrednim dowodem, że zachodzi tutaj fotosynteza. Układy enzymatyczne są prawdopodobnie te same, gdyż krzywe fotosyntezy dla CO_2 i kwasu l-jabłkowego są podobne. Również krzywa fotosyntezy dla kwasu d-winowego jest podobna do krzywej dla kwasu l-jabłkowego.

Ryc. 1. Zależność fotosyntezy od natężenia światła. Krzywe fotosyntezy dla *Fon-tinalis antipyrctica* L.: a — dla dawki 1; b — dla dawki 2; c — dla dawki 3; d — dla dawki 4

Stężenie substratu — CO_2 i kwasy organiczne — jest stałe, zaś natężenie światła przedstawia wartość zmienną 1500, 2000, 4000 luxów. Czas nasświetlania wynosi 90 min. Natężenie fotosyntezy mierzono w mg wydzielonego O_2 na 100 mg świeżej masy. Dane liczbowe dawek substratów podano w tekście

Ryc. 2. Zależność fotosyntezy od stężenia substratu. Krzywa fotosyntezy dla *Fon-tinalis antipiretica* L. w zależności od stężenia substratów: CO_2 i kwasy organiczne dla natężenia światła: a — 1500 luxów; b — 2000 luxów; c — 4000 luxów

Natężenie światła jest wartością stałą, zaś zmienne jest stężenie substratów w postaci dawek 1, 2, 3, 4. Czas naświetlania wynosi 90 min. Natężenie mierzono w mg O_2 na 100 mg świeżej masy. Dane liczbowe dawek substratów podano w tekście

Fakt ten sugeruje, że mechanizm tych reakcji może być również podobny. Przemawiają za tym także podobieństwa budowy chemicznej kwasu l-jabłkowego i d-winowego. Użyte do badań kwasy organiczne mają podobną strukturę chemiczną, co umożliwi działanie w podobny sposób tych samych układów enzymatycznych. Nieco słabsze wydajności fotosyntezy dla CO_2 , uzyskanego z rozkładu NaHCO_3 przy pomocy HCl , powodują pewne straty w postaci gazowego dwutlenku węgla, który uchodzi do atmosfery, oraz tworzenie się jonów HCO_3^- , z których *Fontinalis* korzystać nie może.

DYSKUSJA

Otrzymane w niniejszych doświadczeniach wyniki nie pozwalają na głębsze wnikięcie w chemiczną stronę tego procesu. Można jedynie, w oparciu o dotychczasowe wyniki badań nad fotosyntezą, sformułować pewne hipotezy:

a. Za bardzo mało prawdopodobną można uważać hipotezę, w myśl której kwas organiczny ulegałby utlenieniu zupełnemu na CO_2 w procesie oddechowym, a powstały w ten sposób dwutlenek węgla ulegałby normalnej asymilacji. Hipoteza ta jest dlatego wysoce nieprawdopodobna, ponieważ zakłada ona, że natężenie oddychania przebiega z wysokością nie notowaną u roślin zielonych. Przeprowadzone doświadczenia nad intensywnością procesu oddechowego u *Fontinalis* w identycznych warunkach jak dla fotosyntezy wykazały, że natężenie oddychania jest około dziesięciokrotnie niższe niż stwierdzone w niniejszych doświadczeniach natężenie fotosyntezy. Np. dla kwasu d-winowego ilości pobranego tlenu były następujące:

Dawka 1	2	3	4
0,028	0,045	0,058	0,069

Ilości te są obliczone w mg na 50 ml pożywki dla 100 mg świeżej masy pobierającego tlen mchu w ciągu 90 min. Dane te zaprzeczają możliwości przyswajania kwasów organicznych na drodze procesu oddechowego.

b. Natomiast znacznie prawdopodobniejszy jest poniżej naszkicowany mechanizm przyswajania kwasu jabłkowego i winowego. Kwas jabłkowy ulega oksydatywnej β -dekarboksylacji, w wyniku której powstaje kwas pirogronowy i dwutlenek węgla:

Rozkład ten może się odbywać na dwa nieco odmienne sposoby. Pierwszy, to rozpad kwasu jabłkowego bez utleniania drogą β -dekarboksylacji do kwasu mlekowego i CO_2 , a następnie przy pomocy dehydrogenazy kwas mlekowy zostaje utleniony do kwasu pirogronowego.

Drugi sposób polega na oksydatywnej β -dekarboksylacji kwasu jabłkowego, który od razu rozpada się na kwas pirogronowy i CO_2 .

Dalej proces fotosyntezy zachodziłby na dwu równoległych torach: pierwszy to normalne przyswajanie na świetle CO_2 pochodzącego z β -dekarboksylacji, drugi (boczny) to fotochemiczna redukcja kwasu pirogronowego na kwas glicerynowy, co do którego istnieje zgoda, że jest on (w formie estru z kwasem fosforowym) metabolitem normalnej fotosyntezy. Przemiana ta odbywałaby się drogą podobną do przemian zachodzących w cyklu oddechowym, lecz w kierunku odwrotnym. Powstający w wyniku przemian zachodzących oboma torami kwas fosfoglicerynowy staje się związkiem wyjściowym dla dalszych etapów fotosyntezy.

Podobnym przemianom ulegałby również kwas d-winowy, różniący się od kwasu l-jabłkowego tylko obecnością jeszcze jednego atomu tlenu, który znajduje się w grupie CH_2 przekształcając ją w grupę CHOH . Kwas d-winowy podlegałby naprzód redukcji na kwas jabłkowy, a ten następnie oksydatywnej dekarboksylacji na kwas pirogronowy. Przemiana kwasu winowego na kwas jabłkowy przebiegałaby w następujący sposób:

Powstały w ten sposób kwas jabłkowy dalej zamieniałby się w kwas pirogronowy, podobnie jak kwas pobrany z pożywki. Powyższa przemiana kwasu d-winowego na kwas l-jabłkowy jest biologicznie możliwa, gdyż reakcje tego typu zachodzą w cyklu Krebsa.

Bardzo poważny argument, przemawiający na korzyść omawianej hipotezy, stanowią wyniki badań nad metabolizmem kwasowym sukulentów. Stwierdzono uderzającą (ujemną) korelację między ilością cukrowców a ilością kwasu jabłkowego w liściach sukulentów. U tych roślin (np. *Bryophyllum*) w ciągu nocy zanikają cukrowce, a nagromadzają się w soku komórkowym znaczne ilości kwasów, przede wszystkim kwasu jabłkowego (Pucher G. W., Leavenworth C. S., Ginter W.,

Vickery A. B. 1947). Według Thomasa (1951, 1954) zachodzi tu proces odwracalny:

zaś dokładniejszy schemat tej reakcji byłby następujący:

Przemiana kwasu jabłkowego na kwas pirogronowy i CO_2 , przy β -dekarboksylacji, wskazuje na podobieństwo do procesów zachodzących u badanego *Fontinalis antipyretica*. Powyższy proces może prowadzić do fotosyntezy, która niewątpliwie zachodzi w wypadku sukulentów. Badany mech wodny zachowuje się zatem podobnie jak sukulent w zbliżonych do ich środowiska warunkach. Są to: brak CO_2 , obecność kwasu jabłkowego i odpowiednia ilość energii promienistej. To podobieństwo pozwala na pewne przypuszczenia dotyczące biochemicznych przemian zachodzących podczas fotosyntezy u badanego mechu.

Ostatnio prace A. Moyse (1954) nad fotosyntezą u *Bryophyllum daigremontianum* również wykazały, że kwas jabłkowy może zastąpić dwutlenek węgla. Badania jego wykazały, że u *Bryophyllum* mogą zachodzić równocześnie różne procesy, np.: oksydacja komórkowa typu oddechowego, akumulacja kwasów organicznych drogą reakcji Ochoa, oksydacja akumulowanych kwasów dwukarboksylowych oraz fotosynteza. Badając współzależność tych procesów stwierdził on, że przy braku CO_2 z zewnątrz, dwutlenek węgla może być dostarczony drogą rozkładu kwasu jabłkowego. Dawniejsze badania J. C. Bose (1924) nad *Hydrilla verticillata* również wykazały, że kwas jabłkowy może zastąpić CO_2 . W doświadczeniach swych otrzymał on podobne krzywe fotosyntezy dla CO_2 i kwasu jabłkowego. Badania przy pomocy radioaktywnego węgla C^{14} metodą infiltracji kwasów organicznych zawierających ten węgiel przeprowadzone przez Zbinowsky'ego i Burrisa (1952) dały wyniki, które również pozwalają stwierdzić, że najsilniej na fotosyntezę wpływa kwas jabłkowy. Badania przeprowadzone nad przemianą kwasów organicznych przy zastosowaniu C^{14}O_2 przez Stutza i Burrisa (1951) wykazały bardzo wysoką aktywność kwasu jabłkowego u różnych roślin, np. *Bryophyllum*, *Lycopersicum*, *Nicotiana*, *Rheum*, *Hordeum*.

Zatem nie tylko sukulenty miałyby zdolność korzystania z kwasu jabłkowego jako materiału wyjściowego, który mógłby być włączony do fotosyntezy za pomocą opisanego uprzednio procesu przemiany na kwas pirogronowy i przemiany tegoż na kwas fosfoglicerynowy. Z powyższych roz-

ważną można wyciągnąć następujące wnioski: rola kwasu jabłkowego i winowego jako substratu dla fotosyntezy jest dwójaka:

- a) może być źródłem CO_2 ,
- b) może być źródłem innych związków typu kwasów organicznych, które mogą prowadzić do fotosyntezy drogą boczną. W ten sposób należałoby stwierdzić, że kwas jabłkowy nie jest związkiem pośrednim w normalnym procesie fotosyntezy, lecz jest przypuszczalnie związkiem wyjściowym w procesie, który może równolegle zachodzić do normalnego procesu fotosyntezy i być także zlokalizowanym w liściach.

Występowanie pewnych wariantów w procesie fotosyntezy u sukulentów i innych roślin zielonych nie jest czymś niezwykłym, lecz raczej należałoby się go spodziewać, jeśli zważyć, że rośliny mogły w różny sposób wykształcić drogi swych procesów metabolicznych w zależności od środowiska, w jakim żyją. Według badań Oparina fotosynteza jest zjawiskiem przystosowawczym w drodze ewolucji, w wyniku której mogły się wykształcić różne jej tory, prowadzące w ostateczności do wytworzenia związków o wysokim potencjale energetycznym. U różnych roślin, w zależności od warunków ekologicznych, ten czy inny tor mógł stać się torem zasadniczym dla fotosyntezy, a inne zostałyby na uboczu. Nie ma zatem powodu do przypuszczenia, żeby mechanizm fotosyntezy sukulentów był zasadniczo różny od mechanizmu roślin zielonych. Proces asymilacji sukulentów jest tylko wariantem procesu normalnego i jest zrozumiałe, że w odpowiednich warunkach (brak CO_2 , światło) wariant ten pojawia się również u normalnych roślin zielonych, jak np. u *Fontinalis*.

Panu prof. drowi Fr. Górskiemu składam serdeczne podziękowanie za cenne rady i wskazówki udzielone mi w czasie wykonywania niniejszej pracy.

STRESZCZENIE

W niniejszej pracy przedstawiono dane dotyczące przyswajania kwasów jabłkowego i winowego użytych jako substraty w procesie fotosyntezy u *Fontinalis antipyretica* L. Jako rezultat przeprowadzonych badań stwierdzono fakt, iż kwasy jabłkowy i winowy mogą być użyte jako źródło związków zastępujących CO_2 w procesie fotosyntezy. Wskazuje na ten fakt wydajność wydzielanego tlenu, którego ilość porównano z wydajnością fotosyntezy u *Cabomba caroliniana*, a także ścisła zależność tego procesu od natężenia światła i stężenia substratów. Krzywe uzyskane w ten sposób są typowe dla enzymatycznych reakcji fotosyntezy. Są one bardzo podobne zarówno dla kwasu jabłkowego i winowego, jak i CO_2 . Kwasy jabłkowy i winowy mogą być źródłem CO_2 , uwalnianego w procesie β -dekarboksylacji kwasu jabłkowego lub winowego, dającego w wyniku kwas pirogronowy i CO_2 , jak również źródłem innych związków typu kwasów organicznych, które mogą być użyte w procesie fotosyntezy o zmienionej wersji. Ten ostatni proces porównano potem do metabolizmu kwasowego

u sukulentów. Doświadczenia te wykazały, że metabolizm kwasowy u sukulentów i metabolizm w czasie fotosyntezy u *Fontinalis* są bardzo podobne, niemal identyczne.

Zakład Fizjologii Roślin UJ
w Krakowie

(Wpłynęło dn. 11.3.1958 r.)

SUMMARY

This paper presents data on the assimilation of malic and tartaric acids used as substrates during photosynthesis in *Fontinalis antipyretica* L. As a result of the investigation carried out, it was established that malic and tartaric acids can be used as sources of compounds substituting for carbon dioxide in the process of photosynthesis. This fact is indicated by the yield of oxygen exhaled, the quantity of which is subsequently compared with the yield in the photosynthesis of *Cabomba caroliniana* and, in addition, by exact correlation of the process with the light intensity and density of the substrates. The curves thus obtained are typical for enzymatic processes of photosynthesis. They are very similar for malic and tartaric acids as well as for carbon dioxide. Malic and tartaric acids can be a source of carbon dioxide released in the process of β -decarboxylation of the malic or tartaric acids (resulting in pyruvic acid and carbon dioxide) and also as sources for other compounds of the type of organic acids which can be used in the abnormal version of the photosynthesis process. This latter process is then compared with the metabolism of succulents. Crassulacean acid metabolism and the metabolism during the photosynthesis in *Fontinalis* were proved by these experiments to be almost identical.

LITERATURA

- Bassham J. A., Benson A. A., Calvin M., 1950, Jour. Biol. Chem. 185: 781—787.
Bose J. C., 1924, The physiology of photosynthesis, 708, London, Longmans.
Calvin M., Benson A. A., 1948, Science 107: 476.
Calvin M., Bassham J. A., Benson A. A., Lynch V. A., Quillet C., Schou L., Stepka D., Tolbert N. E., 1951, Symp. of Soc. Expl. Biol. V. Carbon dioxide fixation and photosynthesis: 248—305, Cambridge Univ. Press.
Krietowicz W., 1955, Biochemia roślin, 403, Warszawa, P.W.R. i L.
Moyse A., Jolchine-Turpin G., 1954, Huitième Congrès Intern. de Bot. Paris, Section 11: 11—12.
Pucher G. W., Leavenworth C. S., Ginter W., Wickery A. B., 1947, Plant Phys. 22: 360—376.
Smith E. L., 1937, Jour. Gen. Physiol. 20: 807—830.
Steemann—Nielsen E., 1947, Dansk Botanisk Arkiv. 12 (8).
Strébeyko P., 1956, Woda i światło w życiu rośliny, 331, Warszawa, P.W.N.
Stutz R. E., Burris R. H., 1951, Plant Phys. 26: 226—243.
Thomas M., 1951, Symp. of Soc. Expl. Biol. V. Carbon dioxide fixation and photosynthesis, 72, Cambridge Univ. Press.
Thomas M., 1954, Huitième Congrès Intern. de Bot. Paris, Section 11: 30—35.
Treadwell F. P., 1945, Analytical Chemistry Vol. II, 806, New York, Wiley & Sons.
Zbinowsky V., Burris R. H., 1952, Plant Phys. 27: 240—250.