Лабораторна робота № 2 Тема: Фотосинтез та дихання

ФІЗІОЛОГІЯ ФОТОСИНТЕЗУ

Мета заняття: Дослідити основні фізичні та хімічні

властивості окремих фотосинтезуючих пігментів рослинної клітини, ефективність роботи фото систем та асиміляційні характеристики тканин зеленої рослини, оволодіти основними засобами визначення якісного та кількісного складу пігментів та швидкості фотосинтетичних процесів.

***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) вазелін; 6) ніж; 7) фарфорові ступки (2 шт.); 8) колби (2 шт.); 9)

воронки (2 шт.); 10) скляна паличка; 11) паперові фільтри.

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

6 *CO*2  12 *H O* *с**вет**ова**яэнер**гия*( *хло**роф**и**лл*) *C* H12O6 + 6 O2 +6 H2O

6

2

Фотосинтез відбувається в хлоропластах, які оточені двома білково-ліпідними мембранами. Хлоропласт включає 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 СО2 і синтезу вуглеводів відбуваються в міжтілакоїдному просторі.

CH2 CH H

C

CH3

Рисунок 3.1. Структура хлорофілу *а*

2 3

C ~~H~~3 1 I

N

II 4

N

C2H5

В мембранах тілакоїдів містяться наступні пігменти: хлорофіл *а*

CH Mg CH

N N

*(С55H72O5N4Mg) —* зелений з

CH3 8 IV

III 5

CH3

синюватим відтінком; хлорофіл *b*

H 7 6

V

H

(*С H*

*O N Mg*) — зелений з жовтим

CH2 H 10 9

*55*

*70*

*6*

*4*

CH2 C O O

відтінком; каротин (*С40H56*) — жовто- помаранчевий; - ксантофіл (С Н 0 )

~~O~~ C O

40 5б 2

O CH3

C H

— золотисто-жовтий. Всі ці пігменти не розчинні у воді, але розчиняються

20 39

в органічних розчинниках (спирті, ацетоні і ін.).

За хімічною природою хлорофіл (рис.3.1) є складним ефіром дікарбонової кислоти хлорофіліну і двох спиртів — метанолу СН3ОН і фітолу С20Н39ОН. Хлорофілін містить порфірінове ядро, що складається з чотирьох пірольних кілець, сполучених один з одним метиновими містками *=* СН—. В центрі порфірінового 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 *а*, лише тим, що у другого пірольного кільця замість метильної групи є альдегідна.

Порфірінове ядро має гідрофільний характер і пов'язане з білками мембран. В той же час довгий гідрофобний «хвіст», утворений залишком фітолу, обернутий у бік ліпідних шарів тілакоїдів і обумовлює добру розчинність хлорофілу в неполярних розчинниках (бензин, петролейний ефір). Проте для повного виділення 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 *а* і *b* в хлоропластах містяться

каротиноїди — група жовтих пігментів, що є за хімічною природою тетратерпеноїдами (8 залишків ізопрену С5Н8).

CH3 CH3 H H

H H H H H H H

H H H H H

CH3 CH3

CH CH CH

CH2 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C 2

CH2

C

CH3

CH3 CH3 CH3 CH3

C CH3

CH2

CH2

Рисунок 3.2 Структура - каротину

Каротини (в основному - каротин) — ненасичені вуглеводні, що містять два симетрично розташованих іононових кільця, сполучених довгим вуглецевим ланцюгом (рис.3.2). Серед ксантофілів, що є кисневмісними похідними каротину, переважає лютеїн, який має в кожному іононовому кільці спиртову групу.

# 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.

* 1. Отримання витяжки пігментів

Хід роботи

Налити в дві пробірки по 2 мл спиртової витяжки пігментів

зеленого листа і додати в них по 2 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.** [**https://youtu.be/CZmZ9IDQaog?si=MYj7VU8GwCr-dKMM**](https://youtu.be/CZmZ9IDQaog?si=MYj7VU8GwCr-dKMM)**.**

**На основі проведеного експерименту**

**зробити висновок щодо вкладу магнію у оптичні властивості хлорофілу**

# 2 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 *а* і *b*, проте його доцільно використовувати для отримання жовтих пігментів каротину і ксантофілу у великих кількостях.

Для розділення і отримання хлорофілів *а, 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) NаОН або КОН кристалічний; 4) бензин; 5) ступка з пестиком; 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) хроматографічний папір (1,5 х 13 см); 13) дистильована вода; 14) абсолютно суха цукрова пудра або крохмаль; 15) крейда (1 х 10 см).

# Метод Крауса

Хід роботи

В пробірку з 2 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 краплі води, вносять декілька кристалів лугу і сильно струшують. При взаємодії лугу 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 окремих пігментів.**

Недоліком методу Крауса є те, що за допомогою нього складно провести кількісний аналіз пігментного складу рослини (не розділяються хлорофіли).

**Для розділення і отримання хлорофілів *а* 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.

1. ***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 кришкоюі висипають туди 3—5 г прожареного Nа2SO4, залишають на 15-20 хв для повного зневоднення екстракту. Це дуже важливо для подальшого розділення пігментів на адсорбційній колонці.

1. ***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 сірчанокислий натрій і стежити

за рівномірним наповненням цукрової пудри у всьому об'ємі трубки.

1. ***Розділення пігментів.***

Бензинову витяжку (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 *а,* нижче розташовується зона темно- жовтого пігменту ксантофілу, а в самому низу колонки — яскраво-жовтий каротин, який першим змивається з колонки (рис. 3.3). Пігменти по черзі можна змити з колонки бензином і зібрати у випарювальні чашки або колби для подальшого дослідження.

* 1. *— каротин;*

ЗАПОРОЖ СКИЙ

ГОСУДАР СТВЕННЫ Й

УНИВЕРС ИТЕТ

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

Рисунок. 3.3 Розділення пігментів на адсорбційній колонці (за М. С. Цветом):

Розділення пігментів зеленого листа можна проводити на шматку крейди у формі стовпчика, заздалегідь добре висушеного в сушильній шафі. Одним кінцем крейду занурюють на 0,5-1,0 см в бензиновий екстракт пігментів (теж осушений Nа2SO4). Чітке розділення пігментів відбувається на стовпчику крейди протягом 5-10 хв.

**Завдання: зробити малюнок почергового розділення пігментів на колонці та підписати зони з різними пігментами.**

**Вказати переваги та недоліки цього методу розділення пігментів у порівнянні з попередніми.**

# Флуоресценція хлорофілу

***Флуоресценція*** є свіченням 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 витрачатися на: 1) фотохімічну роботу, 2) збудження сусідніх молекул хлорофілу, 3) втрату у вигляді тепла, 4) флуоресцентне випромінювання. Незалежно від довжини хвилі спектр флуоресценції хлорофілу *а* 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.3.4.).



Рисунок. 3.4. Спиртна витяжка хлорофілу у відбитому *(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.** **https://youtu.be/iUtxJHngsXc?si=GVxUlQcaSTn2lbRO**

1.6 Визначення інтенсивності фотосинтезу і дихання за зміною вмісту вуглецю

# Визначення дихального коефіцієнта

***Дихальним коефіцієнтом (ДК)*** називається відношення об'єму виділеного при диханні СО2 до об'єму поглиненого 02. Величина цього відношення характеризує хімізм дихання і може змінюватися залежно від того, які органічні сполуки використовуються на дихання.

*Якщо дихальним субстратом служать вуглеводи*, реакція йде за рівнянням:

С6Н12О6 + 6О2 = 6СО2 + 6Н2О,

тобто ДК=

6 *CO*2 = 1

6 *O*2

*Якщо дихальним субстратом служать органічні кислоти*, що містять більше кисню на 1 атом вуглецю, ніж вуглеводи, то дихальний коефіцієнт буде більше 1.

Так при диханні за рахунок щавлевої кислоти за рівнянням: 2Н2С2О4 + О2 = 4СО2 + 2Н2О,

ДК=

4 *CO*2 = 4

*O*2

*Якщо на дихання використовуються сполуки (жири, білки*), що збагачені воднем, то дихальний коефіцієнт буде менше 1, оскільки на окислення водню буде потрібно додаткова кількість кисню. Наприклад, при окисленні стеаринової кислоти:

С18Н36О2 + 26О2= 18СО2 + 18Н2О,

тобто ДК=

18 *CO*2 = 0,7

26 *O*2

При нестачі кисню в атмосфері або неможливості його легкого доступу в клітини і тканини (занурене у воду насіння,

тканини в глибині масивних органів) посилюється анаеробне дихання. При цьому окислення субстрату і виділення СО2 відбуваються без поглинання кисню повітря, в цьому випадку ДК буде більше.

Прилад для визначення ДК складається з пробірки з щільно пригнаною пробкою, в яку вставлена вимірювальна трубка, занурена в бюкс з розчином еозину.

Матеріали і обладнання: 1) прилад для визначення ДК; 2) бюкси; 3) проросле насіння квасолі, соняшнику або пшениці; 4) пінцет; 5) фільтрувальний папір; 6) ножиці; 7) 0,1 н розчин

Ba(ОН)2; 8) годинник; 9) вата; 10) нитки; 11) штатив; 12) розчин еозину (або будь-який інший забарвлений розчин).

Хід роботи

В пробірку, приблизно до половини, насипають проросле насіння і щільно закривають пробкою. Кінець капілярної трубки опустити в бюкс з розчином еозину, а колбу закріпити в штативі. Відразу після цих операцій відзначають положення меніска розчину еозину в трубці (А). За 10 хвилин відзначають число поділок на трубці, на яке піднявся еозин. Вимірювання ще раз повторити через той же інтервал часу. Після цього обережно відкрити пробку, вийнявши трубку з розчину еозину і видаливши його з неї.

Помістити під трубку в пробірку шматочок вати на нитці (вату заздалегідь змочити лугом), закрити щільно пробірку, укріпити її в штативі і кінець трубки знов опустити в розчин еозину. Знову провести виміри руху розчину в трубці (В) за ті ж проміжки часу.

Дослід поставити в триразовій повторності. Після закінчення досліду демонтувати систему і зважити насіння.

Перший відлік (А) відповідатиме різниці об'ємів поглиненого кисню і виділеного СО2 за даний проміжок часу. Другий відлік (В), у варіанті з лугом виражає собою об'єм тільки поглиненого кисню, оскільки виділений СО2 поглинається лугом.

Об'єм СО2 знаходять за різницею: СО2 = В – А.

Звідси ДК:

ДК =

*B*  *A*

*B*

(4.2)

Якщо 10 малих поділок на капілярній трубці дорівнює 0,1 мл газу, то за даними досліду можна обчислювати і інтенсивність дихання пророслого насіння в мл О2 або СО2 на 1г насіння за 1 годину. В цьому випадку для розрахунку використовують формулу:

Ід = *A*  *B*  60 ,СО2 на 1 г за годину. (4.3)

*M*  *n*

Ід = *B*  60 , О2 на 1 г за годину, (4.4)

*M*  *n*

Де *Ід* - інтенсивність дихання;

*М* - вага насіння в досліді, г;

*n* - інтервал часу вимірювання, хвилин

При цьому дихальний коефіцієнт розраховують за формулою:

*ДК*  *Ід* *СО*2 

*Ід* *О*2 

(4.5),

де *ДК* - дихальний коефіцієнт;

*Ід* *СО*2  - інтенсивність дихання за СО2;

*Ід* *О*2  - інтенсивність дихання за О2

**Завдання:**

***Розв‘язати наступні задачі:***

1. **Інтенсивність дихання насіння становить 0,15 мг СО2 на 1 г сухої речовини за 1 годину. Скільки вуглекислого газу виділить 1,2 кг насіння за 5 діб?**