

2 Frakcionace izotopů uhlíku při fotosyntéze aneb Proč jsme ochuzeni o těžký izotop uhlíku?

Jiří Šantrůček

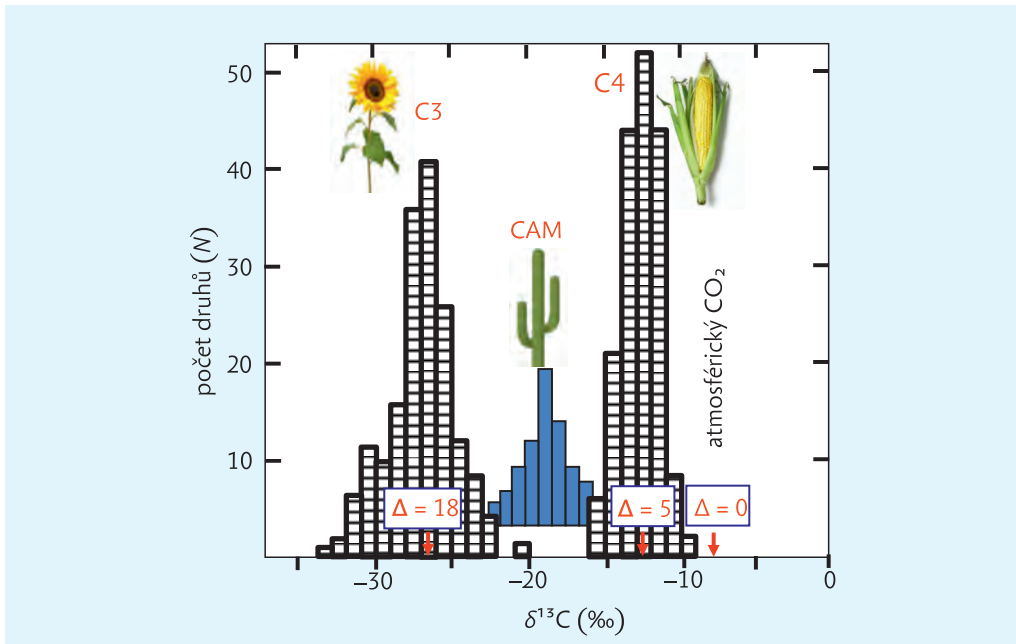
2.1 VYSVĚTLENÍ NA ÚVOD A TROCHA HISTORIE

Stručná odpověď na otázku v názvu kapitoly může znít: protože uhlík, který je v našem těle, prošel nějakým procesem, který diskriminoval těžší izotop uhlíku ^{13}C a dával přednost lehčímu izotopu ^{12}C . Ještě než budeme pátrat po tom, co tím procesem je, musíme doplnit ne zcela přesně formulovanou úvodní otázku. Ochuzení ve srovnání s čím? Asi každý i jen v základech biologie vzdělaný člověk dnes ví, že zdrojem všeho organického uhlíku, a tedy i toho v našich tělech, je oxid uhličitý (CO_2), který je v atmosféře a který se stal organickým díky fotosyntéze. Tedy otázka by měla správněji znít „Proč je uhlík v mém těle relativně ochuzen o izotop ^{13}C proti uhlíku v atmosféře Země?“. Nalézt odpověď vyžaduje jít zpět v našem potravním řetězci a stopovat, jak to vypadá s relativním obsahem ^{13}C v našem jídle, v jídle našeho jídla... Takovým procesem bychom dospěli k závěru, že k podstatnému ochuzení došlo už na samém začátku potravního řetězce, tj. při asimilaci CO_2 rostlinami. Další články potravního řetězce a procesy v něm, např. trávení a dýchání býložravců (herbivorů), masožravců (karnivorů) i naše fyzikální postupy při úpravě stravy, už relativní obsah ^{13}C zásadně nezměnily. A protože „všechno maso bylo dříve tráva“ a současně „izotopově jsme to, co jíme“ (s jen malou změnou), i naše svaly, kosti i nehty nesou izotopový podpis diskriminačního procesu, který se udál v rostlinách už na samém začátku při zabudování uhlíku z CO_2 do organických látek, do jednoduchých tříuhlíkatých cukrů. Tomuto procesu se říká fotosyntetická asimilace uhlíku, zkráceně fotosyntéza.

Každá záležitost, kterou se snažíte pochopit v detailech, se ukáže složitější, než byla na první pohled, strukturovaná a propojená vazbami. Podobně i diskriminace uhlíku při fotosyntéze. Nejen že existují dva až tři z izotopového (i fyziologicko-biochemického) hlediska odlišné typy fotosyntézy suchozemských rostlin – i příčin, které vedou k diskriminaci ^{13}C , je několik a kombinují se. V této kapitole bychom vás rádi přivedli srozumitelnou formou k jejich pochopení, a tedy schopnosti porozumět nerůznějším aplikacím, které se od diskriminace uhlíku při fotosyntéze odvíjejí.

Trochu paradoxní je, že k nejzásadnějšímu biologickému pozorování v oblasti frakcionace ^{13}C dospěli fyzikové už koncem 30. let 20. století, jakmile se jim podařilo zkonstruovat dostatečně citlivý poměrový hmotový spektrometr (IRMS). Analýzami kousků rostlinných pletiv zjistili pozoruhodnou věc, totiž že hmota rostlinného těla je (téměř) vždy ochuzena o izotop ^{13}C ve srovnání s relativním zastoupením $^{13}\text{CO}_2$ v atmosféře, z které rostliny CO_2 čerpaly. Například kdybyste si „nachytali“ náhodně 100 tisíc molekul CO_2 z volné atmosféry a roztřídili je na $^{12}\text{CO}_2$ a $^{13}\text{CO}_2$, zjistíte, že 98 889 molekul bude těch lehčích a zbytek, tedy 1111, těžších. Když v téhle vaší atmosféře vyroste rostlina, jejíž tělo zanalyzujete, zjistíte, že obsahuje mezi 100 000 atomů uhlíku ne 1111, ale o něco méně, přesněji 1091 (\pm několik) atomů ^{13}C , a naopak přibližně o 20 atomů izotopu ^{12}C více. A to vždy, ať měření opakujete, zpřesňujete a ověřujete sebevícekrát. Logicky dojdete po takové zkušenosti k závěru, že rostliny z nějakého záhadného, vám neznámého důvodu „nemají rády“, diskriminují $^{13}\text{CO}_2$ před $^{12}\text{CO}_2$. Tento jev, který dostal název izotopová diskriminace uhlíku při fotosyntéze, byl teprve po 40 letech od prvního pozorování vysvětlen několika skupinami autorů, z nichž největší podíl měli G. D. Farquhar, M. H. O’Leary a J. A. Berry, kteří publikovali svoji práci v roce 1982.

Historie objevů spojených s izotopovou diskriminací uhlíku rostlinami je popsána např. v knize autorů Ehleringera, Halla a Farquhara z roku 1993. Zde zmíníme jen to, že první, kdo pozoroval a uveřejnil svá zjištění, že těžší izotop uhlíku je obsažen v menší míře v rostlinách, byli fyzikové A. O. Nier a E. A. Gulbransen v roce 1939. Dalších asi dvacet let trvalo, než vědci doložili správně podstatu tohoto jevu: CO_2 rozpuštěný ve vodě ještě ochuzen o ^{13}C nebyl, ale uhlík v uhlohydrátech (cukrech z fotosyntézy) už ano (Park a Epstein 1961). K diskriminaci tedy muselo dojít v listech během fotosyntézy. Autoři tehdy ale ještě nesprávně přisuzovali hlavní roli transportu CO_2 kořeny rostlin. Trvalo dalších téměř dvacet let práce geochemiků, biochemiků a rostlinných fyziologů, než bylo zřejmé, co se s izotopem ^{13}C děje, a musel se udát objev existence C_4 a CAM typů fixace uhlíku (Kortschak *et al.* 1965, Hatch a Slack 1966), aby bylo jasné, proč jsou některé druhy rostlin silně ochuzené o ^{13}C a jiné jen minimálně a proč je toto ochuzení závislé částečně na podmínkách prostředí, v kterém rostlina vyrostla. Koncem 70. let bylo jasné, že příčinou izotopového ochuzení rostlin je hlavně karboxylační reakce a v menší míře také difuze CO_2 . Zásahu měli hlavně Graham Farquhar, Maron O’Leary a Joe Berry (1982), kteří přišli na to, že diskriminace je určována hlavně koncentrací CO_2 v mezibuněčných vzdušných prostorech uvnitř listu. Následující desetiletí až dodnes se tento objev rozvíjel, model diskriminace uhlíku zpřesňoval (a stále zpřesňuje, např. Cernusak *et al.* 2013) a objevila se řada jeho aplikací.



Obr. 2-1 Průměrné hodnoty diskriminace izotopu ^{13}C a jejich statistické rozdělení pro skupiny C_3 , CAM a C_4 rostlin. Data pro C_3 a C_4 rostliny jsou převzatá z přehledu 351 druhů trav (*Poaceae*). Hodnoty obsahu izotopu ^{13}C jsou uvedeny v obou notacích, δ i Δ , pro C_3 , C_4 rostliny a atmosférický uhlík v CO_2 . Schematicky jsou vyobrazeni typičtí zástupci C_3 , CAM a C_4 rostlin. Upraveno podle Vogela et al. (1980)

Už víme, že izotopovou diskriminací nazýváme odchylku izotopového efektu od jedničky a značíme ji symbolem Δ (velké delta). Víme také, jak ji z čísel udaných v našem příkladě vypočítat:

$$\Delta^{13}\text{C} = \left[\left(\frac{R_p}{R_a} \right) - 1 \right] \cdot 1000 = \left[\left(\frac{1111/98889}{1091/98909} \right) - 1 \right] \cdot 1000 = 18,5 \text{ ‰}$$

(R_p je molární izotopový poměr $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v rostlině, R_a v atmosféře). Náš výsledek, $\Delta^{13}\text{C} = 18,5 \text{ ‰}$, je typický pro skupinu tzv. C_3 rostlin, které asimilují (fixují) CO_2 z atmosféry pomocí enzymu ribulóza 1-5 bisfosfát karboxyláza oxygenáza (zkráceně RuBisCO, Rubisco) a primárním produktem fixace je tříuhlíkatý cukr (proto C_3 rostliny). Vedle toho existuje druhově méně početná skupina rostlin s tzv. C_4 typem asimilace CO_2 , které využívají pro prvotní fixaci CO_2 jiný karboxylační enzym fosfoenolpyruvát karboxylázu a prvním stabilním produktem takové fixace je čtyřuhlíkatá organická kyselina (proto C_4 rostliny). Sem patří např. tropické trávy, z plodin na našich polích kukuřice, ale také např. cukrová třtina nebo čirok. Obě skupiny C_3 a C_4 rostlin diskriminují $^{13}\text{CO}_2$ v jiné míře, a to tak, že se hodnoty diskriminace získané pro rostliny z obou skupin nepřekrývají (obr. 2-1). Vedle obou izotopově odlišných C_3 a C_4 typů rostlin existuje ale ještě

skupina nazývaná CAM (z angl. *Crassulaceae Acid Metabolism*), do níž patří rostliny typem metabolismu fixace CO_2 blízké C_4 , které ale jeho jednotlivé fáze provozují odděleně v čase – během dne nebo noci. Kromě tlustice (*Crassula*) a řady jiných tučnolistých druhů a kaktusů sem patří např. agáve nebo ananas. CAM rostliny jsou hodnotou diskriminace mezi C_3 a C_4 rostlinami.

Obrázek 2-1 ukazuje tři pozoruhodné skutečnosti: jednak že všechny rostliny jsou ochuzené o izotop ^{13}C oproti atmosféře, zadruhé že míra diskriminace je specifická pro C_3 , CAM a C_4 rostliny a zatřetí že míra diskriminace se může lišit také mezi druhy uvnitř každé ze skupin C_3 , CAM a C_4 , přičemž největší variabilita je mezi C_3 rostlinami. Pojďme nejprve pátrat po příčinách. Proč rostliny méně ochotně asimilují $^{13}\text{CO}_2$ a poněkud preferují $^{12}\text{CO}_2$? A proč je diskriminace $\Delta^{13}\text{C}$ kladné číslo? Po přečtení předchozích kapitol asi tušíte, kam směřujeme: k tzv. kinetické a rovnovážné frakcionaci. Kinetická frakcionace odráží rozdíly v rychlosti reakcí pro obě izotopově odlišné látky (izotopology), zatímco frakcionace během reakcí, které probíhají oběma směry, je důsledkem rozdílů rovnovážných konstant pro oba izotopology. Jak se oba typy frakcionace projevují při fotosyntetické asimilaci CO_2 ?

2.2 KINETICKÁ IZOTOPOVÁ FRAKCIONACE CO_2 BĚHEM DIFUZE

Molekuly CO_2 se dostávají z atmosféry dovnitř listů difuzí (tj. transportem po spádu koncentrace) přes otvory v pokožce listu (tzv. průduchy), které rostlina zavírá nebo otevírá hlavně podle toho, zda má dostatek vody a zda svítí slunce. Těžší molekuly CO_2 ($^{13}\text{CO}_2$) ale difundují pomaleji než lehčí $^{12}\text{CO}_2$, protože se při dané teplotě pohybují s menší střední rychlostí mezi dvěma molekulárními kolizemi. Molekulární tok $^{13}\text{CO}_2$ bude tedy menší než tok $^{12}\text{CO}_2$. Toto fyzikové vyjadřují tzv. difuzním koeficientem D , který je pro těžší $^{13}\text{CO}_2$ nižší než pro lehčí $^{12}\text{CO}_2$. Například jeho hodnota pro difuzi $^{12}\text{CO}_2$ ve vzduchu (při 20 °C) je $D_{^{12}\text{CO}_2} = 0,1603 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a pro $^{13}\text{CO}_2$ $D_{^{13}\text{CO}_2} = 0,1596 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Poměr $D_{^{12}\text{CO}_2}/D_{^{13}\text{CO}_2}$ (číselně zde 1,004 4) se nazývá **izotopový efekt α** a říká nám, že CO_2 je po proběhlé difuzi 1,0044× obohaceno o $^{12}\text{CO}_2$, resp. 0,9956× ochuzeno o $^{13}\text{CO}_2$ ve srovnání s původním stavem před difuzí. Dlouhá desetinná čísla se špatně pamatují, proto se z izotopového efektu odvodila veličina frakcionační faktor jako odchylka izotopového efektu od jedničky $\varepsilon = (\alpha - 1) \cdot 1000$.¹² Faktor ε je tedy také bezrozměrná veličina, vyjádřená obvykle v promile (‰, jedno promile = jedna tisícina). Takže v našem případě difuze CO_2 ve vzduchu je $\varepsilon_a = (1,0044 - 1) \cdot 1000 = 4,4 \text{ ‰}$ (index „a“ je z anglického *air*).

¹² Pojmy „frakcionační faktor“ a „diskriminace“ jsou matematicky identické. Diskriminace (Δ) se používá pro vyjádření relativního rozdílu v izotopovém složení mezi substrátem a produktem, zatímco frakcionační faktor (ε) vyjadřuje míru frakcionace charakteristickou pro daný proces (např. difuzi, karboxylaci).