

Розділ III ФІЗІОЛОГІЯ ФОТОСИНТЕЗУ

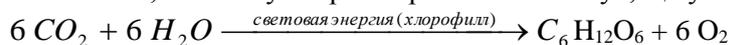
Тема 1 Фотосинтетичні пігменти (частина 1)

Мета заняття - дослідити основні фізичні та хімічні властивості окремих фотосинтезуючих пігментів рослинної клітини, ефективність роботи фотосистем та асиміляційні характеристики тканин зеленої рослини, оволодіти основними засобами визначення якісного та кількісного складу пігментів.

Питання до обговорення.

1. Пігментний апарат фотосинтезуючих органів рослин. Фотосистеми.
2. Склад, будова, хімічні та фізичні властивості хлорофілів.
3. Склад, будова, хімічні та фізичні властивості каротиноїдів.
4. Склад, будова, хімічні та фізичні властивості фікобілінів.

Фотосинтез — процес перетворення енергії світла, що поглинається фотосинтезуючими пігментами, в хімічну енергію органічних сполук, що утворюються з діоксиду вуглецю і води:

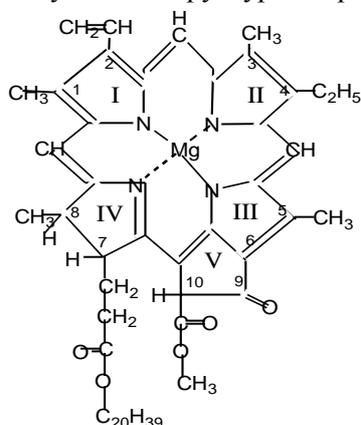


Фотосинтез відбувається в двомембранних органелах -хлоропластах. Хлоропласт містить систему ламелярних подвійних мембран — тілакоїдів, утворених внутрішньою мембраною. В тілакоїдах здійснюється світлова фаза фотосинтезу, тобто перетворення енергії світлового проміння в хімічну енергію молекул АТФ і НАДФН·Н, а біохімічні реакції відновлення CO_2 і синтезу вуглеводів відбуваються в міжтілакоїдному просторі.

В мембранах тілакоїдів містяться наступні пігменти: хлорофіл *a* ($\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$) — зелений з синюватим відтінком; хлорофіл *b* ($\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{O}_6\text{N}_4\text{Mg}$) — зелений з жовтим відтінком; каротин ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$) — жовто-помаранчевий; - ксантофіл ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$) — золотисто-жовтий. Всі ці пігменти не розчинні у воді, але розчиняються в органічних розчинниках (спирті, ацетоні і ін.).

За хімічною природою хлорофіл (рис.1) є складним ефіром дікарбонової кислоти хлорофіліну і двох спиртів — метанолу CH_3OH і фітолу $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{OH}$. Хлорофілін містить порфіринове ядро, що складається з чотирьох пірольних кілець, сполучених один з одним метиновими містками $=\text{CH}-$. В центрі порфіринового ядра розташований атом магнію, сполучений з атомами азоту пірольних кілець. Крім того, в ядрі молекули хлорофілу є п'яте кільце — циклопентанове, що містить карбонільну групу. Хлорофіл *b* відрізняється від хлорофілу *a*, лише тим, що у другого пірольного кільця замість метильної групи є альдегідна.

Рисунок 1. Структура хлорофілу *a*



Порфіринове ядро має гідрофільний характер і пов'язане з білками мембран. В той же час довгий гідрофобний «хвіст», утворений залишком фітолу, обернений у бік ліпідних шарів тілакоїдів і обумовлює добру розчинність хлорофілу в неполярних розчинниках (бензин, петролейний ефір). Проте для повного добуття хлорофілу з листя використовують не ці безводні розчинники, а спирт або ацетон, що містить невелику кількість води, необхідної для гідролізу хлорофіл-білкового комплексу.

Разом з хлорофілами *a* і *b* в хлоропластах містяться каротиноїди — група жовтих пігментів, що є за хімічною природою тетратерпеноїдами (8 залишків ізопрену C_3H_8).

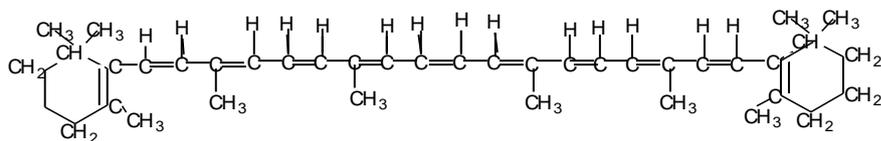


Рисунок 2 Структура β- каротину

Каротини (в основному β- каротин) — ненасичені вуглеводні, що містять два симетрично розташованих іононових кільця, сполучених довгим вуглецевим ланцюгом (рис.2). Серед ксантофілів, що є кисневмісними похідними каротину, переважає лютеїн, який має в кожному іононовому кільці спиртову групу.

Лабораторна робота 1. Отримання витяжки пігментів зеленого листа.

Матеріали і обладнання: 1) листя кімнатних рослин; 2) 85% етиловий спирт; 3) CaCO₃ 4) кварцовий пісок або товчене скло; 5) фарфорові ступки (2 шт.); 6) колби (2 шт.); 7) воронки (2 шт.); 8) скляна паличка; 9) паперові фільтри.

Хід роботи

Свіже або сушене листя (0,5-2 г) подрібнити ножицями, відкинувши крупні жилки і черешки, помістити в ступку, додати на кінчику ножа CaCO₃ (для нейтралізації кислот клітинного соку) і трохи чистого кварцового піску або товченого скла. Ретельно розтерти, підливаючи потроху 85 % етиловий спирт і злити отриманий темно-зелений розчин по паличці у воронку з фільтром. Підлити в ступку ще трохи спирту, розтерти і злити на той же фільтр. Повторити цю операцію кілька разів до повного вилучення пігментів (всього витратити до 10 мл спирту).

Лабораторна робота 2. Хімічні властивості пігментів.

Матеріали і обладнання: 1) спиртова витяжка пігментів; 2) 20% розчин КОН в крапельниці; 3) бензин; 4) пробірка з притертою пробкою; 5) 10% соляна кислота в крапельниці; 6) оцтовокисла мідь; 7) пробірки (2 шт.); 8) скальпель; 9) утримувач для пробірок; 10) спиртівка; 11) сірники.

2.1 Омилення хлорофілу лугом.

При додаванні лугу до розчину хлорофілу відбувається реакція омилення: відщеплюються спирти — метанол і фітол, а двоосновна кислота хлорофілін утворює сіль:



Солі хлорофілінів мають зелене забарвлення, але відрізняються від хлорофілу нерозчинністю в бензині.

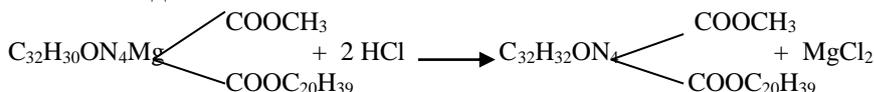
Хід роботи

До 2—3 мл спиртової витяжки пігментів додати 4—5 крапель 20% розчину лугу і збовтати. Підлити в пробірку рівний об'єм бензину, сильно струсити і дати відстоятися.

Завдання: відзначити забарвлення нижнього спиртового і верхнього бензинового шарів (замалювати). Вказати, які речовини розчинені в спирті, і які в бензині, маючи на увазі, що жовті пігменти з лугом не реагують. Записати реакцію омилення хлорофілу.

2.2 Отримання феофітину і відновлення металоорганічного зв'язку

Якщо до розчину хлорофілу додати невелику кількість соляної кислоти, то можна одержати бруо-оливковий феофітин — продукт заміщення магнію в молекулі хлорофілу двома атомами водню:



Металоорганічний зв'язок можна відновити шляхом нагрівання феофітину з оцтовокислою міддю: атом двовалентного металу витісняє водень з феофітину; оцтова кислота, що утворюється при цьому, служить каталізатором.

Хід роботи

Налити в дві пробірки по 3—4 мл спиртової витяжки пігментів зеленого листа і додати в них по 2—3 краплі 10% соляної кислоти. Відзначити забарвлення отриманого продукту реакції.

В одну з пробірок з феофітином внести декілька кристалів оцтовокислої міді і довести розчин до кипіння (нагрівати слід обережно, не допускаючи викидання рідини з пробірки). Якщо забарвлення не зміниться, додати ще оцтовокислій міді і продовжувати нагрівання. Відзначити зміну забарвлення, викликану заміщенням двох атомів водню у феофітині атомом міді.

Завдання: замалювати пробірки і написати рівняння прямої і зворотної реакцій.

Лабораторна робота 3 Розділення суміші фотосинтетичних пігментів.

Один з перших методів розділення пігментів був запропонований німецьким вченим Краусом в 1860 р. Він заснований на різній розчинності пігментів в спирті і бензині. Ці розчинники не змішуються при зливанні і утворюють два шари: верхній — бензиновий, де розчинені хлорофіли і каротин, і нижній — спиртовий, де розчинений ксантофіл.

Цей метод не дозволяє розділити хлорофіли *a* і *b*, проте його доцільно використовувати для отримання жовтих пігментів каротину і ксантофілу у великих кількостях.

Для розділення і отримання хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів застосовують інший метод розділення пігментів, розроблений в 1906 р. російським вченим М. С. Цветом. Метод отримав назву **адсорбційного**. Саме він лежить в основі сучасних методів хроматографії.

Суть методу полягає в тому, що різні речовини мають неоднакову здатність адсорбуватися на твердому порошкоподібному адсорбенті. Якщо суміш пігментів листа, розчинену в якому-небудь органічному розчиннику, наприклад бензині, пропустити через сухий адсорбент (цукрова пудра, крохмаль, вуглекислий кальцій, окис цинку, фільтрувальний папір), то відбудеться розділення пігментів. Кожний пігмент має визначену, тільки йому властиву здатність адсорбуватися на даному адсорбенті. В результаті на адсорбційній колонці пігменти розділяться і розподіляться в певному порядку.

До різновиду адсорбційного методу відноситься і метод розділення пігментів за допомогою паперової хроматографії, розроблений в 1951 р. і до теперішнього часу широко застосовується при розділенні сумішей різних сполук і їх ідентифікації.

Матеріали і обладнання: 1) штатив з пробірками; 2) 75 % етанол; 3) NaOH або KOH кристалічний; 4) бензин; 5) ступка з товчачиком; 6) терези з важками; 7) ділильна воронка; 8) конічна колба з пробкою, в яку вставляють адсорбційну колонку; 9) адсорбційна колонка, скляні бюкси з притертими кришками; 10) вата; 11) ацетон; 12) прожарений Na₂SO₄; 12) хроматографічний папір (1,5 x 13 см); 13) дистильована вода; 14) абсолютно суха цукрова пудра або крохмаль; 15) крейда (1 x 10 см).

3.1 Метод Крауса

Заснований цей метод на різній розчинності пігментів в спирті і бензині. Ці розчинники не змішуються при зливанні і утворюють два шари: верхній — бензиновий, де розчинені хлорофіли і каротин, і нижній — спиртовий, де розчинений ксантофіл.

Хід роботи

В пробірку з 3-5 мл спиртового розчину пігментів додають таку ж кількість бензину і одну краплю води (для кращого відділення спирту від бензину). Пробірку добре збовтують і дають суміші пігментів відстоятися. Відбувається розшарування рідини: у верхній, бензиновий, шар, переходять обидва хлорофіли і каротин, в нижньому, спиртовому, шарі залишається жовтий пігмент — ксантофіл, оскільки він краще, ніж бензин, розчинний в спирті.

Для відділення каротину від хлорофілу верхній бензиновий шар піпеткою переносять в чисту пробірку. В цій зеленій витяжці каротин непомітний, оскільки його маскує хлорофіл, переважаючий кількісно. В пробірку додають 2 мл етилового спирту і 3—4 краплі води, вносять декілька кристалів луку і сильно струшують. При взаємодії луку з хлорофілом відбувається його омилення, утворюється лужна сіль хлорофіліну, яка легко переходить з бензину в спирт. В результаті в пробірці утворюються два шари: верхній, бензиновий, шар — жовтого кольору, що містить каротин і нижній, спиртовий, — зеленого кольору, що містить лужну сіль хлорофіліну.

Завдання: замалювати пробірки з розділеними пігментами; зробити висновки про розчинність пігментів в різних розчинниках і способах виділення індивідуальних пігментів.

3.2 Метод Цвета

Недоліком методу Крауса є те, що за допомогою нього складно провести кількісний аналіз пігментного складу рослини (не розділяються хлорофіли). Для розділення і отримання хлорофілів *a* і *b* і каротиноїдів застосовують інший метод розділення пігментів - адсорбційний.

Хід роботи

1. Приготування витяжки пігментів з листя рослин.

Наважку свіжого листя (3 г) ретельно розтирають у фарфоровій ступці з невеликою кількістю розчинника, що складається з суміші 10 мл бензину і 10 мл ацетону. Продовжують розтирання до гомогенного стану з одночасною екстракцією пігментів невеликими порціями суміші.

Осад і надосадову рідину переносять на складчастий паперовий фільтр. Ступку змивають невеликою кількістю чистого ацетону і також зливають на паперовий фільтр.

2. Концентрування пігментів в бензині.

Відфільтровану витяжку переливають в пробірку на 50 мл і проводять відмивання ацетону для концентрації пігментів в бензиновій фракції. Обережно, додають 30 мл дистильованої води та декілька разів перевертають пробірку так, щоб не утворилася стійка емульсія. Після розділення рідини на дві фази: усі пігменти переходять у верхню – бензинову, а ацетон у нижню – водну. Обережно дозатором відбирають верхній бензиновий шар, що містить пігменти. Очищену від домішок сконцентровану витяжку пігментів переливають в бюкс з притертою кришкою і висипають туди 3—5 г прожареного Na_2SO_4 , залишають на 15-20 хв для повного зневоднення екстракту. Це дуже важливо для подальшого розділення пігментів на адсорбційній колонці.

3. Приготування адсорбційної колонки.

Адсорбційна колонка є скляною трубкою діаметром 1-1,5 см і завдовжки 10-15 см, звужена на одному кінці. В звужений кінець трубки вкладають шматочок вати, щоб цукрова пудра не висипалася. Невеликими порціями вводять в колонку, добре висушену цукрову пудру або крохмаль на 2/3 її висоти, злегка постукуючи об твердий предмет. Для успішного розділення пігментів треба мати абсолютно сухі колонки, цукрову пудру (крохмаль, крейду) і прожарений сірчаноокислий натрій і стежити за рівномірним наповненням цукрової пудри у всьому об'ємі трубки.

4. Розділення пігментів.

Бензинову витяжку (1—3 мл) обережно наливають по краю трубки у вільний простір колонки. Через декілька хвилин відбувається розділення і відокремлення пігментів. Зверху колонки залишається зелена зона, що складається з суміші пігментів, потім жовто-зелена зона хлорофілу *b*, потім синьо-зелена зона хлорофілу *a*, нижче розташовується зона темно-жовтого пігменту ксантофілу, а в самому низу колонки — яскраво-жовтий каротин, який першим змивається з колонки (рис. 5.3). Пігменти по черзі можна змити з колонки бензином і зібрати у випарувальні чашки або колби для подальшого дослідження.



- 1 — каротин;
- 2 — ксантофіл;
- 3 — хлорофіл *a*;
- 4 — хлорофіл *b*;
- 5 — скляна колонка з адсорбентом;
- 6 — бензиновий екстракт;
- 7 -- шматочок вати;
- 8 — конічна колба

Рисунок. 3 Розділення пігментів на адсорбційній колонці (за М. С. Цветом):

Розділення пігментів зеленого листа можна проводити на шматку крейди у формі стовпчика, задалегідь добре висушеного в сушильній шафі. Одним кінцем крейду занурюють на 0,5-1,0 см в бензиновий екстракт пігментів (теж осушений Na_2SO_4). Чітке розділення пігментів відбувається протягом 5-10 хв.

Завдання: зробити малюнок розділення пігментів на колонці і підписати зони з різними пігментами.

3.3 Метод хроматографії на папері

Цей метод заснований на розділенні пігментів між волокнами целюлози хроматографічного паперу і рухомою фазою — розчинником. Коли розчин рухається по паперу під дією капілярних сил, то молекули пігментів розподіляються між двома фазами. Чим вище розчинність пігменту в рухомій фазі, тим далі він просувається по паперу разом з розчинником, і навпаки.

Відстань, пройдена нанесеним на папір пігментом характеризується величиною R_f , яка є відношенням відстані, пройденої розчинним пігментом, до відстані, пройденої фронтом розчинника. В стандартних умовах ця величина для даного пігменту постійна і відповідає його коефіцієнту розподілу.

При висхідній хроматографії паперову смужку підвішують вертикально; її нижній кінець, на який нанесена суміш пігментів, занурюють в розчинник. При цьому місце нанесення суміші повинне знаходитися вище за рівень розчинника. Під час руху розчинника під дією капілярних сил вертикально вгору відбувається розділення розчинених речовин.

Хід роботи

Смужку хроматографічного паперу шириною 2 см і довжиною, відповідною висоті судини, кладуть на чисту поверхню і олівцем креслять лінію старту на відстані 1 см від краю.

З приготовленої ацетонової витяжки беруть капіляром невелику порцію екстракту і наносять її на стартову лінію хроматографічного паперу у вигляді плями діаметром не більше 1 см. Папір підсушують на повітрі і нанесення повторюють 5-10 разів, щоб сконцентрувати пігмент і не допустити утворення великої плями.

Висушивши смужку до повного зникнення запаху ацетону, помістити її у вертикальному положенні в циліндр, на дно якого налита суміш бензолу і бензину (3:1). Смужку потрібно підвісити на гачок так, щоб в розчинник був занурений тільки незабарвлений кінець, і щоб вона не торкалася стінок судини. У зв'язку з тим, що пігменти руйнуються на світлі, розділення слід проводити в темряві або при слабкому освітленні.

Через 10-15 хвилин розчинник підніметься на 10-12 см. Пігменти розподіляються в наступному порядку: першим знизу адсорбується хлорофіл *b* жовто-зеленого кольору, потім синьо-зелена зона хлорофілу *a*, вище — жовтий ксантофіл, каротин дуже швидко рухається і розташовується зверху смужки хроматографічного паперу у фронті розчинника, він має темно-жовтий колір.

Після закінчення розділення пігментів хроматограму виймають, зразу ж відзначають межу підйому розчинника, так звану лінію фронту, висушують і розраховують значення R_f для кожного пігменту.

Завдання: наклеїти хроматограму в зошит. Плями пігментів обвести відповідним за кольором олівцем (пігменти нестійкі, швидко руйнуються і втрачають колір). Відзначити у висновку переваги методу розділення пігментів за допомогою паперової хроматографії.

Тема 1 Фотосинтетичні пігменти (частина 2)

Лабораторна робота 4. Оптичні властивості пігментів зеленого листа. Спектри поглинання пігментів.

Найважливіша властивість хлорофілу — його здатність поглинати світлову енергію в межах видимої частини спектру (380—720 нм). Поглинання світла хлорофілом є не суцільним, а виборчим.

В цьому можна переконатися, пропускаючи біле світло через розчин хлорофілу, а потім розкладаючи його за допомогою призми. Окремі ділянки спектру виявляться поглиненими, а на їх місці будуть видні темні смуги. Отриманий спектр називається **спектром поглинання**.

Зіставляючи спектри поглинання розчинів різної концентрації, можна встановити ступінь поглинання окремого променя: чим слабше поглинається дана ділянка спектру, тим більш концентрований потрібно узяти розчин, щоб добитися зникнення цієї ділянки в спектрі поглинання. Проміння, що сильно поглинається, можна визначити за смугами в спектрі поглинання дуже розбавленого розчину, тоді як проміння, що найменше поглинається, проходить навіть через досить концентрований розчин. Спектр поглинання каротиноїдів охоплює тільки короткохвильову область видимого спектру (до 540 нм).

Матеріали і обладнання 1) концентрована спиртова витяжка хлорофілу; 2) розчин каротину; 3) розчин ксантофілу, отриманий при розділенні пігментів за Краусом; 4) етиловий спирт; 5) спектроскоп; 6) настільна лампа потужністю 100 Вт.

Хід роботи

Направити спектроскоп на джерело світла. Відрегулювати ширину щілини на кінці труби спектроскопа так, щоб спектр вийшов чітким і достатньо яскравим (при дуже широкій щілині спектр виходить розмитим, нечистим, при дуже вузькій щілині освітленість спектру недостатня).

Налити досліджуваний розчин в пробірку і закріпити її в лапці штатива перед щілиною спектроскопа. Вивчити спектри поглинання розчинів хлорофілу, каротину і спиртовий розчин ксантофілу, отриманий при розділенні пігментів за Краусом.

Розчин	Колір						
	ф	с	г	з	ж	п	ч
Хлорофілу							
Каротину							
Ксантофілу							

Завдання: замальовати спектри за формою, наведеною в таблиці, причому ділянки, які поглинаються, закрасити чорним, а видимі ділянки — кольоровими олівцями:

Лабораторна робота 2. Флуоресценція хлорофілу

Флуоресценція є свідченням активності речовин при поглинанні ними світла. Флуоресценція хлорофілу, не будучи фотосинтетично утилізованою формою енергії, служить ознакою його фотохімічної активності.

В темряві молекула хлорофілу знаходиться в основному стані з найнижчим енергетичним рівнем валентних електронів. При поглинанні кванта світла один з π -електронів молекули хлорофілу переходить на більш високий енергетичний рівень, внаслідок чого виникає електронно-збуджений стан молекули. При поверненні із збудженого стану в основний енергія електронів може витратитися на: 1) фотохімічну роботу, 2) збудження сусідніх молекул хлорофілу, 3) втрату у вигляді тепла, 4) флуоресцентне випромінювання. Незалежно від довжини хвилі спектр флуоресценції хлорофілу a має максимум при 670 нм. Хлорофіл сильно флуоресцирує в розчинах і слабо — в листі, що пояснюється щільною упаковкою молекул в тілакоїдах і використанням поглиненої енергії у фотохімічних процесах.

Хід роботи

Витяжку пігментів в пробірці помістити на темному фоні у світлі настільної лампи або освітити пучком світла проекційного ліхтаря. Розглянути витяжку з тієї сторони, звідки падає світло (рис.1).

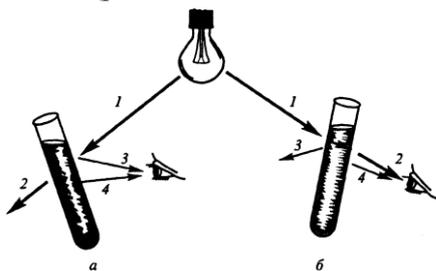


Рисунок. 1. Спиртова витяжка хлорофілу у світлі, що відбивається (а) і прямому промінні (б):

1 — світло лампи, що освітлює пробірку з розчином хлорофілу та збуджує його флуоресценцію; 2 — світло лампи, що проходить через пробірку з розчином хлорофілу; 3 — світло лампи, відбите від пробірки; 4 — флуоресценція хлорофілу.

Завдання: відзначити забарвлення розчину і зробити висновок про причину флуоресценції.

Тема 2 ФІЗІОЛОГІЯ СТАДІЙ ФОТОСИНТЕЗУ

Мета.

Дослідити основні етапи світлової та темної стадій фотосинтезу, зокрема шлях електронів по ЕТЛ, відновлення НАДФН x H, синтез АТФ та використання цієї енергії для фіксації вуглецю у циклі Кальвіна або Хета-Слека-Карпілова; визначити інтенсивність фотосинтезу за збільшенням вмісту органічних речовин в залежності від зовнішніх умов.

Питання до обговорення.

5. Фото фізичний етап фотосинтезу.
6. Фотохімічний етап фотосинтезу. Фотоліз води. Утворення НАДФНхН та АТФ. Циклічний та нециклічний транспорт електронів.
7. С3-шлях фотосинтезу. Цикл Кальвіна.
8. С4-фотосинтез. САМ-метаболізм.

Лабораторна робота 1 Фотосенсибілізуюча активність хлорофілу

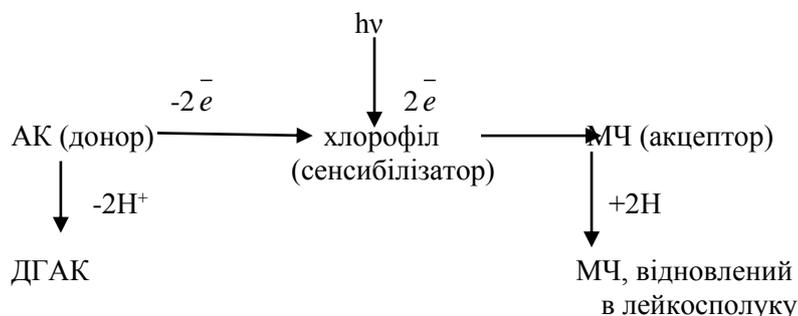
Матеріали і обладнання: 1) лампа 100 W; 2) штатив; 3) пробірки; 5) ступка; 6) товкач; 7) чорний папір; 8) етанол; 9) кристалічна аскорбінова кислота (АК); 10) насичений спиртовий розчин метилового червоного (МЧ) на 70 % спирті; 11) зелене листя рослин.

В 1948 р. академік А. А. Красновський простим дослідом довів, що хлорофіл у фотосинтезі є учасником і ініціатором окислювально-відновних реакцій. Показати цю здатність хлорофілу можна в модельному досліді за допомогою двох сполук — аскорбінової кислоти (АК) і метилового червоного (МЧ), які мають окислювально-відновні властивості. АК здатна до необоротної окислювально-відновної реакції з утворенням дегідроаскорбінової кислоти (ДГАК), що супроводжується перенесенням електрону до акцептора:



В цьому полягає найважливіша функція АК в клітинах живих організмів, де вона виступає як джерело енергії, віддаючи електрони і протони в дихальний електрон-транспортний ланцюг. Окислювально-відновний потенціал (E_0) АК рівний 0,1 eВ (при рН 5,75). АК є відновником, а в даній реакції — донором електронів.

МЧ також має окислювально-відновні властивості, і його E_0 складає 0,8 eВ. Будучи окислювачем, МЧ через велику різницю потенціалів ($\Delta E_0 = 0,7$ eВ) не може окислити АК спонтанно. Проте здійснити відновлення МЧ можна за допомогою фотосенсибілізатора, тобто речовини, що використовує енергію світла і стимулює хімічну реакцію, але не бере участь в ній. Таким чином моделюється принцип ланцюга окислювально-відновних реакцій, що відбуваються при фотосинтезі після поглинання світла молекулами хлорофілу. Транспорт \bar{e} в окислювально-відновній реакції з участю фотосенсибілізатора (збудженого хлорофілу) можна представити у вигляді схеми:



В тілакоїдній мембрані хлоропласту завдяки високоенергетичному електрону (\bar{e}) хлорофіл має властивості сильного відновника і може відновлювати редокс-системи з великим негативним потенціалом. Електрон, що віддається при цьому, залишається високоенергетичним і може свою енергію витратити на подальші окислювально-відновні реакції, направлені на перенесення протонів із зовнішньої сторони мембрани тілакоїда на внутрішню для подальшого синтезу АТФ.

Хід роботи

Листя (0,5 г) подрібнюють в ступці з додаванням 5-6 мл етанолу. Осад пропускають через воронку з паперовим фільтром, екстракт хлорофілу (ХЛ) розливають порівну в три пробірки. Дослід закладають в чотирьох варіантах (таблиця 1.).

Таблиця 1. Виявлення фотохімічної активності хлорофілу

Варіант	Компоненти середовища і освітленість	Первинне забарвлення	Зміна забарвлення	Причини зміни забарвлення або їх відсутність
I	ХЛ + МЧ + АК			
II	ХЛ + МЧ + АК			
III	ХЛ + МЧ +			
IV	МЧ + АК +			

В четверту пробірку наливають стільки ж етанолу. Потім у всі чотири пробірки по краплях додають спиртовий розчин метилового червоного, поки зелене забарвлення не набуває бурого кольору у перших трьох варіантах досліду і червоний в IV варіанті. Багато додавати метилового червоного не слід.

В пробірки I, II і IV варіантів додають по 30 мг (на кінчику скальпеля) кристалічної аскорбінової кислоти і струшують. В II варіанті пробірку закривають чорним папером. Штатив з пробірками ставлять безпосередньо перед яскравою лампою, помістивши між ними судину з водою з плоскопаралельними стінками, щоб запобігти нагріванню розчинів.

Через 10—20 хв від початку експозиції в одній пробірці відбуваються зміни, і розчин знову набуває зеленого забарвлення, оскільки метиловий червоний відновлюється в лейкосполуку, і лише хлорофіл забезпечує зелене забарвлення розчину.

В решті варіантів досліду червоне і червоно-буре забарвлення не змінюються.

Завдання: замалювати пробірки в кінці досліду, після зміни забарвлення в одному з варіантів. Зробити висновки щодо фотосенсибілізуючої активності хлорофілу, ролі АК, МЧ і світла.

Лабораторна робота 2 Визначення інтенсивності фотосинтезу і дихання за зміною вмісту вуглецю.

Матеріали і обладнання: 1) колба конічна на 50 мл; 2) бюретка для титрування; 3) воронка (діаметр 4 см) або пробка-холодильник; 4) піпетка; 5) пробкове свердло; 6) терези; 7) лампа для освітлення; 8) рослини герані, примули; 9) $K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$ (19,614 г $K_2Cr_2O_7$ розчиняють в дистильованій воді і доводять до 0,4 л. Переливають розчин в колбу на 1 л і тоненькою цівкою підливають до нього концентровану сірчану кислоту); 10) сіль Морю 0,2 н ($(NH_4)SO_4 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O$). Відбирають тільки блакитно-зелені кристали, які не мають бурого нальоту. Зважують 80 г. Розчиняють в дистильованій воді, яка містить 20 мл концентрованої сірчаної кислоти на 1 л. Кислоту додають для того, щоб запобігти окисленню двовалентного заліза в тривалентне і утворенню при гідролізі основних солей заліза, які викликають помутніння розчину. Доводять дистильованою водою до 1 л. Нормальність солі Морю встановлюють за 0,1 н розчином біхромату калію. Для цього набирають піпеткою 15 мл 0,1 н розчину $K_2Cr_2O_7$, переносять в колбу для титрування, додають 5 мл концентрованої сірчаної кислоти, 3-5 мл фенілантранілової кислоти і титрують розчином солі Морю до переходу забарвлення з вишнево-фіолетового в зелене.

$$K = \frac{2,5 \times 0,1}{a} \quad (6.1.), \text{ де}$$

K - нормальність розчину солі Морю; a - об'єм розчину солі Морю, витрачений при титруванні $K_2Cr_2O_7$. 11) фенілантранілова кислота. Розчинити 0,2 г кислоти в 100 мл 0,2% розчину соди (безводної). Для кращого змочування порошку наважку заздалегідь замісити в декількох мл 0,2% розчину соди у фарфоровій чашці скляною паличкою до сметаноподібного стану. Після цього додають залишок соди і ретельно перемішують.

Визначення асимілюючої здатності рослин за зміною вмісту вуглецю аналогічно методу

Сакса, коли про інтенсивність процесу фотосинтезу судять за збільшенням сухої ваги одиниці поверхні листя за певний проміжок часу. Ці методи характеризують загальний баланс в накопиченні органічних речовин, різниця між утворенням асимілянтів і відтоком їх до інших органів і використанням в процесі дихання. Щоб отримати уявлення про новоутворення речовин в процесі фотосинтезу, необхідно поставити спеціальні досліди в темряві для визначення відтоку і витрати асимілянтів.

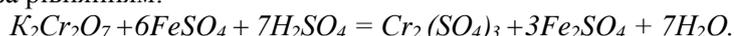
В основі методу лежить визначення вуглецю методом мокрого озолення органічних речовин біхроматом калію в кислому середовищі ($K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$). Вуглець окислюється до CO_2 .



За кількістю використаного $K_2Cr_2O_7$ розраховують кількість окисленого вуглецю.

Надлишкову кількість біхромату калію, яка була використана на окислення органічних речовин, визначають титруванням 0,2 н розчином солі Морю ($(NH_4)_2SO_4 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O$).

Реакція йде за рівнянням:



Спочатку в листі рослин визначають початкову кількість вуглецю (на одиницю поверхні). Потім рослину переносять на деякий час в умови освітлення (фотосинтез) або темряви (дихання) і після закінчення експозиції визначають повторно кількість вуглецю в органах, що вивчаються. За різницею між першим і другим визначенням роблять висновок про кількість накопиченого або використаного вуглецю.

Хід роботи.

Для дослідів використовують листя одного ярусу. Досліди проводять з листям, яке не відокремлено від рослини. На двох рослинах зробити висічки (5 шт.) з однієї половини листа. Після чого одну рослину (**A**) залишають на яскравому світлі, а іншу (**B**) поміщають у темряву.

Через 2 години знову визначити вміст вуглецю, зробивши висічки з другої половини листа. Визначення вуглецю проводиться таким чином: висічки помістити в конічні колби. При роботі з листям герані, примули беруть 6-8 см² листовій поверхні, дуба - близько 2 см².

В колби з бюреток наливають 10 мл 0,4 н хромової суміші, яку випускають з бюретки поволі і з однаковою швидкістю. Для рівномірного кипіння опустити в рідину декілька скляних капілярів. Колби закривають маленькими скляними воронками або холодильниками і ставлять на азбестову сітку на задалегідь розігріту електричну плитку. Можна користуватися і піщаною лазнею. По мірі нагрівання спочатку виділяються дуже дрібні пухирці вуглекислого газу з карбонатів і бікарбонатів, які містяться в листі. Через 3-5 хв починається кипіння рідини. Повільне кипіння повинне продовжуватися 5 хв. За цей час органічна речовина згорає, і розчин біхромату набуває бурого забарвлення. Неоднакові умови кипіння можуть призвести до великої розбіжності вмісту вуглецю в паралельних визначеннях. Окислення хромової суміші повинне протікати при її надлишку. Показником того, що хромовій суміші було недостатньо, є її зелене забарвлення.

Титрометричне визначення вмісту вуглецю

Після охолодження розчину змивають в нього краплі хромової суміші із стінок колби, обмивають воронку (або холодильник) мінімальною кількістю води, додають 3-5 крапель 0,2% розчину фенілантранілової кислоти і титрують сіллю Мора до переходу забарвлення з фіолетового в зелене.

Паралельно з дослідом проводять контроль без рослинного матеріалу. Ретельно дотримують всі вище вказані операції.

Різниця в кількості солі Морю, яка пішла на титрування контрольної і дослідної колб, відповідає кількості біхромату, який пішов на окислення вуглецю. 1 мл 0,2 н солі Морю відповідає 1 мл 0,4 н розчину біхромату калію. Останній відповідає 0,6 мг вуглецю.

Перед проведенням дослідів визначають титр солі Морю і враховують поправку до титру.

Вміст вуглецю в мг на 1 дм² листовій поверхні розраховують за формулою:

$$X = \frac{(A - B) \times K \times 0,6 \times 100}{C}, \text{ де}$$

X - вміст вуглецю;

A - кількість (мл) солі Морю, яка пішла на титрування контрольної проби;

B - кількість (мл) солі Морю, яка пішла на титрування залишку хромової суміші після спалювання органічної речовини;

K - поправка до титру солі Морю;

C - площа листя в см^2 .

Заповнюють табл.2. За різницею вмісту вуглецю в 1 дм^2 листовій поверхні до і після експозиції визначають зміну його вмісту за час досліджень. У рослини (А), яка знаходилась впродовж 2 годин на світлі, спостерігається збільшення вмісту вуглецю за рахунок переважання процесу фотосинтезу над диханням. У рослини (В), яка знаходилась в темряві, спостерігається зменшення кількості вуглецю за рахунок витрат його на дихання і відсутність процесу фотосинтезу.

Таблиця 2

Об'єкт	Час визначення	Взято $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, мл		Пішло солі Мору, мл		Площа висічок, см^2	Кількість вуглецю мг/дм^2	Інтенсивність фотосинтезу, $\text{мг дм}^2/\text{годину}$
		Контроль (а)	Дослід (в)	Контроль (а)	Дослід (в)			
	Початок дослід							
	Через годину (світло)							
	Через годину (темрява)							

Інтенсивність фотосинтезу розраховують за збільшенням вмісту вуглецю в мг С/дм^2 за годину. Для цього для до змін вмісту вуглецю в рослині А додають кількість вуглецю, витрачено на дихання у рослини В:

$$I\Phi = (X_A + X_B) / 2 \text{ години.}$$

Контрольні завдання.

I. Виконати тестові завдання:

- 1) Хлорофіл – багатофункціональна хімічна сполука, яка відноситься одночасно до декількох класів органічних речовин:
 - а) металорганічних;
 - б) порфіринів;
 - с) складних ефірів.
- 2) Хлорофіл може реагувати з кислотами і основами. Які з перелічених речовин утворюються в результаті реакції хлорофілу з соляною кислотою?
 - а) хлорид магнію;
 - б) фітол;
 - с) хлорофілінова кислота;
 - д) метанол;
 - е) феофітин.
- 3) Під час гідролізу якого пігменту утворюється віта нім А?
 - а) хлорофілу „а”;
 - б) хлорофілу „в”;
 - с) каротину;
 - д) фікоеритрину.
- 4) Яку частину спектру поглинає хлорофіл?
 - а) зелену;
 - б) червону;
 - с) жовту;
 - д) синю.
- 5) Які ознаки характерні для нециклічного фотосинтетичного фосфорилування?

- a) електрони збудженої молекули хлорофілу, що надійшла до системи транспорту електронів, не повертаються до тієї ж молекули хлорофілу;
 - b) цей електрон повертається до тієї ж молекули хлорофілу;
 - c) виділяється кисень;
 - d) не виділяється кисень;
 - e) утворюється НАДФН \times H⁺;
 - f) не утворюється НАДФН \times H⁺;
- 6) Фотосистеми I та II відрізняються:
- a) структурою;
 - b) пігментним складом;
 - c) розташуванням;
 - d) принципом роботи.
- 7) Чи потрібна присутність вуглекислого газу в процесі утворення АТФ та НАДФН \times H⁺ в ході фотосинтезу?
- a) так;
 - b) ні.
- 8) Процес відновлення вуглекислого газу до вуглеводів відбувається в ході темнових реакцій. Які ознаки характерні для цих реакцій?
- a) для їх протікання потрібна темрява;
 - b) для їх протікання світло не обов'язкове;
 - c) вони залежать від температури;
 - d) вони не залежать від температури;
 - e) темнові реакції протікають швидше світлових;
 - f) темнові реакції протікають повільніше ніж світлові.
- 9) Хлорофіли „a” і „b” присутні:
- a) лише у вищих рослин;
 - b) лише у водоростей;
 - c) і у вищих, і у нищих рослин.
- 10) Які зміни відбуваються в рослинах в атмосфері без вуглекислого газу?
- a) збільшується вміст ФГК;
 - b) вміст ФГК не змінюється;
 - c) зменшується вміст ФГК;
 - d) збільшується вміст рибулозодифосфату;
 - e) вміст рибулозодифосфату не змінюється;
 - f) зменшується вміст рибулозодифосфату.
- 11) Які продукти світлової стадії фотосинтезу використовуються у темновій?
- a) АТФ;
 - b) НАДФН \times H⁺;
 - c) ФАДН₂;
 - d) кисень.
- 12) Які ознаки, характерні для сукулентів з C₄-фотосинтезом, сприяють кращому пристосуванню їх до перенесення посушливих умов?
- a) фіксація вуглекислого газу вночі;
 - b) засвоєння вуглекислого газу вдень;
 - c) здатність до фотосинтезу при закритих продихах;
 - d) фотосинтез проходить тільки при відкритих продихах.
- 13) Фотосинтез у голонасінних відрізняється від квіткових тим, що:
- a) є менш ефективним;
 - b) не залежить від спектрального складу світла;
 - c) здійснюється упродовж всього року.
- 14) Які метали необхідні для нормального функціонування фотосинтетичного апарату?
- a) залізо;
 - b) мідь;
 - c) магній;
 - d) кобальт.
- 15) Які пігменти утворюють реакційний центр фотосистем?
- a) хлорофіл „a”;

- b) хлорофіл „в”;
 - c) каротин;
 - d) ксантофіл.
- 16) Фотоліз води відбувається:
- a) на світлі;
 - b) за умови роботи фотосистеми II;
 - c) у темряві;
 - d) безперервно.
- 17) Процес фотодихання активується:
- a) накопиченням продуктів світлової стадії;
 - b) певним спектральним складом світла;
 - c) підвищенням концентрації CO₂ у навколишньому середовищі;
 - d) зниженням концентрації CO₂ у навколишньому середовищі.
- 18) Які пігменти не беруть участі у фотосинтезі?
- a) хлорофіли;
 - b) каротиноїди;
 - c) антоціани;
 - d) фікобіліни.
- 19) Які з перелічених реакцій не відносяться до фотосинтезу?
- a) карбоксилювання рибулозо-1, 5-дифосфату;
 - b) відновлення ФГК до ФГА;
 - c) декарбоксилювання ПВК;
 - d) гідроліз крохмалю амілазою.
- 20) Найбільша ефективність фотосинтезу спостерігається на:
- a) синьому світлі;
 - b) зеленому світлі;
 - c) червоному світлі;
 - d) жовтому світлі.
- 21) В яких рослинах майже повністю відсутнє фотодихання?
- a) в рослин, у яких фотосинтез відбувається за схемою Кальвіна;
 - b) в рослин, у яких відбувається кооперативний фотосинтез.
- 22) Які ферменти беруть участь у циклі Кальвіна?
- a) амілаза;
 - b) пероксидаза;
 - c) RBP-карбоксилаза;
 - d) оксидаза.
- 23) Яке біологічне значення мають системи внутрішніх мембран (ламель) хлоропласта, які утворюють грани та міжгранні тилакоїди?
- a) служать опорною системою хлоропласта;
 - b) створюють просторову організацію пігментних систем і ферментних ланцюгів фотосинтезу, щоб забезпечити спряження послідовних реакцій фотосинтезу;
 - c) забезпечують спряження і відновлення діоксиду вуглецю;
 - d) Забезпечують просторове розділення активних окислювачів, які виникають у фотохімічних процесах, і нестійких відновлених проміжних продуктів засвоєння вуглецю.

II. Розрахувати фізіологічні показники:

- 1) За 40 хв. пагін з площею листової поверхні 120 см² поглинув 16 мг CO₂. Обчисліть інтенсивність фотосинтезу.
- 2) Скільки органічної речовини утвориться в рослині за 30 хв., якщо відомо, що інтенсивність фотосинтезу становить 20 мг CO₂/дм² × год, а площа листової поверхні дорівнює 5 м².
- 3) Скільки органічної речовини синтезує рослина з площею листової поверхні 7,5 м² за 5 хв., якщо відомо, що інтенсивність фотосинтезу становить 25 мг CO₂/дм² × год?

ПИТАННЯ ДО СЕМІНАРУ «Фізіологія фотосинтезу»

1. Напишіть сумарне рівняння фотосинтезу. Дайте загальну характеристику фотосинтезу.
2. Чому життя на Землі неможливе без зелених рослин? Як здійснюється круговорот вуглецю на нашій планеті?
3. Які властивості листа як оптичної системи? Які особливості будови листа впливають на поглинання і віддзеркалення світла? Які зовнішні чинники можуть вплинути на оптичні властивості листа?
4. У клітинах яких тканин йде фотосинтез? Яку роль грають у фотосинтезі провідні тканини?
5. Яку частину видимого спектру лист поглинає, пропускає і відбиває? Що таке ФАР?
6. Що таке пігмент? Які пігменти беруть участь у фотосинтезі вищих рослин?
7. Що є хлорофілом по хімічній природі? Чим відрізняється хлорофіл *a* від хлорофілу *b*?
8. Які хімічні і фізичні властивості мають хлорофіли? Яку функцію виконує кожна частина молекули?
9. Яке світло хлорофіли поглинають максимально? Що таке флуоресценція, фосфоресценція?
10. Як синтезується хлорофіл? Від яких умов залежить його синтез?
11. На які групи діляться каротиноїди? Що вони є по хімічній природі? Якими властивостями вони володіють? Як і в яких умовах синтезуються каротиноїди?
12. Які промені світла каротиноїди поглинають максимально? Яку роль грають у фотосинтезі каротиноїди?
13. Що відбувається з молекулою хлорофілу, що поглинула квант світла? На що може бути витрачена енергія поглиненого кванта?
14. Як поглинена енергія передається від одного пігменту до іншого? Чим відрізняється роль у фотосинтезі хлорофілу *a* від ролі хлорофілу *b*?
15. Що таке світлозбираючий комплекс? У чому полягає суть світлової фази фотосинтезу?
16. Що таке фотосистема? З чого складаються фотосистема I і фотосистема II? Де знаходяться фотосистема I і фотосистема II?
17. З чого складається електротранспортний ланцюг фотосинтезу?
18. Як відбувається циклічний транспорт електронів? Як відбувається нециклічний транспорт електронів?
19. Що таке фотосинтетичне фосфорилування?
20. Як, де і з якою метою відбувається фотоліз води?
21. Які речовини є продуктами світлової фази фотосинтезу? У якій частині хлоропласту відбувається світлова фаза? Чому фотосинтез не може йти в розчині?
22. У чому суть темної фази фотосинтезу? Які процеси відбуваються під час темної фази фотосинтезу?
23. Яка речовина є акцептором CO₂? Яка речовина є первинним продуктом в циклі Кальвіна? Чому цей цикл називають C₃-циклом? У яких рослин йде C₃-цикл?
24. Як відбувається відновлення CO₂ у C₄-рослин? Яка речовина є акцептором CO₂ в C₄-цикле? Які функції виконує C₄-цикл?
25. У яких тканинах листа і в яких хлоропластах відбувається C₄-цикл? У яких клітинах йде C₃-цикл у C₄-рослин? В яких хлоропластах він відбувається?
26. Як відбувається відновлення CO₂ у сукулентів? Яка речовина є у них акцептором CO₂? Яка речовина є первинним продуктом в САМ-фотосинтезі?
27. Що таке гліколатний цикл фотосинтезу? Який фермент є головним в цьому циклі?
28. У якій органелі відбувається гліколатний цикл? Які реакції складають гліколатний цикл фотосинтезу?
29. Яку роль грає гліколатний цикл в житті рослини? У яких рослин він є?
30. Що таке фотоасимляти? Як і де синтезується сахароза? Як відбувається синтез крохмалю? Які зовнішні умови впливають на хімічний склад рослини?
31. У яких одиницях вимірюється інтенсивність фотосинтезу? Що таке фотосинтетичний коефіцієнт? Від чого залежить його величина?
32. Що таке квантова витрата і квантовий вихід фотосинтезу? Яке число називають асиміляційним? Що таке чиста продуктивність фотосинтезу?
33. Як залежить інтенсивність фотосинтезу від інтенсивності світла? Що таке світлове насичення? Що таке компенсаційна точка?
34. Яка крива називається світловою кривою фотосинтезу? Чим відрізняються світлові криві C₃- і

- C₄-растений? Чим відрізняються світлові криві світлолюбних і тіньовитривалих рослин?
35. Як впливає інтенсивність світла на хімічний склад асимілятів? Як впливає спектральний склад світла на хімічний склад асимілятів?
 36. Як залежить інтенсивність фотосинтезу від концентрації CO₂? При якому вмісті вуглекислого газу в атмосфері настає компенсація фотосинтезу і дихання?
 37. Як впливає на фотосинтез концентрація кисню? Що таке ефект Варбурга? Чим він пояснюється?
 38. Як залежить інтенсивність фотосинтезу від температури? Як залежить інтенсивність фотосинтезу від оводненості тканин?
 39. Які елементи мінерального живлення грають у фотосинтезі субстратну роль і які — регуляторну?
 40. Як залежить інтенсивність фотосинтезу від генетичних особливостей рослин? Як і чому змінюється інтенсивність фотосинтезу з віком?
 41. По яких шляхах йде ближній транспорт асимілянтів?
 42. Як відбувається завантаження флоєми? Яку будову має ситовидна трубка? Яку функцію виконують супроводжуючі клітки? Що таке передавальні клітини?
 43. Які речовини входять до складу флоємного соку? З якою швидкістю йде дальній транспорт? Які зовнішні чинники впливають на швидкість транспорту речовин по флоємі? Як рослина може регулювати швидкість і напрям відтоку речовин?
 44. Співвідношення яких процесів визначає врожай? Чим відрізняється врожай біологічний від врожаю господарського? Як можна збільшити господарський врожай?
 45. Що таке чиста продуктивність фотосинтезу? Що таке індекс листової поверхні? Чим відрізняється високопродуктивний сорт від низькопродуктивного?

