

СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ  
ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ  
ПО ДИСЦИПЛИНЕ  
"ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ"

В двух частях  
Часть 1



ISBN 978-985-477-653-8



9 789854 776538

Министерство образования Республики Беларусь  
Учреждение образования  
«Мозырский государственный педагогический университет  
имени И. П. Шамякина»

Технологического-биологического факультета

Кафедра биологии и экологии

**СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ  
ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ  
ПО ДИСЦИПЛИНЕ «ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»**

В двух частях

Часть 1

Мозырь  
МГПУ им. И. П. Шамякина  
2018

УДК 581.1  
ББК 28.57  
С74

Составители:

**В. В. Валетов,** доктор биологических наук, профессор  
**М. Ф. Мищенко,** старший преподаватель  
**И. А. Курлович,** лаборант

Рецензенты:

доктор сельскохозяйственных наук, доцент, заведующий сектором  
биорегуляции выращивания лесопосадочного материала  
ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»

*В. В. Копытков;*

кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой ботаники  
и физиологии растений Гомельского государственного университета  
имени Франциска Скорины

*Н. М. Дайнеко*

**Справочные материалы для выполнения лабораторных работ**  
С74 по дисциплине «Физиология растений»: В 2 ч. Ч. 1. / сост.:  
В. В. Валетов, М. Ф. Мищенко, И. А. Курлович. – Мозырь : МГПУ  
им. И. П. Шамякина, 2018. – 88 с.

ISBN 978-985-477-653-8.

Справочные материалы для выполнения лабораторных работ по  
дисциплине «Физиология растений» содержат краткие теоретические  
сведения и лабораторные работы по разделам «Физиология растительной  
клетки», «Фотосинтез», «Дыхание», позволяющие получить представления  
о физиологических процессах, происходящих в растительном организме  
и методах их исследования.

Издание предназначено для студентов специальности 1-31 01-01-02  
«Биология (научно-педагогическая деятельность)» и 1-02 04 01 «Биология  
и химия».

**УДК 581.1**  
**ББК 28.57**

**ISBN 978-985-477- 653-8 (Ч. 1)**  
**ISBN 978-985-477- 652-1**

© Валетов В. В., Мищенко М. Ф.,  
Курлович И. А., составление, 2018  
© УО МГПУ им. И. П. Шамякина, 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

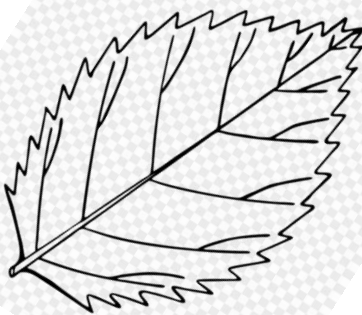
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ТЕМА 1. ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ</b> .....	5
1.1 Теоретическая часть .....	5
1.2 Экспериментальная часть .....	10
1.2.1 Проницаемость живой и мертвой клетки для веществ клеточного сока.....	10
1.2.2 Явление плазмолиза и деплазмолиза.....	12
1.2.3 Определение вязкости цитоплазмы по времени плазмолиз.....	14
1.2.4 Влияние ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы .....	16
1.2.5 Определение сосущей силы клеток упрощенным методом.....	18
<b>ТЕМА 2. ФОТОСИНТЕЗ</b> .....	21
2.1. Теоретическая часть .....	21
2.2. Экспериментальная часть .....	32
2.2.1. Физические и химические свойства пигментов зеленого листа .....	32
2.2.2. Разделение пигментов методом бумажной хроматографии.....	38
2.2.3. Фотохимическая активность хлорофилла .....	41
2.2.4 Влияние внешних условий на процесс фотосинтеза.....	44
<b>ТЕМА 3. ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ</b> .....	48
3.1. Теоретическая часть .....	48
3.2. Практическая часть .....	73
3.2.1. Определение интенсивности дыхания по количеству выделенного диоксида углерода (по Бойсен-Иенсену) .....	73
3.2.2. Определение дыхательного коэффициента злаков и бобовых растений .....	76
3.2.3. Потеря сухого вещества при прорастании семян.....	79
3.2.4. Обнаружение полифенолоксидазы и пероксидазы.....	80
3.2.5. Обнаружение пероксидазы в соке картофеля .....	84
3.2.6. Определение активности каталазы в растительном материале.....	85
Список рекомендуемой литературы.....	87

## ВВЕДЕНИЕ

Физиология растений является фундаментальной наукой, изучающей закономерности процессов жизнедеятельности растительных организмов в непосредственной связи и взаимодействии с условиями окружающей среды. С помощью эксперимента физиология растений объясняет сущность физиологических и биохимических процессов, происходящих в растительном организме. Поэтому в дополнение к теоретическому лекционному курсу большое внимание и время отводится лабораторным работам. Предлагаемые справочные материалы составлены на базе общего курса дисциплины «Физиология растений» в двух частях. Первая часть включает разделы «Физиология растительной клетки», «Фотосинтез», «Дыхание».

Издание содержит краткий теоретический материал по представленным темам курса; для каждой лабораторной работы дано краткое теоретическое пояснение, приведен перечень материалов и оборудования. Справочные материалы помогут студентам приобрести не только навыки постановки физиологических опытов, но и научат их правильно обрабатывать и оформлять экспериментальные данные. Для этого в работах даются формы таблиц для внесения результатов опыта, либо результаты отображаются графически. В конце каждой лабораторной работы предложены контрольные вопросы для активизации самостоятельной работы студентов и проверки степени усвоения ими учебного материала. Имеющиеся рисунки и схемы облегчают восприятие структурной организации изучаемых объектов.

Предназначены для студентов специальностей 1-31 01-01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)» и 1-02 04 01 «Биология и химия».



## ТЕМА 1. ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

### 1.1. Теоретическая часть

Клетка – это структурная и функциональная единица живых организмов. Она представляет собой элементарную систему, которая ограничена активной мембраной, способной к обмену с окружающей средой.

В 1665 г. голландский ученый Р. Гук, используя микроскоп, описал строение пробки. Он впервые использовал термин “клетка” для описания ячеистой структуры ткани (англ. Cell – ячейка, клетка).

В 1838–1839 гг. английский ботаник М. Шлейден и зоолог Т. Шванн на основе многочисленных наблюдений сформулировали клеточную теорию строения организмов.

Согласно клеточной теории, клетка является элементарной живой системой способной к самообновлению, саморегуляции, самовоспроизведению.

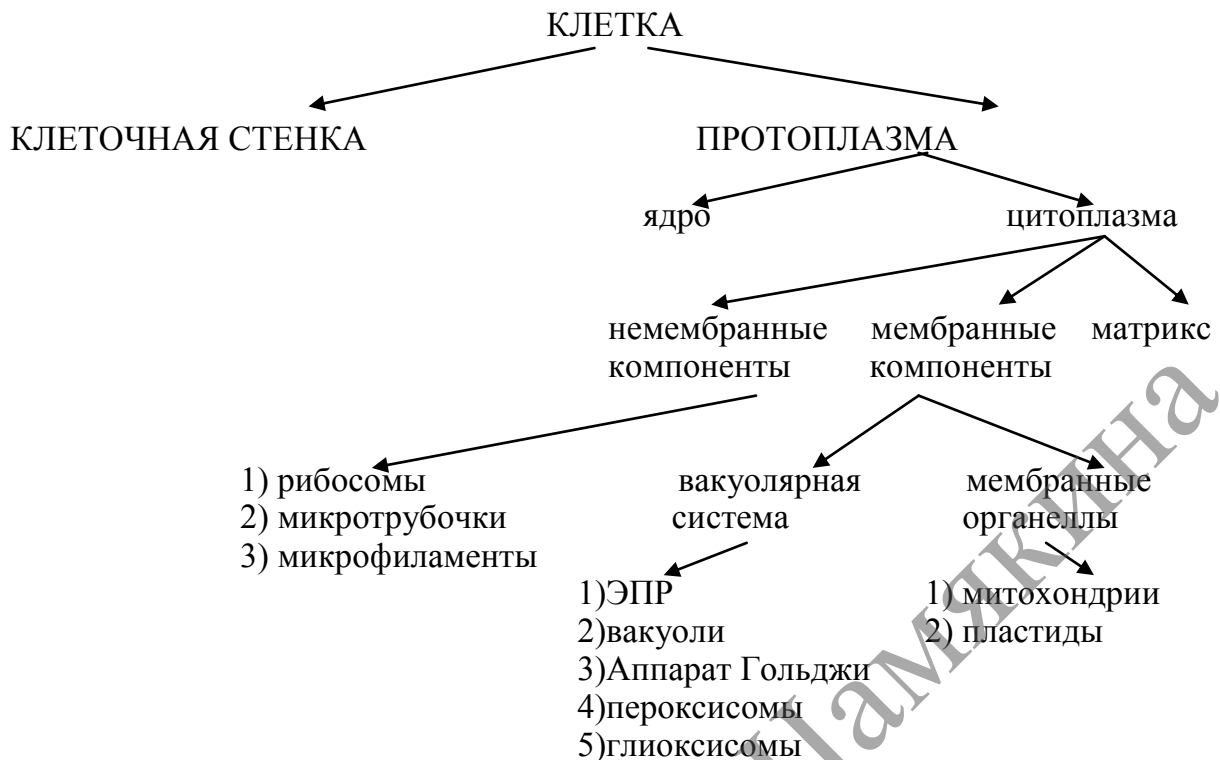
Клетка способна осуществить многие функции, а также имеет ряд свойств:

- взаимодействие с внешней средой (поглощение и выделение веществ, рецепция сигналов различной природы – температурных, световых, химических, электрических);
- взаимодействие с другими клетками (в тканях многоклеточных организмов);
- подвижность клеток и цитоплазмы;
- раздражимость;
- изменчивость;
- использование и трансформация энергии;
- временная и пространственная организация работы систем внутри клетки за счет их компартментализации (разделение клетки на отдельные участки (компарменты) (рисунок 1.1).

В растительной клетке различают клеточную стенку и протопласт. *Протопласт* – это система мембран, состоящих из белков и липидов, цитоплазмы, ядра, пластид, митохондрий.

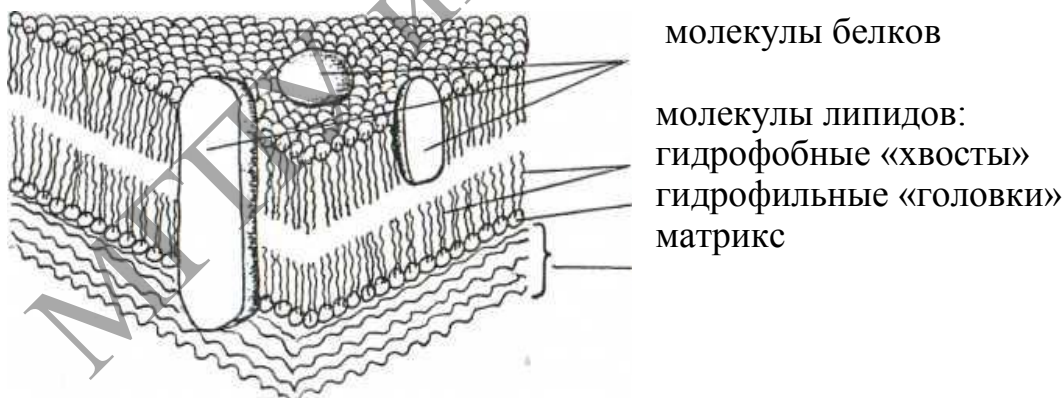
*Цитоплазма* включает в себя аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум (ЭПР), микротрубочки, рибосомы. Гиалоплазма – матрикс цитоплазмы.

Система *клеточных мембран* обеспечивает пространственную упорядоченность работы клетки – компартментализацию. В мембранах обнаружены многочисленные мультиферментные комплексы (например, цепи переноса  $e^-$  в митохондриях и хлоропластах), транспортные системы, рецепторные молекулы.



**Рисунок 1.1 – Строение и структура растительной клетки**

Все мембраны живой клетки обладают избирательной проницаемостью. Большинство мембран имеет сходный химический состав – это липопротеидные образования, содержащие около 60 % белков и 40 % липидов, из которых большинство являются фосфолипидами. От фосфолипидов зависит проницаемость мембран; они поддерживают ее структуру. В настоящее время имеются разнообразные модели структуры мембран (рисунок 1.2).



**Рисунок 1.2. – Строение клеточной мембраны**

Мембраны обладают динамичностью. Многие компоненты могут изменять свое расположение в них. Молекулы белков и липидов могут совершать перескок с одной стороны мембраны на другую. Мембраны способны к самосборке.

Мембраны образуются, развиваются и разрушаются на протяжении всей жизни клетки. Поверхностная мембрана плазмалемма изолирует клетку от окружающей среды.

В процессе роста клетки из нескольких мелких вакуолей образуется одна центральная вакуоль, отграниченная от цитоплазмы одинарной мембраной – тонопластом. Тонопласт первым воспринимает информацию о внешней среде, участвует в узнавании клетками друг друга, агрегации, адгезии, на нем протекают биоэлектрические реакции.

Основные функции мембран:

- регуляция поглощения и выделения веществ;
- организация ферментных и пигментных комплексов, участвующих в фотосинтезе, дыхании, синтезе веществ;
- передача биоэлектрических сигналов по клетке и тканям живого организма.

Пространственная и временная организация деятельности клетки обеспечивается цитоскелетом. В цитоскелете можно выделить 3 типа элементов: микрофиламенты, микротрубочки и промежуточные филаменты. *Микрофиламенты* принимают участие в процессах, сопровождающихся движением клеточной поверхности, например в фагоцитозе. Они обеспечивают передвижение в плазмолемме некоторых поверхностных рецепторов. Основой цитоскелета являются *микротрубочки*. Белки цитоскелета, взаимодействуя друг с другом, образуют сложные динамические структуры, которые отвечают за согласованное поведение частей клетки. *Промежуточные филаменты* – нити диаметром 7–10 нм. В их состав входят белки кератин, десмин, виментин. По-видимому, промежуточные филаменты образуют сеть, которая связана с ядерной оболочкой. Есть данные, что промежуточные филаменты "заякоривают" ядро в цитоплазме. Цитоскелет участвует в движении клеток и цитоплазмы внутри них, в транспорте веществ и частиц, в митозе, обеспечивает форму и прочность клеток.

Растительная клетка окружена жесткой оболочкой – *клеточной стенкой*, которая защищает содержимое клетки, определяет ее форму, размер, является одним из путей транспорта веществ по растению (апопласт), играет важнейшую роль в росте и дифференцировке и их регуляции. Клеточная стенка состоит из срединной пластинки, первичной и вторичной оболочек. Основу клеточной стенки составляют целлюлоза и пектиновые вещества, липиды и небольшое количество белка. Остов клеточной оболочки составляют переплетенные микро- и макрофибриллы целлюлозы. Макрофибриллы, микрофибриллы соединены в пучки водородными связями. Эти пучки погружены в аморфную желеобразную массу – матрикс, который состоит из гемицеллюлозы, пектиновых веществ и белка.



Клеточная стенка пронизана порами, через которые проходят плазмодесмы, соединяющие цитоплазмы соседних клеток.

*Эндоплазматический ретикулум (ЭПР)* – это сложная система каналов, окруженных мембранами, пронизывающая всю толщу цитоплазмы. Каналы имеют расширения – цистерны, которые могут обособляться в пузырьки и сливаться в вакуоли. Каналы и цистерны эндоплазматического ретикулума заполнены жидкостью, содержащей растворимые белки и другие соединения. На мембране эндоплазматического ретикулума могут находиться рибонуклеопротеидные частицы – рибосомы. Благодаря этому поверхность мембран становится шероховатой. Такие мембраны носят название гранулярных в отличие от гладких – агранулярных.

*Рибосомы* – это компактные частицы, лишенные мембран, состоящие из белка и особого типа рибосомальной РНК. Рибосомы находятся в цитоплазме, ядре, митохондриях, пластидах. В дифференцированной клетке большинство рибосом прикрепляется к поверхности мембран ЭПР и образуют полисомы.

*Аппарат Гольджи* представляет собой стопки цистерн, окруженных мембранами. Кроме цистерн, имеется ряд сферических пузырьков. Цистерны называются диктиосомами. Аппарат Гольджи имеет два полюса. На одном полюсе образуются новые цистерны, на втором полюсе происходит образование пузырьков. Процесс новообразования идет непрерывно.

*Лизосомы* – органеллы, окруженные мембраной, возникшей из мембран ЭПР. Внутренняя полость лизосом заполнена жидкостью, которая содержит гидролитические ферменты.

*Пероксисомы* – окруженные мембраной пузырьки, более мелкие, чем лизосомы. В пероксисомах содержится ряд окислительных ферментов.

*Митохондрии* окружены двойной мембраной. Между мембранами – перимитохондриальное пространство, которое заполнено жидкостью. Внутреннее пространство митохондрий заполняет матрикс – студнеобразная полужидкая масса. Внутренняя мембрана дает выросты – кристы, которые перегородивают внутреннее пространство митохондрий на отдельные отсеки.

В *ядре* сосредоточена большая часть наследственного материала. В молодой растительной клетке ядро чаще всего расположено ближе к центру. Химический состав ядра представлен главным образом белками и нуклеиновыми кислотами (ДНК – 14%, РНК – 12 %).

Ядерная оболочка состоит из двух мембран, разделенных между собой перинуклеарным пространством. Внешняя мембрана на поверхности имеет сложную складчатую структуру, местами соединенную с ЭПР. На внешней мембране расположено большое количество рибосом. Внутренняя мембрана может давать выпячивания. Ядерная оболочка имеет поры. Пores ядра – динамичные образования, они могут открываться и закрываться.

Вещество *ядрышка* состоит из сильно переплетенных нитей – нуклеонемы и содержит около 80 % белка, 10–15 % РНК и некоторое количество ДНК. В ядрышке имеются рибосомы.

Различают 3 вида *пластид*: лейкопласты – бесцветные, хромопласты – оранжевые, хлоропласты – зеленые. Хлоропласты содержат зеленый пигмент хлорофилл и ферменты, принимающие участие в процессе фотосинтеза. Хлоропласты окружены двойной оболочкой. Внутреннее пространство хлоропластов пронизано мембранами – ламеллами. Мембраны, соединенные друг с другом, образуют уплощенные мешочки – тилакоиды. В хлоропластах – тилакоиды двух типов: короткие, собранные в граны и расположенные друг над другом; длинные, расположенные параллельно друг другу. Короткие тилакоиды состоят из ламелл гран, длинные – из ламелл стромы. Все ламеллы погружены в среду зернистого строения – строму.

Строение лейкопластов и хромопластов аналогично структуре хлоропластов, но содержит меньшее количество ламелл.

Основные физиологические функции структурных компонентов растительной клетки даны в таблице 1.1.

Растительная клетка представляет собой осмотическую систему. Пентоцеллюлозная оболочка хорошо проницаема как для воды, так и для растворенных веществ.

Взрослая растительная клетка имеет большую вакуоль, содержащую водный раствор органических и минеральных веществ. Концентрация этих веществ в клеточном соке и степень их диссоциации определяют потенциальное осмотическое давление клетки и максимальную способность насыщать воду. Вода поступает в клетку извне в результате того, что химический потенциал (активность) воды в клетке ниже, чем в окружающем растворе.

Водный потенциал обуславливает сосущую силу клетки в каждый конкретный момент, которая меняется в зависимости от степени насыщенности клетки водой (ее тургора). Наибольшей сосущей силой клетка обладает при полном отсутствии тургора. В этом случае она насыщает воду с максимальной силой, обусловленной ее потенциальным осмотическим давлением.

Осмотическое движение воды в клетку является пассивным процессом, не требующим затраты метаболической энергии. Минеральные соли, проникающие в клетку против градиента концентрации, поступают через клеточные мембраны активно, с помощью специфических белков-переносчиков и с затратами энергии АТФ.

**Таблица 1.1. – Основные физиологические функции структурных компонентов клетки**

Структурные компоненты клетки	Основные физиологические функции
Клеточная оболочка	Обеспечение прочности, защита, опорная функция
Вакуоль	Осморегуляция, запас веществ, переваривание
Ядро	Хранение и передача генетической информации
Ядрышко	Синтез и перераспределения РНК
Митохондрии	Дыхание
Хлоропласты	Фотосинтез
Аппарат Гольджи	Накопление углеводов, секреция, образование клеточной оболочки
ЭПР	Транспорт веществ, образование метаболических центров
Лизосомы	Внутриклеточное пищеварение
Сферосомы	Накопление и хранение жира
Пероксисомы	Фотодыхание
Микротрубочки	Ориентация микрофибрилл целлюлозы
Рибосомы	Синтез белка
Плазмалемма	Контроль за транспортом веществ, защита, рецепция
Основная плазма	Гликолиз

## 1.2. Экспериментальная часть

### 1.2.1. Проницаемость живой и мертвой цитоплазмы для веществ клеточного сока

**Цель работы:** изучить влияние внешних факторов на проницаемость цитоплазмы.

**Объект:** корнеплод красной свеклы.

**Материалы и оборудование:** 30 %-ная уксусная кислота; хлороформ в капельнице (с притертой пипеткой); тарелка; фарфоровая чашка; скальпель; пинцет; штатив с пробирками (4 шт.); стакан химический; держатель для пробирок; спиртовка; спички.

#### Краткие сведения

Растительная клетка состоит из клеточной стенки и протопласта – цитоплазмы с расположенными в ней ядром и другими органоидами. В цитоплазме находятся вакуоли, заполненные клеточным соком. Клеточный сок – это водный раствор минеральных и органических веществ.

Цитоплазма живой клетки состоит из трех слоев: плазмалемма – наружный слой, прилегающий к целлюлозной оболочке клетки;

мезоплазма – средний слой и тонопласт – внутренний слой плазмы, окружающей вакуоли. Плазмалемма и тонопласт имеют мембранное строение и обладают свойством полупроницаемости. Проницаемость цитоплазмы не постоянна, она зависит от внешних факторов и физиологического состояния самой клетки. При повреждении цитоплазма утрачивает свойство избирательной проницаемости, в результате чего вещества, содержащиеся в клеточном соке, свободно выходят из клетки. Внешние факторы, которые нарушают проницаемость цитоплазмы – это высокие и низкие температуры, химические соединения, яды и др.

**Ход работы:** вырезать из очищенного корнеплода красной свеклы четыре одинаковых брусочка длиной около 2 см и шириной 1 см (корнеплод должен быть свежим, т. е. иметь хороший тургор, так как с подвявшим материалом опыт не дает четких результатов).

Положить брусочки в фарфоровую чашку и многократно промыть водопроводной водой до тех пор, пока не прекратится выделение окрашенного сока из перерезанных клеток.

Поместить брусочки в четыре пробирки и налить в две пробирки воду (до 1/2 объема), в третью – воду и 5 капель хлороформа в четвертую – 30 %-ю уксусную кислоту.

Одну из пробирок с водой прокипятить в течение 1–2 мин, слить жидкость и залить брусочек холодной водой.

**Задания.** Наблюдать в течение 1–2 ч за изменением окраски жидкости в пробирках, время от времени взбалтывая их содержимое. Результаты оформить в форме таблицы 1.2.

**Таблица 1.2. – Проницаемость цитоплазмы для веществ клеточного сока**

Вариант опыта	Скорость окрашивания жидкости (интенсивность)
Вода комнатной температуры	
Кипячение	
Вода + хлороформ	
30%-ная уксусная кислота	

### **Контрольные вопросы**

1. Пропускает ли живая цитоплазма вещества клеточного сока?
2. Как влияют на проницаемость цитоплазмы кипячение и ядовитые вещества?
3. Как объяснить разную скорость окрашивания жидкости в разных вариантах опыта?

### 1.2.2. Явление плазмолиза и деплазмолиза

**Цель работы:** ознакомиться с явлением плазмолиза и деплазмолиза.

**Объекты:** луковица синего лука или листья традесканции.

**Материалы и оборудование:** 1 М раствор сахарозы в капельнице; лезвие бритвы; скальпель; пинцет; препаровальная игла; микроскоп; предметные и покровные стекла; стакан с кипяченой водопроводной водой; стеклянная палочка; кусочки фильтрованной бумаги; спиртовка; спички.

#### Краткие сведения

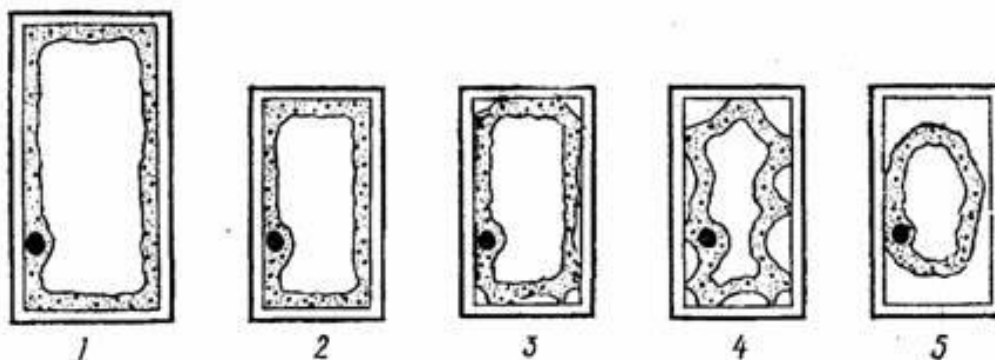
Растительная клетка состоит из прочной растительной стенки, через которую свободно диффундируют любые растворенные вещества в протопласт и вакуоли. Вакуоль заполнена растительным соком с растворенными в ней органическими и минеральными веществами. Клеточный сок, как любой раствор, обладает потенциальным осмотическим давлением, которое реализуется при погружении клетки в растворы с разной концентрацией солей, и способного поглощать или отдавать быстрее воду, чем растворенные в ней вещества.

Для каждой клетки можно подобрать следующие растворы: гипотонический, осмотическое давление которого меньше осмотического давления клеточного сока; изотонический, имеющий осмотическое давление, равное осмотическому давлению клеточного сока; гипертонический, осмотическое давление которого больше, чем давление клеточного сока.

В гипертоническом растворе с более высокой концентрацией солей, чем концентрация клеточного сока, вода из вакуоли перемещается в более концентрированный наружный раствор значительно быстрее, чем проникают соки в клетку. Отток воды из клеток происходит до тех пор, пока не сравняются концентрации клеточного сока и наружного раствора. При потере воды в гипертоническом растворе падает тургор клеточной стенки, уменьшается объем вакуоли, цитоплазма отстает от оболочки, а пустоты между цитоплазмой и клеточной стенкой заполняются плазмолитиком. Это явление получило название плазмолиза.

Плазмолиз – отставание цитоплазмы от стенок клетки в гипертоническом растворе вследствие потери воды вакуолью и уменьшения ее объема.

Плазмолиз наступает не сразу, а имеет несколько этапов: сначала клетка сокращается, а после полной потери тургора цитоплазма отстает от клеточной стенки по углам (уголковый плазмолиз), затем во многих местах (вогнутый плазмолиз) и, наконец, приобретает округлую форму (выпуклый плазмолиз) (рисунок 1.3).



1 – тургесцентная клетка; 2 – общее сокращение объема клетки;  
3 – угловый плазмолиз; 4 – вогнутый плазмолиз; 5 – выпуклый плазмолиз  
Рисунок 1.3. – Последовательные стадии плазмолиза

К плазмолизу способна только живая клетка, в убитой клетке плазмолиз не возможен по причине того, что цитоплазма теряет свойства полупроницаемости и становится полностью проницаемой как для воды, так и для растворенных в ней веществ.

Плазмолиз – обратимый процесс. Он возможен в клетках, имеющих плотную клеточную стенку. Клетки животных, не имеющие жесткой оболочки, при попадании в гипертонический раствор сжимаются, при этом отслоение клеточного содержимого от оболочки не происходит.

У плазмолизированной клетки, погруженной в чистую воду, плазмолиз исчезает, наступает деплазмолиз. Причем деплазмолиз наступает быстрее, чем плазмолиз и не имеет промежуточных форм.

Деплазмолиз – возвращение протопласта клеток растений из состояния плазмолиза в исходное состояние, характеризующееся нормальным тургором.

**Ход работы.** С выпуклой стороны поверхности чешуи лука, клетки которого окрашены в фиолетовый цвет благодаря присутствию в вакуолях антоцианов, с помощью препаровальной иглы подорвать эпидермис и пинцетом, захватив за край надреза эпидермиса, осторожно содрать его. Желательно, чтобы такой срез был однослойным.

Поместить срез в каплю воды на предметное стекло, накрыть покровным стеклом и рассмотреть в микроскоп клетки с окрашенным клеточным соком.

Затем заменить воду 1 М раствором сахарозы, для чего на предметное стекло рядом с покровным нанести большую каплю раствора и отсосать воду кусочком фильтрованной бумаги, прикладывая его с другой стороны покровного стекла. Повторить этот прием 2–3 раза до полной замены воды раствором. Следить в микроскоп за тем, что происходит в клетках, наблюдая за скоростью плазмолиза и его этапами.

Через 15–20 минут, когда плазмолиз ярко выражен, это обычно уже выпуклый плазмолиз, ввести под покровное стекло каплю чистой воды, также используя фильтровальную бумагу и вновь наблюдать за

изменениями, происходящими в клетках, за скоростью деплазмолиза.

После окончания деплазмолиза убить клетки, держа край предметного стекла пинцетом и осторожно нагревая препарат на пламени спиртовки, не допуская полного испарения воды.

Отсосать воду фильтровальной бумагой, нанести на срез каплю 1 М раствора сахарозы, закрыть покровным стеклом и рассмотреть препарат под микроскопом через несколько минут. Установить происходит ли плазмолиз в мертвых клетках кожицы синего лука.

### Задания

1. Записать результаты всех наблюдений в таблицы 1.3 и 1.4.
2. Сделать схематические рисунки клеток в воде и в растворе плазмолитика, обозначить формы плазмолиза и состояние клетки.
3. Сделать выводы о причинах возникновения плазмолиза, указать от каких факторов зависит скорость плазмолиза.

**Таблица 1.3. – Скорость проявления различных форм плазмолиза**

Форма плазмолиза	Время погружения ткани в раствор	Время наступления соответствующей формы плазмолиза	Длительность проявления соответствующей формы плазмолиза, мин

**Таблица 1.4. – Длительность деплазмолиза**

Время погружения ткани в воду	Время наступления деплазмолиза	Длительность деплазмолиза, мин

### Контрольные вопросы

1. Что такое плазмолиз и каковы его причины?
2. Какие типы плазмолиза вы знаете?
3. Как происходит деплазмолиз? Какова скорость деплазмолиза по сравнению с плазмолизом?
4. Способны ли плазмолизироваться мертвые клетки?

### 1.2.3. Определение вязкости цитоплазмы по времени плазмолиза

**Цель работы:** установить зависимость вязкости цитоплазмы от возраста клетки.

**Объекты:** листья элодеи или традесканции; луковица синего лука.

**Материалы и оборудование:** 0,8 М раствор сахарозы; лезвие бритвы; пинцет; препаровальная игла; микроскоп; предметные и покровные стекла.

### Краткие сведения

Вязкость (или внутреннее трение) является одним из важнейших свойств цитоплазмы и характеризуется силой, необходимой для смещения одного слоя жидкости относительно другого.

Промежуток времени от момента погружения клеток в гипертонический раствор до появления выпуклого плазмолиза называют временем плазмолиза. О вязкости цитоплазмы можно судить по времени плазмолиза: при большой вязкости цитоплазма с трудом отстает от клеточной стенки, сохраняя длительное время вогнутые поверхности (вогнутый плазмолиз), если же вязкость цитоплазмы мала, то вогнутый плазмолиз быстро переходит в выпуклый.

Вязкость цитоплазмы легко изменяется под действием внешних факторов: температуры, водообеспеченности самого растения и т. д.

Вязкость цитоплазмы зависит от внутренних факторов: видовой особенности растения, места обитания, возраста и фазы онтогенеза растения. Она может быть различна в разных органах. Цитоплазма растущих клеток и клеток, закончивших рост, имеет разную вязкость.

Для опыта используют молодые листочки элодеи, в которых можно различить четыре зоны: в основании расположена слабо окрашенная зона деления клеток, выше находится зона растяжения, еще выше – зона дифференцировки и верхушка листа, которая состоит из клеток, закончивших свой рост и имеющих интенсивно зеленую окраску.

**Ход работы.** Взять 2–3 молодых листочка из верхушечной части побега элодеи (листья должны иметь зеленый кончик и бледно-зеленое основание) или традесканции погрузить в каплю 0,8 М раствора сахарозы на предметном стекле и закрыть покровным стеклом. Для сравнения в другую каплю раствора сахарозы поместить срез эпидермиса синего лука. Отметить время погружения исследуемых объектов в раствор. Рассматривая препараты в микроскоп через каждые 5 мин., определить время плазмолиза, причем у листа элодеи следует наблюдать за клетками различных зон.

### **Задания**

Изучить зависимость вязкости цитоплазмы

- 1) от возраста клеток различных зон листа элодеи;
- 2) от возраста листа (в верхушечных листьях и листьях нижней части побега).

Записать результаты и сделать вывод о зависимости вязкости цитоплазмы от возраста клетки и возраста листа.

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое плазмолиз и как его вызвать?
2. Какие формы плазмолиза вам известны?
3. Что такое время плазмолиза?
4. Какова зависимость между вязкостью протоплазмы и временем (формой) плазмолиза?
5. Дайте понятие вязкости протоплазмы.
6. В чем заключается приспособительное значение вязкости протоплазмы?



### 1.2.4. Влияние ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы

**Цель работы:** установить влияние ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы по времени и форме плазмолиза.

**Объект:** луковица синего лука.

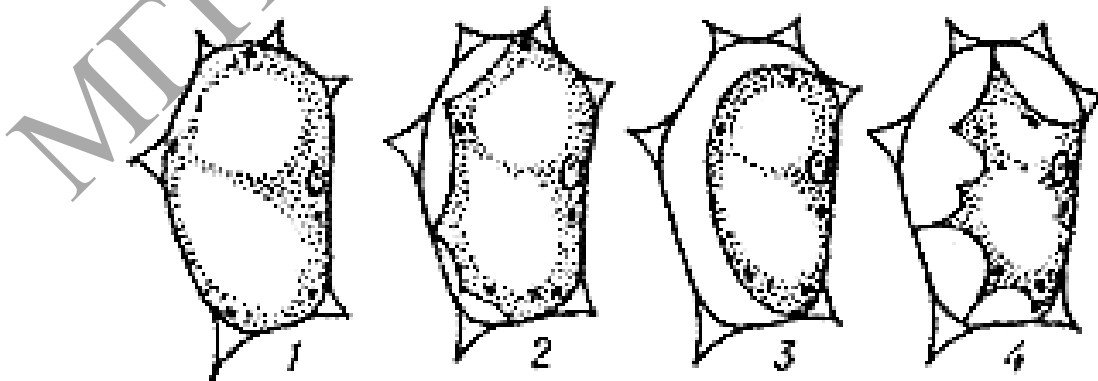
**Материалы и оборудование:** растворы 1 М раствор  $\text{KNO}_3$  и 0,7 М раствор  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  в капельницах (оба раствора должны были приготовлены из химически чистых солей на дистиллированной или, еще лучше, бидистиллированной воде); лезвие бритвы; препоровальная игла; микроскоп; предметные и покровные стекла; карандаш по стеклу; вазелин; кусочки фильтрованной бумаги.

#### Краткие сведения

Цитоплазма обладает так называемой структурной вязкостью, степень которой зависит от содержания воды в клетке, и спецификой строения белков микрофиламентов, определяющей количество точек скрепления между ними.

Ионы минеральных солей способны влиять на свойства коллоидов цитоплазмы. Ионы одно- и двухвалентных металлов оказывают различное влияние на цитоплазму. Ионы кальция, образуя дополнительные точки скрепления между отдельными молекулами белков, повышают вязкость цитоплазмы. Ионы калия, напротив, увеличивают дисперсность коллоидов цитоплазмы, оводняют, разжижают ее.

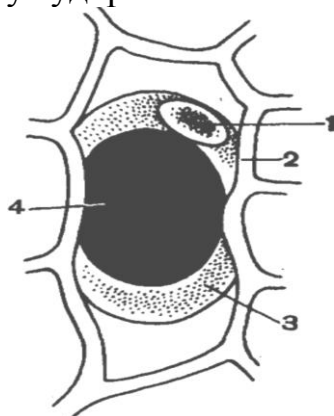
Об изменениях вязкости цитоплазмы под действием ионов калия и кальция можно судить по форме плазмолиза в клетках, находящихся в гипертонических растворах их солей. Ионы калия, проникая в цитоплазму, повышают ее гидрофильность, уменьшают вязкость и способствуют ее быстрому отрыву от клеточной стенки. Поэтому в растворах солей калия плазмолиз быстро принимает форму выпуклого плазмолиза.



1 – уголковый; 2 – вогнутый; 3 – выпуклый; 4 – судорожный

Рисунок 1.4. – Формы плазмолиза

При длительном нахождении клеток в гипертоническом растворе нитрата калия (15 минут и более) цитоплазма набухает в удлинённых клетках, и там, где протопласт не касается клеточных стенок, образуются так называемые «колпачки» цитоплазмы. Такой плазмолиз носит название колпачкового (рисунок 1.5). Ионы кальция, наоборот, повышают вязкость цитоплазмы, увеличивают силы сцепления ее с клеточной стенкой, и плазмолиз принимает форму судорожного плазмолиза (рисунок 1.4).



1 – ядро; 2 – плазмалемма; 3 – цитоплазма; 4 – вакуоль  
Рисунок 1.5. – Колпачковый плазмолиз

**Ход работы.** Нанести на предметные стекла по капле растворов  $KNO_3$  и  $Ca(NO_3)_2$  (сделать на стеклах соответствующие надписи).

Поместить в растворы по кусочку эпидермиса с окрашенным клеточным соком и закрыть покровными стеклами. Во избежание испарения смазать края покровных стекол вазелином (или время от времени вводить под покровные стекла новые капли растворов).

Записать время погружения срезов в растворы и сразу приступить к наблюдению под микроскопом, отмечая время наступления фаз плазмолиза (при этом не следует принимать во внимание периферическую зону, так как там свойства цитоплазмы могут быть изменены вследствие раневого раздражения).

#### Задания

1. Результаты записать в таблицу 1.5.
2. Зарисовать наиболее характерные клетки через 5–10 мин после погружения срезов в растворы.
3. Сделать вывод о влиянии ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы по времени и форме плазмолиза.

Таблица 1.5. – Влияние ионов калия и кальция на форму и время

Плазмо- литик	Время по- гру- жения в раствор	Время наступления плазмолиза				
		уголко- вого	вогну- того	выпук- лого	колпачко- вого	судорож- ного
$KNO_3$						
$Ca(NO_3)_2$						

### Контрольные вопросы

1. Каким образом ионы калия и кальция влияют на вязкость цитоплазмы?
2. В каких условиях наблюдается судорожный плазмолиз?
3. Чем обусловлено образование «колпачков» в результате инкубации клеток в растворе  $\text{KNO}_3$ ?

### 1.2.5. Определение сосущей силы клеток упрощенным методом (по Уршпрунгу)

**Цель работы:** ознакомиться с определением сосущей силы клеток методом Уршпрунга.

**Объекты:** большой клубень картофеля.

**Материалы и оборудование:** 1 М раствор  $\text{NaCl}$ ; дистиллированная вода; тарелка; нож; скальпель; пинцет; крышки чашек Петри (7 шт.); предметное стекло; фильтровальная бумага; карандаш по стеклу; полоски миллиметровой бумаги 1x10 см; термометр комнатный.

#### Краткие сведения

Силу, с которой клетка способна поглощать воду, называют сосущей силой ( $S$ ), которая зависит от степени насыщения клетки водой. Сила растительной клетки равна разности между осмотическим давлением ( $P$ ) клеточного сока и тургонным давлением ( $Tr$ ). В состоянии полного завядания (или начинающегося плазмолиза) тургонное давление отсутствует ( $Tr = 0$ ) и сосущая сила клетки равна ее осмотическому давлению ( $S = P$ ). При погружении клетки в воду тургонное давление достигает максимальной величины ( $Tr = P$ ), а сосущая сила падает до нуля ( $S = 0$ ). Клетки наземных растений, как правило не бывают насыщены водой, у таких клеток  $Tr$  меньше  $P$ , а  $S = P - Tr$ .

Определение сосущей силы клеток упрощенным методом Уршпрунга осуществляется путем подбора равновесного раствора, в котором не происходит ни потери, ни поглощения воды клетками. Однако данный метод основан на измерении не концентрации растворов, а размеров кусков, вырезанных из исследуемых органов растений и погруженных в растворы известной концентрации: при погружении куска ткани в раствор,  $S$  которого больше  $S$  клеток, раствор отнимает воду от клеток и их размеры уменьшаются. Если  $S$  клеток больше  $S$  раствора, то клетки всасывают воду и увеличиваются в объеме. При равенстве  $S$  клеток и  $S$  раствора размеры клеток не изменяются.

Упрощенный метод Уршпрунга пригоден только для крупных паренхиматозных органов со слабо развитыми механическими тканями (клубней, корнеплодов). Достоинство данного метода – простота и возможность непосредственно наблюдать за изменениями тургора в зависимости от степени насыщения клеток водой.

**Ход работы.** Приготовить по 20 мл растворов NaCl концентрации (моль/л) 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1, смешивая в чашках соответствующее количество 1 М раствора и воды.

В одну чашку налить чистую воду.

Вырезать из картофельного клубня большим ножом пластинку толщиной 3–4 мм, положить пластинку на тарелку; пользуясь предметным стеклом, вырезать из пластинки прямоугольник шириной 20–30 мм и длиной 40–70 мм (чем длиннее, тем лучше). Разрезать прямоугольник на 7 одинаковых полосок шириной 2–3 мм, измерить их длину с точностью до 0,5 мм и погрузить одну полоску в воду, а остальные – в приготовленные растворы, следя за тем, чтобы погружение было полным. Готовить и измерять полоски следует быстро, не допуская подвядания материала. Тарелка, на которой разрезают клубень, стекло и скальпель должны быть сухими. Вытекающий из клубня при разрезании сок удаляют фильтровальной бумагой.

Через 20–30 мин пинцетом извлечь полоски из растворов, промокнуть фильтровальной бумагой и повторно измерить их длину.

#### Задания

1. Записать результаты наблюдений в таблицу 1.6

**Таблица 1.6. – Определение сосущей силы клеток**

Концентрация NaCl, моль/л		1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0
Сосущая сила раствора, МПа								
Длина полоски, мм	исходная							
	после пребывания в растворе							
Разность, мм								
Тургор								

2. Во 2-ой строке таблицы 1.6 записать сосущую силу растворов, которая численно равна их осмотическому давлению ( $S = P$ ). Вычислить осмотическое давление по уравнению Вант-Гоффа:

$$P = RTCi,$$

где  $P$  – осмотическое давление (МПа);

$R$  – универсальная газовая постоянная ( $R = 0,00831$  кДж/град моль);

$T$  – абсолютная температура ( $273+t^{\circ}\text{C}$ );

$C$  – концентрация раствора, моль/л;

$i$  – изотонический коэффициент, показывающий отношение числа частиц (молекул и ионов) в растворе к исходному количеству молекул растворенного вещества.

Для неэлектролитов, например, для сахарозы  $i = 1$ . Для растворов электролитов  $i$  зависит от числа ионов, на которые распадается молекула, и степени диссоциации. Значения  $i$  для растворов NaCl приведены в таблице 1.7.

**Таблица 1.7. – Значения изотонического коэффициента в зависимости от температуры**

Концентрация NaCl, моль/л	1,0	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,01
Изотонический коэффициент	1,62	1,64	1,66	1,68	1,7	1,73	1,75	1,78	1,83	1,93

3. Данные для 5-й строки таблицы 1.6 (разность длины полоски) можно получить, вычитая из большей величины меньшую, причем увеличение длины обозначить знаком «+», а уменьшение – знаком «-».

4. В последней строке таблицы 1.6 отметить степень тургора ткани (сильный, средний, слабый) или его отсутствие; для определения этого показателя разложить полоски на тарелке так, чтобы они наполовину свисали с ее края.

5. Сделать выводы, объяснив причины изменения размеров полосок в растворах разной концентрации, и записать сосущую силу клеток перед погружением их в растворы.

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое сосущая сила и тургорное давление?
2. Чему равны сосущая сила и тургорное давление клетки при завядании, насыщении, в обычном состоянии?
3. Чему равна сосущая сила раствора?

## ТЕМА 2.ФОТОСИНТЕЗ

### 2.1. Теоретическая часть

#### История изучения фотосинтеза

Датой открытия процесса фотосинтеза можно считать 1771 г., когда английский химик Джозеф Пристли (1733–1804) установил, что растения «исправляют» воздух, который испорчен дыханием или горением. Общеизвестны его опыты с мышью и мятой, помещенными под стеклянный колпак. К такому же выводу в результате проведенных опытов пришел и голландский врач Ян Ингенгуз (1730–1799). Однако ни Дж. Пристли, ни Я. Ингенгуз не дали научного объяснения сущности процесса исправления воздуха. Это сделал швейцарский ученый Жан Сенебье (1742–1809). Он установил, что растения превращают «связанный воздух» в «чистый», то есть освобождают из углекислого газа кислород. Сенебье сделал заключение, что этот процесс является процессом питания.

Ещё дальше в этом направлении пошел соотечественник Ж. Сенебье Теодор Соссюр (1767–1845). Пользуясь более точными методами химического анализа газов, он показал, что при разложении растениями углекислого газа увеличивается их сухой вес и что при этом к углероду при образовании органического вещества присоединяется вода. Ф. Соссюр впервые определил содержание углекислоты в атмосферном воздухе. В ходе анализа было установлено, что количество углекислого газа в воздухе по объему не превышает 0,01 % (в действительности оно составляет 0,03 %).

30 лет спустя французский ученый Жан Батист Буссенго точными методами доказал, что растения способны улавливать из воздуха даже самые незначительные количества углекислого газа.

Таким образом, было установлено, что зеленые растения из воздуха поглощают  $\text{CO}_2$ , из которого при участии воды на свету образуется органическое вещество. Именно этот процесс в 1877 г. немецкий ученый Пфеффер назвал фотосинтезом.

Немецкий ботаник Юлиус Сакс (1832–1897) разработал методику количественного учета крахмалообразования в растении. Французские химики Пелетье и Каванту выделили из листьев в спиртовой вытяжке зеленое вещество и дали ему название хлорофилл. Английский физик Георг Стокс (1819–1903) обнаружил, что в листе растений содержатся два зеленых и два желтых пигмента. Два зеленых пигмента получили название хлорофилл *a* и хлорофилл *b*, а желтые были названы каротином и ксантофиллом.

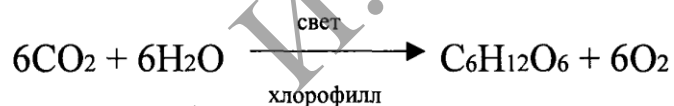
Большое значение для раскрытия сущности фотосинтеза имел закон сохранения энергии, сформулированный Р. Майером. В 1845 г. Р. Майер выдвинул предположение, что энергия, используемая растениями, это энергия Солнца, которую растения в процессе фотосинтеза превращают в химическую энергию.

Изучение хлорофилла и фотосинтеза было продолжено К. А. Тимирязевым, И. П. Бородиным, В. Н. Любименко и другими учеными.

К.А. Тимирязев, применяя точные методы спектрального анализа, показал, что только поглощенные хлорофиллом лучи участвуют в фотосинтезе и что наиболее интенсивное разложение углекислоты происходит в красных лучах, которые и сильнее поглощаются зеленым листом. Менее интенсивно происходит разложение углекислоты и ассимиляция в сине-фиолетовых лучах. К. А. Тимирязев рассматривал фотосинтез зеленых растений как космический процесс.

### **Значение процесса фотосинтеза**

Ассимиляция органического вещества в современных условиях осуществляется в результате фотосинтеза, бактериального синтеза (фоторедукции) и хемосинтеза. Особое место принадлежит фотосинтезу, в основе которого лежит поглощение солнечной энергии. Фотосинтез характерен для всех зеленых растений. Общее уравнение фотосинтеза:



В общем виде процесс фотосинтеза можно представить следующим образом: квант света поглощается хлорофиллом, молекула которого переходит в возбужденное состояние, при этом электрон переходит на более высокий энергетический уровень.

В клетках зеленых растений в процессе эволюции выработался механизм, при котором энергия электрона, возвращающегося на основной энергетический уровень, превращается в химическую энергию. Только с помощью зеленых растений энергия Солнца может накапливаться в виде энергии химических связей. Таким образом, органические вещества, которыми питаются животные и человек, первоначально создаются в зеленом листе. Исследования показали, что весь кислород атмосферы фотосинтетического происхождения. Следовательно, процессы дыхания и горения стали возможны только после того, как возник фотосинтез. Согласно данным французского исследователя Дювиньо (1972), ежегодно в процессе фотосинтеза растениями суши образуется  $3,1 \times 10^{10}$  т органического вещества, доля лесов –  $2,04 \times 10^{10}$  т, лугов, степей –  $0,3 \times 10^{10}$  т, пустынь –  $0,11 \times 10^{10}$  т, культурных полей –  $0,56 \times 10^{10}$  т.

Продукция органического вещества растений планктона – примерно  $5,8 \times 10^{10}$  т в год. Содержание углекислого газа ( $\text{CO}_2$ ) в атмосфере непрерывно пополняется за счет растворенных в воде карбонатов и бикарбонатов, а также  $\text{CO}_2$ , выделяющегося из почвы в результате различных микробиологических процессов.

Фотосинтез имеет важнейшее значение и в жизни самого растения. Согласно расчетам А.А. Ничипоровича, в период активного роста растений суточные приросты сухого вещества достигают 300 и даже 500 кг/га. При этом в течение суток растение усваивает 1–2 кг N, 0,1–0,2 кг P, 0,8–1,7 кг K и до 1000 кг  $\text{CO}_2$ .

### Пластиды

Процесс фотосинтеза протекает в зеленых пластидах – хлоропластах. Различают три вида пластид: лейкопласты – бесцветные, хромопласты – оранжевые, хлоропласты – зеленые. Грибы лишены пластид. У фотосинтезирующих бактерий и сине-зеленых водорослей пластид ещё нет, но пигмент сосредоточен в постенном слое цитоплазмы. У водорослей имеются специальные образования – хроматофоры, они разнообразны по форме (спиральные, ленточные, чашевидные и т. д.). У высших цветковых растений хлоропласты в форме диска или двояковыпуклой линзы диаметром 4–6 мкм, толщиной 2–5 мкм.

### Строение хлоропластов

Число хлоропластов обычно составляет от 20 до 100 на клетку. Хлоропласты окружены двойной мембраной. Внутреннее пространство хлоропластов пронизано мембранами (ламеллами). Мембраны, соединенные друг с другом, образуют пузырьки – тилакоиды (греч. «тилакоидес» – мешковидный). В хлоропластах тилакоиды двух типов. Короткие тилакоиды собраны в пачки (граны), напоминают стопку монет. Длинные тилакоиды расположены параллельно друг другу. Короткие тилакоиды состоят из ламелл гран, длинные – ламелл стромы. Все ламеллы погружены в строму (среда зернистого строения).

Относительно связи между ламеллами гран и ламеллами стромы имеются разные точки зрения. Существует мнение, что ламеллы гран как бы зажаты между ламеллами стромы. Т. Вейер предложил гранулярно-решетчатую модель, согласно которой внутренние пространства всех тилакоидов соединены между собой. У хлоропластов большинства водорослей гран нет, а ламеллы собраны в группы (пачки) по 2–8 штук.

### Онтогенез пластид

Хлоропласты в клетках листа растут и развиваются, т. е. имеют свой онтогенез. Начальной стадией роста хлоропластов являются инициальные частицы. Это глобулярные образования, окруженные двойной мембраной.

По мере роста клетки инициальные частицы увеличиваются в



размере и приобретают форму двояковыпуклой линзы. Внутренняя мембрана начинает разрастаться, образуя складки, а от складок отшнуровываются пузырьки (тилакоиды). Это стадия пропластиды.

Для развития структуры пропластид необходим свет. На свету образуются хлорофилл и два типа тилакоидов – длинные и короткие. Пластиды достигают окончательного размера. Непосредственно из пропластид могут образовываться и бесцветные пластиды – лейкопласты. В строме лейкопластов располагаются крахмальные зерна, белковые включения. Хромопласты – это результат деградации хлоропластов, образовавшихся за счет частичного разрушения ламеллярной структуры.

Как возникают пластиды? На этот счет единого мнения нет. Имеются наблюдения, что вся система развивающихся клеточных органелл в яйцеклетке разрушается. Вокруг ядра в большом количестве можно видеть округлые образования, окруженные двойной мембраной, инициальные частицы. Происхождение их не установлено. До настоящего времени не удавалось наблюдать и их деления. Это позволяет предположить, что инициальные частицы возникают вновь из оболочки ядра или из эндоплазматического ретикулума (ЭПР).

Существует иная точка зрения, основанная на наблюдениях о существовании пластидной (внехромосомной) наследственности. Предполагают, что хлоропласты представляют собой генетически автономные образования и их свойства наследуются по материнской линии. Это подтверждается тем, что хлоропласты содержат специфические молекулы ДНК и обладают белоксинтезирующей системой. Однако окончательного вывода о первоначальном происхождении пластид пока нет.

Возникает вопрос о возникновении хлоропластов в клетке в процессе эволюции. Поскольку хлоропласт представляет собой относительно независимое от ядра образование, способное к делению, росту, дифференциации, возникла гипотеза о том, что на заре эволюции хлоропласты представляли собой самостоятельные организмы.

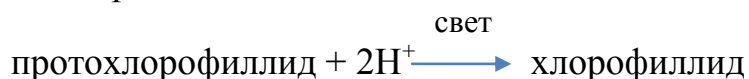
### **Пигменты листа и их роль**

Основную роль в процессе фотосинтеза играет зеленый пигмент – хлорофилл. Французские ученые Пеллетье и Каванту (1818) выделили из листьев зеленое вещество и назвали его хлорофиллом (от греч. «хлорос» – зеленый и «филлон» – лист). Известно около 10 хлорофиллов. В высших зеленых растениях содержатся хлорофиллы *a* и *b*. Хлорофилл *c* содержится в диатомовых водорослях, хлорофилл *d* – в красных водорослях. Существуют четыре бактериохлорофилла (*a*, *b*, *c* и *d*), содержащихся в клетках фотосинтезирующих бактерий.

### Биосинтез хлорофилла

Начальный этап биосинтеза молекулы хлорофилла включает ряд реакций, в результате которых из несложных органических веществ – аминокислоты гликокола и янтарной кислоты – возникает б – аминолевулиновая кислота, а при конденсации двух молекул этой кислоты образуется порфобилиноген.

Синтез хлорофилла происходит в две фазы: темновую – до протохлорофиллида и световую – образование из протохлорофиллида хлорофилла. Для превращения протохлорофиллида в хлорофиллид необходимо его связывание с белком голохромом и присоединение двух атомов водорода:



На последнем этапе к хлорофиллиду присоединяется спирт фитол:



Синтез хлорофилла – процесс многоэтапный: в нем участвуют различные ферменты. Содержание хлорофилла в листе колеблется незначительно, так как идет непрерывный процесс разрушения старых молекул и образование новых молекул хлорофилла. Эти два процесса уравнивают друг друга.

Исследования показывают, что образование хлорофилла идет интенсивнее на прерывистом свете.

Образование хлорофилла зависит от температуры. Оптимальная температура для накопления хлорофилла 26–30°C.

На скорость образования хлорофилла оказывает влияние содержание воды. Обезвоживание проростков приводит к полному прекращению образования

В. И. Паландин обратил внимание на необходимость углеводов для протекания процесса зеленения. Например, при опрыскивании сахарозой проростки снова начинают интенсивно зеленеть.

Важнейшее значение для образования хлорофилла имеют условия минерального питания. Прежде всего необходимо достаточное количество железа. При недостатке железа наблюдается хлороз – явление при котором листья теряют окраску.

Синтез хлорофилла также зависит от деятельности корневой системы.

### Световые реакции фотосинтеза

В настоящее время известно, что фотосинтез проходит в две стадии, но только одна из них – на свету. Доказательства двухстадийности

процесса впервые были получены в 1905 г. английским физиологом Ф. Ф. Блэкменом.

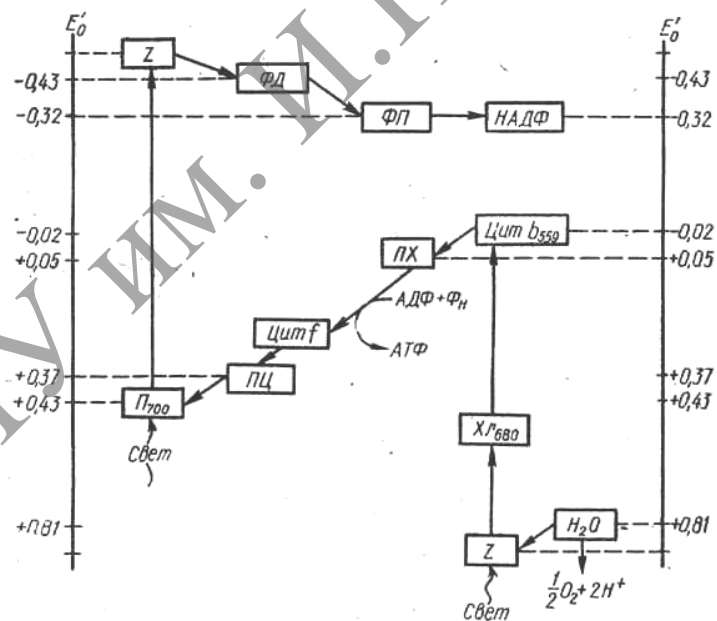
Фотохимические реакции фотосинтеза – это реакции, в которых энергия света преобразуется в энергию химических связей, и в первую очередь в энергию фосфорных связей АТФ.

Процесс преобразования энергии квантов света в АТФ получил название фотосинтетического фосфорилирования (Д. Арнон).

Различают два основных типа фотосинтетического фосфорилирования: нециклическое и циклическое.

Совокупность молекул пигментов совместно с определенными белками-переносчиками электронов составляет фотосистему. Существует два типа фотосистемы. В фотосистеме I реакционный центр образован 200 молекулами хлорофилла *a*, 50 молекулами каротиноидов и одной молекулой хлорофилла (хлорофилл-ловушка), поглощающей свет волной, длина которой  $\lambda$  700 нм ( $\pi_{700}$ ). Вторая фотосистема (фотосистема II) включает 200 молекул хлорофилла *a*, 200 молекул хлорофилла *b* и одну молекулу хлорофилла, поглощающей свет волной, длина которой  $\lambda$  680 нм ( $\pi_{680}$ ).

Общая схема нециклического фотофосфорилирования представлена на рисунке 2.1.

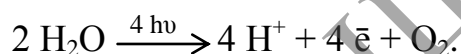


**ФД** – ферредоксин; **ФП** – флавопротеид; **ПХ** – пластохинон; **ПЦ** – пластоцианин; **Цит** – цитохромы; **Z** – неидентифицированный переносчик электрона; **П<sub>700</sub>** – хлорофилл реакционного центра с максимумом поглощения 700 нм. Цифры на ординатах – значения окислительно-восстановительного потенциала

Рисунок 2.1. – Схема нециклического транспорта электронов при фотосинтезе

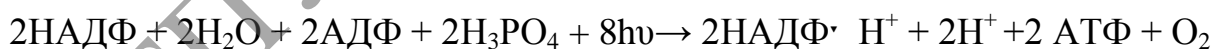
При нециклическом потоке электронов принимают участие две фотосистемы. Энергия квантов света стекается к молекуле пигмента  $\pi_{700}$  (фотосистема I). При поглощении кванта света молекула  $\pi_{700}$  переходит в возбужденное состояние. В этом состоянии молекула  $\pi_{700}$  легко отдает электрон. Отдавая электрон, молекула  $\pi_{700}$  окисляется и остается в виде положительно заряженной молекулы.

Электрон передвигается по направлению к никотинамидадеминдинуклеотидфосфат (НАДФ) через ряд переносчиков. Переносчиком  $\bar{e}$  (электрон) является железосодержащий белок ферредоксин. От ферредоксина электрон переносится на НАДФ. Этот перенос осуществляется с помощью белка-фермента (ферредоксин – НАДФ-редуктазы), коферментом которого является флавинадениндинуклеатид (ФАД). Отдав электрон,  $\pi_{700}$  остается в виде ионизированной молекулы. Затем наступает основное состояние, благодаря чему он является акцептором электронов. Источником электрона, заполняющего эту «дырку», является фотосистема II. Она ответственна за реакции, электрон от воды. Происходит фотолиз воды и выделяется кислород:



Полученный от  $\text{Хл}_{680}$  неизвестным акцептором Z электрон передается на пластохином (производное хинона). В переносе  $\bar{e}$  участвует 65 молекул пластохинона. От пластохинонов электрон воспринимается молекулой цитохрома f. Цитохром f восстанавливается:  $\text{Fe}^{3+} + \bar{e} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ . Следующий переносчик – пластоцианин. Отдавая электрон пластоцианину, цитохром окисляется:  $\text{Fe}^{2+} - \bar{e} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ . От пластоцианина электрон заполняет электронную «дырку» у  $\pi_{700}$ .

Перенос электрона по цепи переносчиков от фотосистемы II к фотосистеме I сопровождается аккумуляцией энергии в АТФ ( $\text{АДФ} + \text{Ф} \rightarrow \text{АТФ}$ ). Суммарное уравнение этого процесса:



Таким образом, отличительными особенностями нециклического фотосинтетического фосфорилирования являются:

- окисление двух молекул воды, происходящее в результате воздействия  $8h\nu$  света, которые улавливаются двумя фотосистемами;
- передача  $\bar{e}$  от молекул воды через электронно-транспортную цепь на НАДФ.

Продуктами нециклического фосфорилирования являются восстановленный НАДФ $\cdot$   $\text{H}_2$  и АТФ. Эти соединения световой фазы затем используются в темновой фазе фотосинтеза. Общая схема циклического фотофосфорилирования представлена на рисунке 2.2.

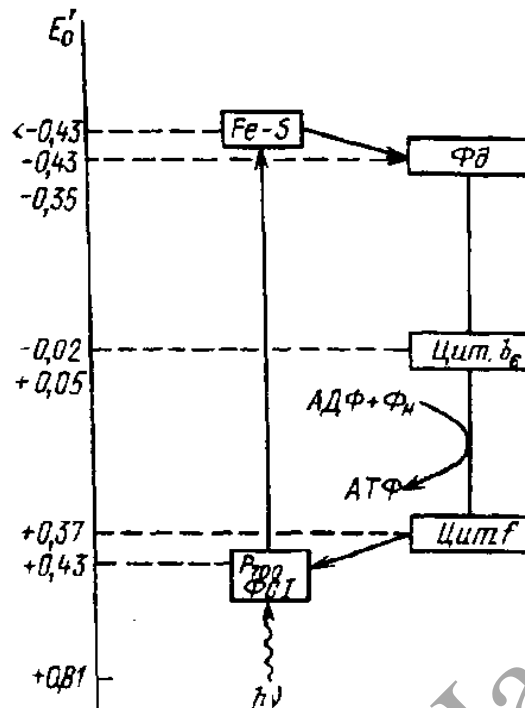
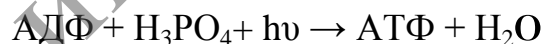


Рисунок 2.2. – Схема циклического транспорта электронов при фотосинтезе

В этом процессе принимает участие лишь фотосистема I. В результате поглощения кванта света молекула  $\pi_{700}$  отдает возбужденный  $\bar{e}$  сначала неидентифицированному переносчику (Z), а затем от ферредоксина возвращается к  $\pi_{700}$ . На участке электронно-транспортной цепи между цитохромом  $b_6$  и цитохромом f энергия  $\bar{e}$  аккумулируется в энергию АТФ. Таким образом, в этом случае  $\pi_{700}$  является и донором и акцептором электрона. Суммарное уравнение циклического фотофосфорилирования выглядит так:



Свет в нециклическом и циклическом фотосинтетическом фосфорилировании необходим только на первых этапах этих процессов. Перенос  $\bar{e}$  по цепи переносчиков может происходить в темноте. Вопрос, как осуществляется связь между переносом возбужденного светом  $\bar{e}$  по цепи переносчиков и образованием АТФ за счет выделяющейся при этом энергии, до настоящего времени не выяснен. Наибольшее признание получила хемиосмотическая гипотеза Митчелла. Переносчики  $\bar{e}$  расположены перпендикулярно мембране и локализованы в определенной последовательности. При этом последовательно чередуются переносчики  $\bar{e}$  (цитохромы) с переносчиками  $\bar{e}$  и протона (пластохинона). В результате происходит односторонний перенос протонов с наружной стороны мембраны тилакоидов на внутреннюю сторону. Образуется градиент ионов водорода, т. е. возникает разность потенциалов. Образование АТФ является результатом разрядки мембран.

### Темновые реакции фотосинтеза

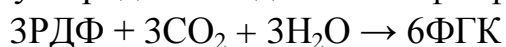
Сущность темновых реакций процесса фотосинтеза стала очевидной благодаря исследованиям американского физиолога Кальвина (цикл Кальвина).

#### «С<sub>3</sub>-фотосинтез» (цикл Кальвина)

Восстановление углерода происходит в строме хлоропласта в цикле реакций, которые известны как цикл Кальвина.

Цикл Кальвина можно разделить на три фазы:

I фаза – карбоксилирование. Эта реакция идет при участии фермента рибулезодифосфата – карбоксилазы (РДФ-карбоксилазы). Его образование в листьях активируется светом. При взаимодействии РДФ с CO<sub>2</sub> образуется шестиуглеродное соединение – фосфоглицериновая кислота:



II фаза – восстановление. В этой фазе происходит реакция фосфорилирования 3-ФГК при участии АТФ и НАДФ·Н<sup>+</sup> + Н<sup>+</sup>.



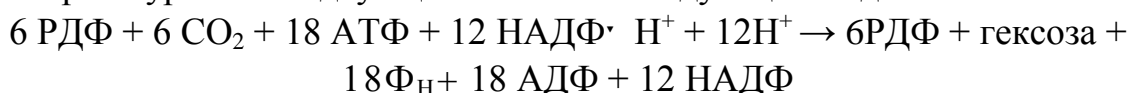
1,3 – дифосфоглицериновая кислота обладает высокой реакционной способностью, содержит макроэргическую связь. Карбоксильная группа этого соединения восстанавливается до альдегидной с помощью триозофосфатдегидрогеназы:



Образовавшийся фосфоглицериновый альдегид (ФГА) претерпевает ряд превращений. Из 6 молекул ФГА 5 идут на регенерацию акцептора–рибулезодифосфата, а 1 молекула выходит из цикла.

III фаза – регенерации. В процессе регенерации акцептора используется 5 молекул ФГА, в результате чего образуются 3 молекулы рибулезо-5-фосфата. Этот процесс идет через образование 4-, 5-, 6-, 7-углеродных соединений. В результате всех реакций III фазы образуются 3 молекулы рибулезофосфата. Для образования из них акцептора (РДФ) необходимо их фосфорилирование. Для этого используются 3 молекулы АТФ.

При прохождении двух циклов из 12 молекул ФГА 2 молекулы выходят из них, образуя 1 молекулу фруктозодифосфата (ФДФ). Общее суммарное уравнение двух циклов имеет следующий вид:



Итак, для восстановления 6 молекул CO<sub>2</sub> до уровня углеводов (глюкозы) требуется 18 молекул АТФ и 12 НАДФ·Н<sub>2</sub>. Для образования двух молекул НАДФ·Н<sub>2</sub> и двух молекул АТФ необходимо 8 квантов

света. Следовательно, для восстановления одной молекулы  $\text{CO}_2$  до уровня углеводов должно быть затрачено 8-9 квантов. Энергия квантов красного света равна 168 кДж/моль.

Таким образом, при использовании квантов красного цвета на восстановление одной молекулы  $\text{CO}_2$  до уровня углеводов затрачивается примерно 1340–1508 кДж.

#### **«C<sub>4</sub>-фотосинтез» (цикл Хетча-Слэка)**

У некоторых растений первый продукт фиксации – четырехуглеродное соединение – щавелеуксусная кислота (ЩУК) (рисунок 2.3).

Растения, которые осуществляют этот путь, называются C<sub>4</sub>-растениями, в отличие от C<sub>3</sub>-растений, где функционирует только цикл Кальвина. C<sub>4</sub>-растения – преимущественно растения тропиков и субтропиков (в том числе сахарный тростник).

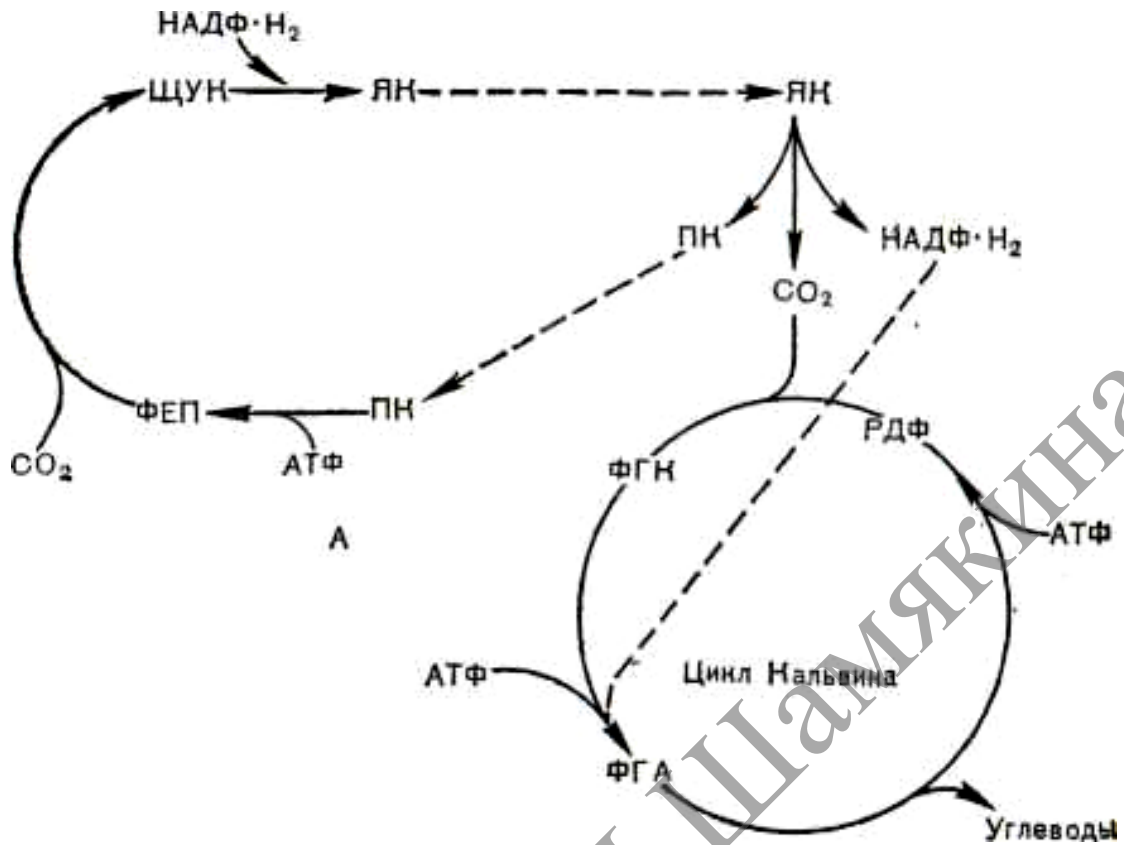
ЩУК образуется, когда  $\text{CO}_2$  фиксируется на фосфоенолпирувате. Реакция катализируется ферментом фосфоенолпируваткарбоксилазой. ЩУК преобразуется затем в яблочную кислоту.

Далее происходит реакция транскарбоксилирования, при которой  $\text{CO}_2$  снова отщепляется от органических кислот и вступает в цикл Кальвина – присоединяется к рибулезодифосфату.

Таким образом, сущность C<sub>4</sub>-пути заключается в том, что реакция карбоксилирования происходит дважды. Это позволяет растению создавать запасы углерода в клетках.

Исследования показали, что в растениях, в которых процесс фотосинтеза протекает по C<sub>4</sub>-пути, имеются два типа хлоропластов: 1) крупные пластиды, часто лишенные гран, в клетках обкладки, окружающих сосудистые пучки; 2) мелкие гранальные пластиды в клетках мезофилла листа.

Фиксация  $\text{CO}_2$  по C<sub>4</sub>-пути имеет ряд преимуществ: некоторые растения осуществляют первые этапы этого процесса (образование органических кислот) в ночной период суток. В последующий светлый период углекислота освобождается и реассимилируется в цикле Кальвина. Такая последовательность позволяет осуществлять фотосинтез днем при закрытых устьицах, что предохраняет растение от изменений потери воды, а значит с этим связана большая засухоустойчивость растений. У растений, осуществляющих фотосинтез по C<sub>4</sub>-пути, отсутствует процесс фотодыхания. Открытие этого пути позволило расшифровать особенности фотосинтеза у суккулентов.



А – в хлоропластах мезофилла листа; Б – в хлоропластах обкладки.

ЯК – яблочная кислота; ПН — пировиноградная кислота

Рисунок 2.3. – Фотосинтетический путь Хетча-Слэйка



## 2.2. Экспериментальная часть

### 2.2.1. Физические и химические свойства пигментов зеленого листа

**Цель работы:** ознакомиться с методами экстракции пигментов и изучить физико-химические свойства пигментов листа.

**Объекты:** зеленые листья любых растений.

**Материалы и оборудование:** ступка с пестиком, воронка, фильтр, штатив с пробирками, стеклянные палочки, шпатель, вазелин, баня, КОН или NaOH в кристаллах, этанол; бензин; 10 %-ная соляная кислота; ацетата меди  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$  в кристаллах, мел в порошке или углекислый кальций, кварцевый песок или толченое стекло.

#### Краткие сведения

Необходимыми компонентами фотосинтезирующих систем являются пигменты. Они служат первичными фоторецепторами в процессе фотосинтеза. Пигменты – соединения, избирательно поглощающие свет в видимой части солнечного спектра. Поглощение пигментами света обусловлено наличием в их молекуле хромофорных групп. Хромофорные группы – система сопряженных двойных связей, они содержат большое число легко возбуждаемых светом  $\bar{e}$  электронов. Все пигменты подразделяют на 3 группы: хлорофиллы, фикобилипротеины и каротиноиды.

Хлорофиллы – зеленые пигменты. По своей природе они магний-порфирины. Центральным атомом, связывающим четыре пиррольных кольца (I–IV), служит магний. В результате образуется порфириновое кольцо с сопряженными по кругу двойными связями. Также в структуре хлорофилла есть одно циклопентановое кольцо (V), включающее активную кетогруппу.

По химической природе хлорофилл – это сложный эфир дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов – метанола  $\text{CH}_3\text{OH}$  и фитола  $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{OH}$ .

В настоящее время известно около 10 пигментов, входящих в группу хлорофиллов и отличающихся друг от друга структурными особенностями. Наиболее распространены хлорофиллы *a*, *b* и бактериохлорофилл *a*. Хлорофилл *a*  $\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$  – зеленый с синеватым оттенком; хлорофилл *b*  $\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{O}_6\text{N}_4\text{Mg}$  – зеленый с желтоватым оттенком. Хлорофилл *b* отличается от хлорофилла *a* лишь тем, что у второго пиррольного кольца вместо метильной группы имеется альдегидная (рисунок 2.4).

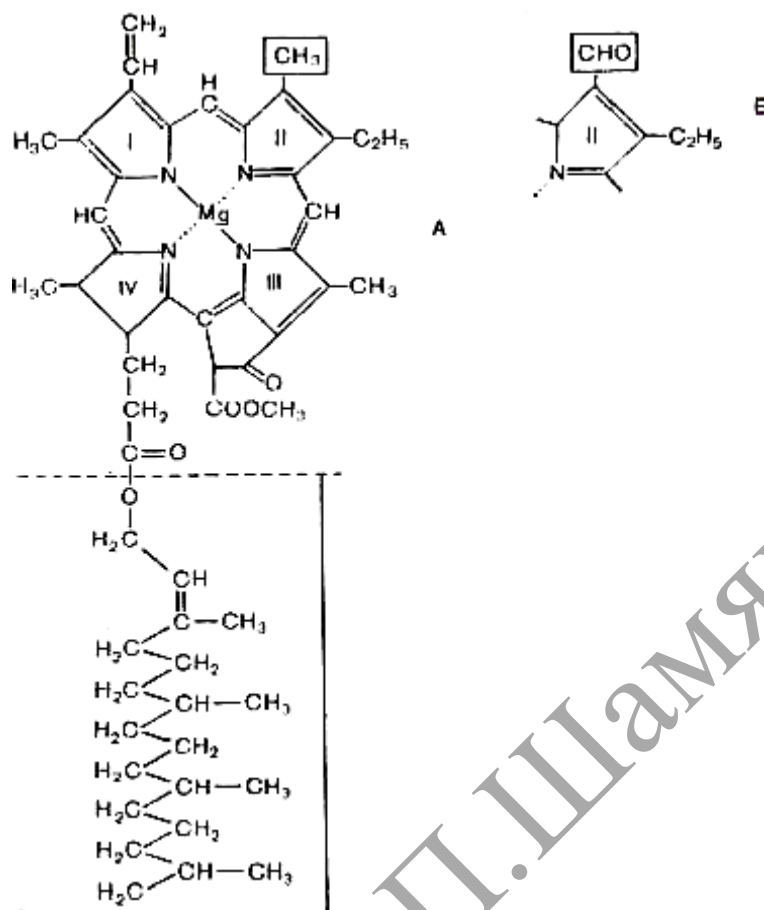


Рисунок 2.4. – Структура хлорофилла *a* (А) и *b* (Б)

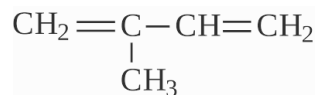
Порфириновое кольцо хлорофилла поглощает красные и синие-фиолетовые лучи, пропуская значительную часть зеленых. Этим объясняется зеленый цвет.

Именно молекулы хлорофилла *a* (у растений) и бактериохлорофилла *a* (у фотосинтезирующих бактерий) являются теми пигментами, которые непосредственно входят в реакционный центр фотосинтеза и принимают участие в преобразовании световой энергии. Остальные хлорофиллы служат «антеннами». Они поглощают энергию света и передают ее к хлорофиллу *a* или бактериохлорофиллу *a*.

Фикобилипротеины (билихромопротеины) – водорастворимые пигменты красного или голубого цвета. Они входят в состав пигментных систем цианобактерий, красных водорослей и криптофитов. Хромофоры фикобилипротеинов являются фикоцианобилин и фикоэритробилин, состоящие из 4-х пиррольных колец, которые образуют открытую, не содержащую металла цепь. По химическому строению они близки к желчным пигментам. Хромофорные группы фикобилинов прочно связаны с белком и для их отщепления требуются жесткие воздействия. Фикобилины поглощают световую энергию в зеленой и желтой областях спектра.

Каротиноиды – группа пигментов желтого, оранжевого и красного цветов (известно более трехсот). Физиологическая роль многих каротиноидов еще не выяснена.

Все каротиноиды представляют собой производные изопрена:



По химическому строению каротиноиды делят на две группы:

1) каротины (в основном β-каротин) – ненасыщенные углеводороды, содержащие два симметрично расположенных иононовых кольца, соединенных длинной углеродной цепью (рисунок 2.5);

2) ксантофиллы являются кислородсодержащими производными каротина, имеющими в каждом иононовом кольце спиртовую группу (лютеин) (рисунок 2.6).

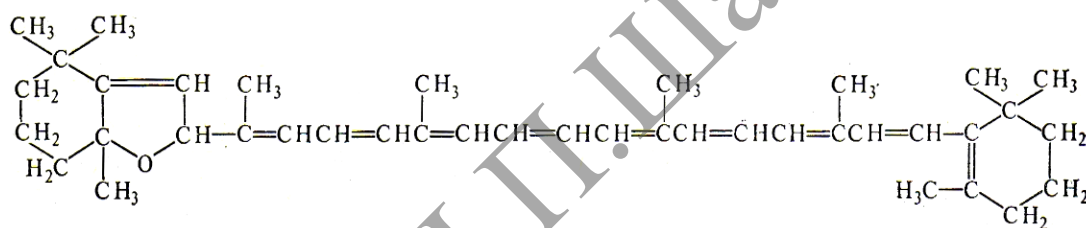


Рисунок 2.5. –β-каротин

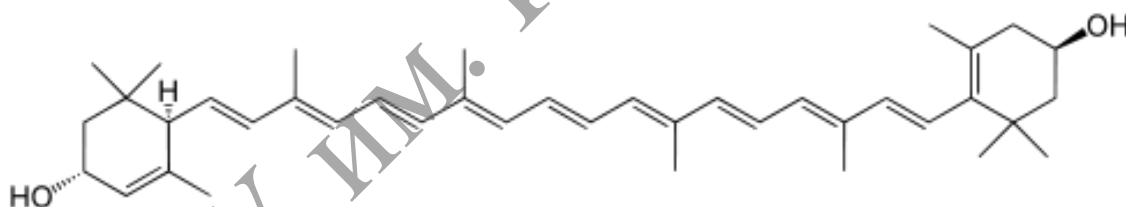


Рисунок 2.6. – Лютеин

Каротиноиды поглощают свет преимущественно в сине-фиолетовой области спектра, чем и объясняется их желто-красная окраска. Каротиноиды высших растений и зеленых водорослей являются β-каротин и ксантофиллы. Эти четыре пигмента составляют 98 % от общего количества каротиноидов зеленых листьев. Из каротиноидных пигментов цианобактерий известны β-каротин, миксоксантофилл.

Каротиноиды играют роль вспомогательных пигментов, передающих энергию поглощенных квантов хлорофиллу или бактериохлорофиллу. Защитная функция каротиноидов заключается в дезактивации активных форм кислорода, этим они предохраняют хлорофилл и другие соединения клетки от разрушения.

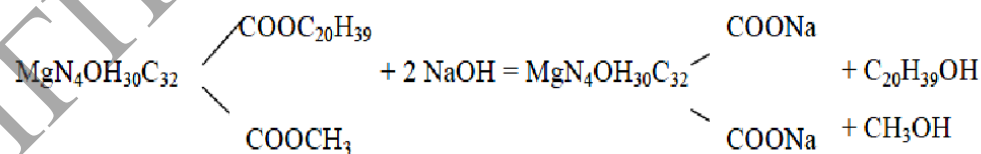
Набор и содержание пигментов в растениях зависят от систематического положения фототрофов, их онтогенетического состояния и условий существования. В процессе эволюции растения разных местообитаний вырабатывали свой характерный набор пигментов, позволяющих более эффективно использовать доступный свет.

Важным физико-химическим свойством пигментов является их растворимость в ряде растворителей.

Фотосинтетические пигменты находятся в живом листе в тесной связи с белково-липоидными компонентами мембран хлоропластов. Известно, что эта связь менее прочная, чем ковалентная, и легко разрушается при действии на лист полярных органических растворителей (спирт, ацетон). Из сухих листьев хлорофилл извлекают 85% ацетоном или спиртом (этанол). Неполярные растворители (бензин, петролейный эфир) не могут разорвать связь хлорофилла с белком мембран и извлечь чистый пигмент. Вода не способна нарушить связь хлорофилла с белком. Каротины менее прочно связаны с белком, чем ксантофиллы, и извлекаются неполярными растворителями.

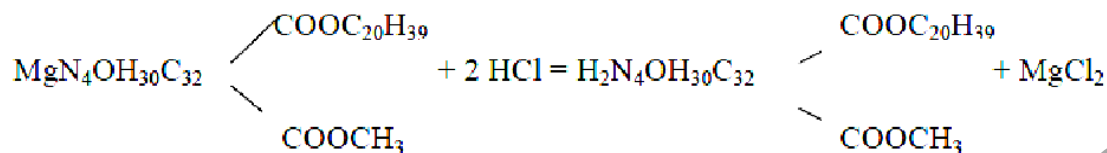
Ксантофиллы можно отделить *по методу Крауса*. Они, будучи по химической природе двухатомными спиртами, обладают более высокой гидрофильностью и поэтому значительно хуже других пигментов растворимы в бензине.

Каротин легче всего отделить от смеси пигментов *путем омыления* хлорофиллов. Хлорофилл благодаря наличию фитольного «хвоста» обладает высокой растворимостью в бензине. При омылении его раствором щелочи происходит отщепление спиртов, фитола и метанола. Оставшаяся часть молекулы – двухосновная кислота хлорофиллин – образует соль хлорофиллина с натрием, которая, как и все соли вообще, растворима в воде, т.е. гидрофильна, и не растворима в бензине. В результате после омыления в бензине остается только высоколипофильный каротин. Реакция омыления идет следующим образом:

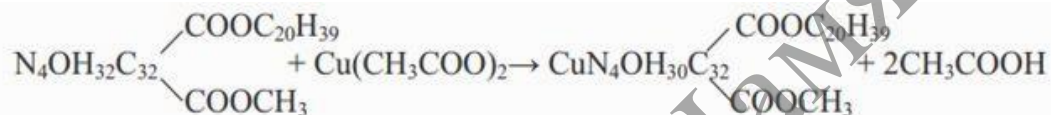


Соли хлорофилла, как и сам хлорофилл, имеют зеленую окраску, поскольку при омылении не затрагивается структура порфиринового ядра, придающего молекуле зеленый цвет. Способность хлорофилла к реакции омыления показывает, что он является сложным эфиром и, как другие сложные эфиры способен расщепляться под действием щелочи с образованием солей. Желтые пигменты каротиноиды со щелочами не реагируют.

В центре порфиринового ядра молекулы хлорофилла находится атом магния. Осторожным воздействием разбавленных и слабых кислот атом магния можно заменить на водород. Образуется безмагниево производное хлорофилла оливкового цвета – феофитин:



*Реакция феофинизации* показывает, что зеленая окраска хлорофилла в значительной степени связана с присутствием атома металла магния. Об этом также свидетельствует реакция восстановления металлоорганической связи:



Реакция между феофитином и солью металла, например с уксуснокислой медью приводит к замещению водорода металлом и восстановлению зеленой окраски. Получается медьпроизводное хлорофилла. Это производное уже не обладает свойствами хлорофилла.

### Получение спиртовой вытяжки из листьев

Пигменты из растительной ткани извлекают полярными растворителями (этиловый спирт, ацетон), которые разрушают связь хлорофиллов и ксантофиллов с липопротеидами пластид и обеспечивают их полное экстрагирование. Неполярные растворители (петролейный эфир, гексан, бензин и др.) не нарушают связи этих пигментов с белками. Для получения вытяжки пигментов используют как сырой, так и сухой растительный материал. Высушенные листья предварительно обрабатывают горячей водой, чтобы облегчить последующее извлечение пигментов.

**Ход работы.** Навеску из свежих листьев в 0,5–2 измельчить, поместить в ступку, добавить на кончике скальпеля  $\text{CaCO}_3$  (для нейтрализации кислот клеточного сока) и немного чистого кварцевого песка. Тщательно растереть, приливая понемногу этиловый спирт, добавляя его несколькими порциями. Смазать носик ступки с наружной стороны вазелином и слить полученный темно-зеленый раствор по стеклянной палочке в воронку с бумажным фильтром и отфильтровать. Экстракт пигментов используют в работе.

### **Разделение пигментов по методу Крауса**

Данный метод демонстрирует различную растворимость пигментов в полярных и неполярных растворителях.

**Ход работы.** В пробирку с 2–3 мл спиртовой вытяжки пигментов добавить равное количество бензина, встряхнуть, внести 2–3 капли воды (для лучшего разделения слоев), снова осторожно встряхнуть (сильное встряхивание нежелательно, так как образуется стойкая эмульсия и раствор становится мутным) и дать отстояться. В результате происходит разделение содержимого пробирки на два слоя: верхний (бензиновый), окрашенный в зеленый цвет (содержит хлорофилл, а также каротин), и нижний (спиртовой), окрашенный в желтый цвет (содержит ксантофиллы).

Если оба слоя окрашены в зеленый цвет, значит, разделение проведено неудачно. В таком случае следует добавить еще немного бензина, хорошо встряхнуть пробирку, внести 1–2 капли воды, снова осторожно встряхнуть и дать отстояться.

Если нижний слой недостаточно прозрачен из-за избытка воды, добавить немного спирта.

**Задание.** Зарисовать распределение пигментов в спирте и бензине (рисунок поместить в таблицу 2.1), сделать выводы о различной их растворимости.

### **Реакция омыления**

Реакция омыления с последующим выделением каротина демонстрирует, с одной стороны, растворимость пигментов, с другой – свойства хлорофилла как сложного эфира.

**Ход работы.** В пробирку с 2–3 мл спиртовой вытяжки пигментов добавить 2–3 капли 2 % раствора щелочи, многократно встряхнуть пробирку для лучшего контакта пигментов со щелочью. Прилить равный объем бензина, снова осторожно встряхнуть, внести 1–2 капли воды, встряхнуть и дать отстояться, пока не произойдет четкое расслоение смеси на две зоны: верхнюю, желтого цвета, содержащую каротин, и нижнюю, зеленого цвета, содержащую калиевую соль хлорофилла.

### **Реакция феофитинизации.**

Реакция феофитинизации доказывает наличие магния в молекуле хлорофилла.

**Ход работы.** В две пробирки с 2–3 мл спиртовой вытяжки пигментов добавить по 2–3 капли 10 % соляной кислоты и встряхнуть (более концентрированные кислоты непригодны, так как вызывают необратимое разрушение порфиринового ядра хлорофилла). Под действием кислоты образуется феофитин оливково-бурого цвета.

Реакция восстановления металлорганической связи показывает, что зеленая окраска хлорофилла обусловлена наличием в нем металла.

**Ход работы.** В одну из пробирок с раствором феофитина внести на кончике скальпеля уксуснокислую медь и довести до кипения. Если окраска не изменится, следует добавить еще немного соли меди и снова нагреть. Происходит изменение оливковой окраски на изумрудно-зеленую.

### Задание

1. Записать реакцию омыления хлорофилла. Зарисовать окраску слоев указав распределение в них пигментов. Результаты оформить в таблицу 2.1
2. Записать реакцию феофитинизации.
3. Записать реакцию восстановления водорода металлом.
4. Результаты по изучению химических свойств пигментов оформить в виде таблицы 2.1.

**Таблица 2.1. – Химические свойства пигментов**

Исходное вещество	Добавленное вещество	Окраска раствора (рисунок)	Полученное вещество

5. Сделать вывод о физико-химических (растворимость в полярных и неполярных растворителях) и химических свойствах хлорофилла и каротиноидов.

### Контрольные вопросы

1. Какие пигменты можно отделить от других по методу Крауса?
2. Что доказывает реакция омыления?
3. Как можно отделить каротины от других пигментов?
4. Что доказывает реакция феофитинизации?

## 2.2.2. Разделение пигментов методом бумажной хроматографии

**Цель работы:** ознакомиться с методикой разделения пигментов методом бумажной хроматографии.

**Объекты:** зеленые листья любых растений.

**Материалы и оборудование:** мел в порошке или углекислый кальций, кварцевый песок или толченое стекло, дистиллированная вода; фарфоровые ступки с пестиком, пипетки, скальпели, стеклянные стаканчики, бюкс, пробирки или цилиндры с пробками (для хроматографии), штатив для пробирок, пробочные сверла диаметром 0,8–1 см, чашки Петри, хроматографическая и фильтровальная бумага, стеклянные палочки.

### Краткие сведения

Смесь нескольких пигментов близкого строения можно разделить на отдельные компоненты с помощью метода хроматографии. Этот метод в 1906 г. предложил русский ученый М. С. Цвет. Метод основан на различной подвижности каждого компонента на определенном адсорбенте. В качестве адсорбентов могут быть использованы сахароза, окись магния, крахмал, силикагель, бумага и т. д. Подвижность вещества зависит от его растворимости в растворителе, пропускаемом через адсорбент, и адсорбируемости на данном адсорбенте. Чем выше растворимость пигмента в растворителе и чем хуже он адсорбируется на адсорбенте, тем больше его подвижность, тем дальше он будет расположен от стартовой полосы. Применяя разные комбинации растворителей и адсорбенты различной природы, можно добиться высокой степени разделения и очистки пигментов.

Метод бумажной хроматографии основан на разделении пигментов между волокнами целлюлозы хроматографической бумаги и подвижной фазы растворителем. Хроматографирование на бумаге проводят восходящим и нисходящим способами. При восходящей хроматографии бумажную полосу подвешивают вертикально: ее нижний конец, на который нанесена смесь пигментов, погружают в растворитель. При этом место нанесения смеси должно находиться выше уровня растворителя. При нисходящей хроматографии верхний конец бумажной полосы со смесью пигментов, нанесенных недалеко от кромки бумаги, закрепляют в сосуде и размещают в верхней части камеры. Нижний конец бумаги опускают вниз, но так, чтобы он не касался налитого на дне растворителя. В результате действия капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает передвигаться вниз по бумажной полосе, в результате чего происходит разделение смеси.

#### Получение ацетонового экстракта из свежих листьев

Пигменты из растительной ткани извлекают полярным растворителем (ацетон), который разрушает связь хлорофиллов и ксантофиллов с липопротеидами пластид и обеспечивает их полное экстрагирование.

**Ход работы.** Измельченные свежие листья поместить в ступку, добавить толченое стекло или песок, немного мела и растереть, приливая ацетон (на 2–3 г материала около 25 мл ацетона).

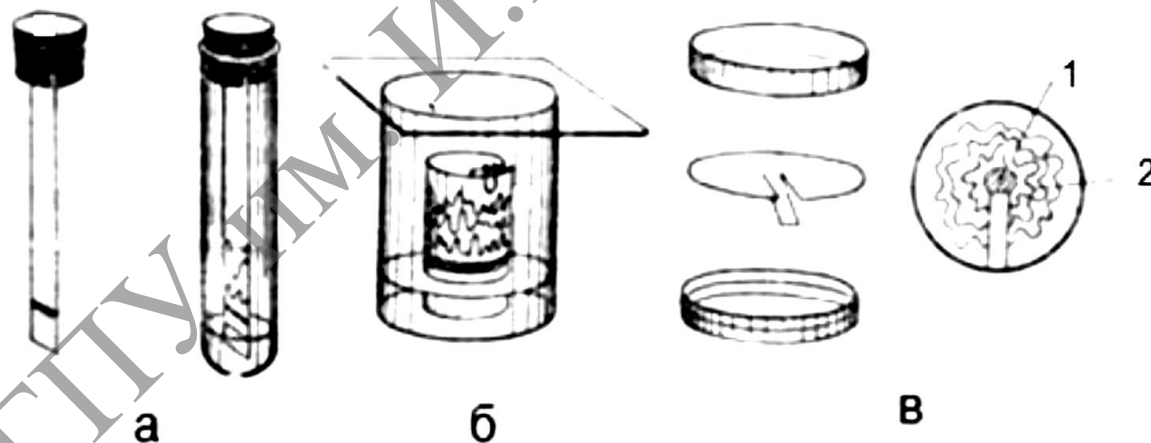
Все операции с ацетоном проводить в вытяжном шкафу. Полученный раствор профильтровать через бумажный складчатый фильтр.



**Вариант 1.** Вытяжку налить в бюкс. На полоску хроматографической или фильтровальной бумаги (2 x 12 см) карандашом нанести стартовую линию (от края полоски 1–1,5 см), погрузить этим концом в вытяжку пигментов на глубину 1–1,5 см, затем высушить на воздухе. Операцию повторить несколько раз до тех пор, пока зона погружения не приобретет *достаточно зеленый цвет*. Далее опустить этот конец несколько раз в чистый ацетон на глубину 2 мм, согнать все пигменты в стартовую полосу (ширина 2–3 мм), просушить и вставить противоположным концом в разрез пробки. Закрыть пробкой пробирку, на дно которой налит бензин или петролейный эфир.

Полоска бумаги должна находиться в вертикальном положении, а ее нижний край надо погрузить в растворитель так, чтобы последний не касался стартовой полосы (рисунок 2.6 а). До и после погружения хроматограммы пробирка должна быть закрыта плотно пробкой и находиться на слабом свете во избежание фоторазрушения пигментов. Когда растворитель достигнет верхнего края хроматограммы, полоску бумаги вынуть и просушить на воздухе. На хроматограмме отметить положение полос, соответствующих определенным пигментам.

Пигменты на хроматограмме расположатся в следующем порядке: внизу – хлорофилл *в*, над ним – хлорофилл *а*, затем ксантофилл и выше всех каротин



а – узкая полоска; б – цилиндрическая хроматограмма;  
в – круговая хроматограмма (1 – стартовое пятно, 2 – разделенные пигменты)  
Рисунок 2.6. – Схема бумажной восходящей хроматографии

**Вариант 2.** На лист фильтровальной или хроматографической бумаги (15 x 15 см) нанести пипеткой с оттянутым концом полосу пигментов на расстоянии 1,5 см от края. Ширина полосы должна быть около 1 см, цвет – интенсивно зеленый. Хроматограмму свернуть трубочкой, склоть скрепкой и опустить нижним концом в банку, на дно которой налит слой бензина высотой около 1 см (рисунок 2.6 б). Стартовая

полоса не должна касаться бензина. Если разделение пигментов происходит медленно и нечетко, следует вынуть хроматограмму и добавить к бензину 1–2 мл какого-либо полярного растворителя (спирт, ацетон). Снова погрузить в смесь хроматограмму и плотно закрыть крышкой. Когда пигмент, движущийся с фронтом растворителя, поднимется до верхнего края хроматограммы, ее вынимают, просушивают на воздухе и отмечают положение полос пигментов.

### **Задания**

1. Отдельным группам провести хроматографию пигментов по одному из указанных способов.
2. На полученных хроматограммах отметить зоны расположения пигментов. Обозначить их цифрами и слегка подкрасить в соответствующий цвет, так как на воздухе они быстро выцветают.
3. Расшифровать хроматограмму и вклеить в лабораторную тетрадь. Стрелкой указать направление движения растворителя.
4. Сделать вывод, какие пигменты можно выделить с помощью данного метода хроматографии.
5. Объяснить расположение пигментов на хроматограмме, исходя из их химического строения и растворимости.

### **Контрольные вопросы**

1. Какой пигмент ближе всего оказался к старту и почему?
2. Какой пигмент ближе всего оказался к финишу и почему?
3. Почему хлорофилл *a* оказался ближе к финишу по сравнению с хлорофиллом *b*?
4. Какие каротиноидные пигменты после разделения были ближе к старту и почему?

### **2.2.3. Фотохимическая активность хлорофилла**

**Цель работы:** с помощью модельного опыта продемонстрировать фотосенсибилизирующую активность хлорофилла.

**Объекты:** зеленые листья любых растений.

**Материалы и оборудование:** лампа 100 Вт, штатив, пробирки, ступка, пестик, черная бумага, этанол, кристаллическая аскорбиновая кислота (АК), насыщенный спиртовой раствор метилового красного (МК).

### **Краткие сведения**

В 1948 г. академик А. А. Красновский простым опытом доказал, что хлорофилл в фотосинтезе является участником и инициатором окислительно-восстановительных реакций. Показать эту способность хлорофилла можно в модельном опыте с помощью двух соединений – аскорбиновой кислоты (АК) и метилового красного (МК), обладающих

окислительно-восстановительными свойствами. АК способна к необратимой окислительно-восстановительной реакции с образованием дегидроаскорбиновой кислоты (ДГАК), что сопровождается переносом электрона к акцептору:



В этом заключается важнейшая функция АК в клетках живых организмов, где она выступает в качестве источника энергии, отдавая электроны и протоны в дыхательную электронно-транспортную сеть. Окислительно-восстановительный потенциал ( $E_0$ ) АК равен 0,1 эВ (при pH 5,75). АК является восстановителем, а в данной реакции – донором электронов.

МК тоже обладает окислительно-восстановительным потенциалом, равным 0,8 эВ, и является окислителем. Но из-за большой разницы потенциалов (0,7 эВ) МК не может окислить АК спонтанно. Однако осуществить окисление АК и восстановление МК можно с помощью фотосенсибилизатора, т. е. вещества, использующего энергию света и стимулирующего химическую реакцию, но не участвующего в ней. Таким образом, как бы моделируется принцип цепи окислительно-восстановительных реакций, происходящих при фотосинтезе после поглощения света молекулами хлорофилла. Транспорт электрона окислительно-восстановительной реакции с участием фотосенсибилизатора (возбужденного хлорофилла) представлен на рисунке 2.7.



**Рисунок 2.7.** – Схема транспорта электрона в окислительно-восстановительной реакции фотохимической стадии фотосинтеза

В тилакоидной мембране хлоропласта хлорофилл, обладая свойствами сильного восстановителя, может восстанавливать редокс-системы с большим отрицательным потенциалом. Энергия отдаваемого при этом электрона может быть израсходована на последующие окислительно-восстановительные реакции в электрон-транспортной цепи, приводящие к созданию градиента протонов на мембране тилакоида и последующему синтезу АТФ.

**Ход работы.** Листья (1 г) размельчают в ступке с добавлением 10–12 мл этанола. Осадок пропускают через воронку с бумажным фильтром.

Экстракт хлорофилла разлить поровну (по 3 мл) в четыре пробирки, в пятую налить 3 мл этанола. Затем в четыре пробирки (1, 2, 3 – с экстрактом хлорофилла, 5 – с этанолом) добавить одинаковое количество (1–2 капли) раствора метилового красного (МК), пока окраска экстракта не приобретет бурый цвет в пробирках с экстрактом и красный в этаноле. Много метилового красного добавлять не следует.

В пробирки 1, 2 и 5 добавить по 30 мг (на кончике скальпеля) кристаллической аскорбиновой кислоты (АК) и перемешать, встряхивая.

Пробирку 2 закрыть черной бумагой. Штатив с пробирками поставить перед яркой лампой, поместив между штативом и лампой сосуд с водой таким образом, чтобы предотвратить нагревание растворов. Через 15–20 мин после начала экспозиции в одной пробирке раствор приобретет ярко-зеленую окраску (как в контрольной пробирке 4), так как метиловый красный восстанавливается в лейкосоединение, и только хлорофилл обеспечивает зеленый цвет раствора.

В остальных вариантах бурая и красная окраски не изменятся.

#### **Задания.**

1. Результаты оформите в таблицу 2.2.
2. Сделайте выводы относительно фотосенсибилизирующей активности хлорофилла, роли АК, МК и света.

**Таблица 2.2. – Фотохимическая активность хлорофилла**

Вариант опыта	Компоненты среды и освещенность	Исходная окраска раствора	Изменение окраски раствора	Причины изменения или отсутствия изменения окраски раствора
1	ХЛ + МК + АК + свет			
2	ХЛ + МК + АК + темнота			
3	ХЛ + МК + свет			
4	ХЛ + свет			
5	Этанол + МК + АК + свет			

### 2.2.4. Влияние внешних условий на процесс фотосинтеза

**Цель работы:** изучить влияние внешних факторов на процесс фотосинтеза.

**Объект:** элодея.

**Материалы и оборудование:** сода двууглекислая, 1 %-ный раствор двуххромовокислого калия, 4 %-ный раствор медного купороса, насыщенный аммиаком; кювета, пинцет длинный, лезвие бритвы, пробирка, вставленная в колбочку, лампа настольная мощностью 100–200 Вт, песочные часы на 1–3 минуты или секундомер, электроплитка, термометр, колбы (3 шт.), линейка.

#### Краткие сведения

Фотосинтез – цепь взаимосвязанных реакций. Интенсивность процесса фотосинтеза зависит от внешних факторов, к ним относятся свет, температура, концентрация углекислого газа в воздухе и водоснабжение растения.

Интенсивность света оказывает большое влияние на процесс фотосинтеза. С повышением интенсивности света ускоряется и фотосинтез, но прямой пропорциональной зависимости между интенсивностью света и фотосинтезом не наблюдается. Зависимость фотосинтеза от количества света будет у разных растений неодинакова. По отношению к интенсивности света растения разделяют на 2 группы: светолюбивые и теневыносливые. Первые хорошо растут на открытых местах, при ярком свете, вторые – в тени. Эти растения отличаются и по интенсивности фотосинтеза: у светолюбивых растений фотосинтез возрастает при увеличении освещения, у теневыносливых остается на одном уровне (рисунок 2.8).

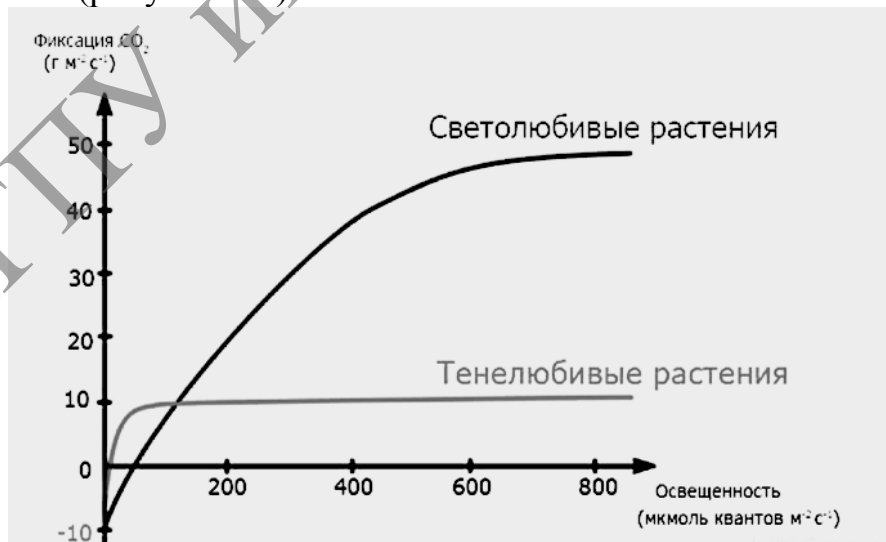


Рисунок 2.8. – Зависимость фотосинтеза от интенсивности света у светолюбивых и теневыносливых растений

Температура оказывает большое влияние на процесс фотосинтеза. При повышении температуры на  $10^\circ$  интенсивность фотосинтеза примерно удваивается. Усиление фотосинтеза, однако, происходит только до температуры  $30\text{--}35^\circ$ , дальнейшее повышение ее приводит к уменьшению фотосинтеза, и при  $40\text{--}45^\circ\text{C}$  он прекращается. У многих растений наиболее интенсивный фотосинтез наблюдается при  $20\text{--}25^\circ\text{C}$  (рисунок 2.9).

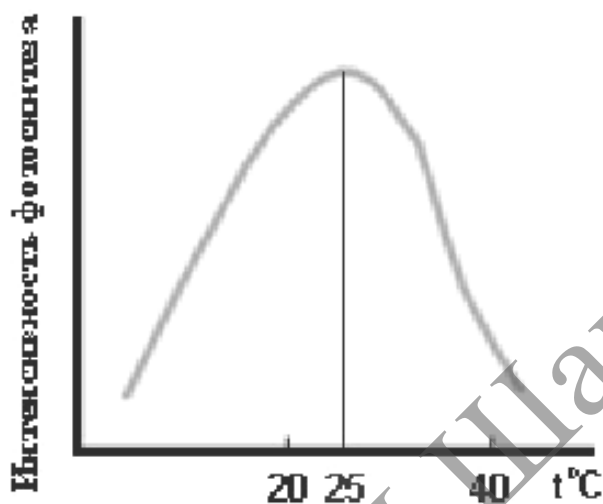


Рисунок 2.9. – Зависимость фотосинтеза от температуры

По представлению Ф. Блэкмана, форма кривой изменения интенсивности фотосинтеза с повышением температуры обусловлена тем, что наряду с прогрессивным ускорением химических реакций при повышении температуры возникают процессы, угнетающие фотосинтез (инактивация хлоропластов).

К числу внешних факторов, влияющих на интенсивность фотосинтеза, относится и содержание углекислого газа в атмосфере. В среднем в атмосфере содержится  $0,03\%$  углекислого газа по объему, и содержание его в атмосфере почти не изменяется: дефицит быстро выравнивается поступлением  $\text{CO}_2$  из почвы в результате жизнедеятельности микроорганизмов. При увеличении количества углекислого газа в атмосфере фотосинтез возрастает, но прямой пропорциональности между содержанием углекислого газа и фотосинтезом не наблюдается. Фотосинтез устойчиво увеличивается при повышении содержания углекислого газа до  $0,06\%$ , а при значительной интенсивности света и при  $1,5\text{--}2,0\%$ . При повышении интенсивности света с одновременным увеличением количества углекислого газа возрастает и интенсивность фотосинтеза.

Большое значение для протекания и интенсивности фотосинтеза имеет содержание воды в растении и условия его водоснабжения, поскольку из воды и углекислого газа синтезируются органические вещества и коллоиды цитоплазмы должны быть насыщены водой. При недостатке воды закрываются устьица, в результате замедляется процесс проникновения углекислого газа в лист, а это, в свою очередь, приводит к уменьшению фотосинтеза. При недостаточном водоснабжении подсыхают оболочки клеток мезофилла, граничащие с межклеточниками, что задерживает передвижение углекислого газа к хлоропластам. Вода необходима также и для нормальной работы ферментов, участвующих в процессе фотосинтеза, а в дальнейшем для переработки его продуктов. При недостатке воды задерживается отток образовавшихся продуктов из листа в стебель и корень растения, что тоже тормозит процесс фотосинтеза, от температуры. Избыточное увлажнение, в результате которого могут закрываться устьица, также отрицательно сказывается на интенсивности фотосинтеза: углекислый газ не может проникнуть внутрь листа.

В основе определения интенсивности фотосинтеза лежат две группы методов: газометрические, регистрирующие количество поглощенной углекислоты или выделенного кислорода, и методы учета органического вещества, образующегося при фотосинтезе. Газометрические методы (количественные и полуколичественные) обеспечивают точность учета интенсивности фотосинтеза. Менее точный, но простой и наглядный метод счета пузырьков кислорода применим при изучении водных растений. На свету в листьях происходит фотосинтез, продуктом которого является кислород, накапливающийся в межклетниках. При срезании стебля избыток газа начинает выделяться с поверхности среза в виде непрерывного тока пузырьков, быстрота образования которых зависит от интенсивности фотосинтеза. Данный метод дает наглядное представление о тесной зависимости процесса фотосинтеза от внешних условий.

**Ход работы.** Поместить веточку элодеи с неповрежденной верхушечной почкой в кювету с водой и обновить срез острой бритвой для устранения возможной закупорки путей при выходе газа. Погрузить веточку срезом вверх в пробирку с водой, предварительно обогащенной диоксидом углерода путем растворения небольшого количества соды (перед погружением веточки внести в пробирку на кончике ножа  $\text{NaHCO}_3$  и взболтать). Поместив пробирку с веточкой элодеи в те или иные условия, подождать, пока установится равномерный ток пузырьков, перевернуть песочные часы и подсчитать количество пузырьков, выделенных за определенное время. Используя в качестве источника света проекционный фонарь или настольную лампу мощностью 100–200 Вт, провести следующие опыты:

**Влияние освещенности.** Налить воду, нагретую до 20 °С, в колбу и вставить в этот сосуд пробирку с веточкой элодеи. Подсчитать количество пузырьков кислорода при разных расстояниях от источника света.

**Влияние спектрального состава света.** Подсчитать количество пузырьков при освещении белым светом (пробирка погружена в сосуд с водой). Затем провести наблюдение при красном экране, заменяя воду в наружном сосуде раствором  $K_2Cr_2O_7$ , который пропускает красные, оранжевые и желтые лучи и не пропускает сине-фиолетовые. После этого определить интенсивность фотосинтеза при синем экране, наливая в наружный сосуд раствор серно-аммиачно-медной соли, пропускающий голубые, синие и фиолетовые лучи, но задерживающий длинноволновую часть спектра. Все три наблюдения провести с жидкостями одинаковой температуры и на одном и том же расстоянии от источника света.

**Влияние температуры.** Налить в наружный сосуд сначала теплую, а затем холодную воду и провести отсчеты при одинаковом расстоянии от источника света.

#### Задания

1. Результаты оформите в таблицу 2.3 (расстояние от источника света и температура указаны ориентировочно).

2. Выявить, в каких лучах спектра процесс идет интенсивнее, сделать выводы о влиянии температуры на интенсивность фотосинтеза, о влиянии исследованных факторов на интенсивность фотосинтеза.

Таблица 2.3. – Влияние внешних условий на процесс фотосинтеза

Расстояние от источника света, см	Экран	Температура, °С	Количество пузырьков $O_2$ за 5 мин
5	Белый	20	
10	Белый	20	
20	Белый	20	
5	Белый	20	
5	Красный	20	
5	Синий	20	
5	Белый	20	
5	Белый	10	

#### Контрольные вопросы

1. Какова зависимость интенсивности фотосинтеза от внешних факторов: освещения, температуры, концентрации  $CO_2$ , спектрального состава света?

2. От каких внутренних факторов зависит интенсивность фотосинтеза?

3. Какие методы определения фотосинтеза вам известны?



## ТЕМА 3. ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

### 3.1. Теоретическая часть

Дыхание – аэробное окисление органических субстратов до диоксида углерода и воды. Дыхание занимает центральное место в энергетике растительной клетки. В ходе дыхания происходит высвобождение энергии органических субстратов и использование ее для процессов жизнедеятельности растений. Большая часть энергии в ходе дыхания запасается в виде макроэргических связей АТФ, а также в виде тепла (термогенез).

Не менее важна метаболическая роль дыхания. В ходе окисления органических субстратов происходит перестройка углеродных скелетов органических веществ и образование важных промежуточных продуктов, которые используются для синтеза белков, липидов, ароматических веществ и др.

Несмотря на то, что общее уравнение дыхания обратное уравнению фотосинтеза, по физиологическому значению эти два процесса близки: дыхание, как и фотосинтез, снабжает клетки энергией и важными метаболитами. Однако, в отличие от фотосинтеза, дыхание включает реакции, идущие с высвобождением энергии. Физиологический смысл дыхания состоит в преобразовании энергии органических соединений в более доступную для растений форму – макроэргические связи АТФ. Набор промежуточных метаболитов, синтезируемых в процессе дыхания, шире, чем набор метаболитов фотосинтеза.

#### История развития учения о дыхании

Клеточное дыхание – это окислительный, с участием кислорода распад органических питательных веществ, сопровождающийся образованием химически активных метаболитов и освобождением энергии, которые используются клетками для процессов жизнедеятельности.

Научные основы учения о роли кислорода и дыхании были заложены трудами А. Л. Лавуазье. В 1774 г. кислород независимо друг от друга открыли Пристли и Шееле, а Лавуазье дал название этому элементу. Изучая одновременно процесс дыхания животных и горение, А. Л. Лавуазье в 1773–1783 гг. пришел к выводу, что при дыхании, как и при горении, поглощается  $O_2$  и образуется  $CO_2$ , причем в том и другом случае выделяется теплота. На основании своих опытов он заключил, что процесс горения состоит в присоединении кислорода к субстрату и что дыхание есть медленно текучее горение питательных веществ в живом организме.

Я. Ингенхауз в 1778–1780 гг. показал, что зеленые растения в темноте, а незеленые части растений и в темноте, и на свету поглощают кислород и выделяют  $\text{CO}_2$  так же, как и животные. Основателем учения о дыхании растений считают Н. Т. Соссюра. В 1797–1804 гг., впервые широко используя количественный анализ, он установил, что в темноте растения поглощают столько же кислорода, сколько выделяется  $\text{CO}_2$ , т. е. соотношение  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ , как правило равно 1. При этом одновременно с  $\text{CO}_2$  образуется и вода. Мнение Соссюра о том, что описанный им газообмен у растений является процессом дыхания и что этот процесс обеспечивает растительный организм энергией, долгое время не признавалось. Утверждалось, что в ночное время растения выделяют тот  $\text{CO}_2$ , который не был использован при фотосинтезе, и что этот  $\text{CO}_2$  не имеет никакого отношения к дыханию.

Однако постепенно накапливалось все больше данных о том, что дыхание животных и растений протекает однотипно, несмотря на отсутствие у растений специальных дыхательных органов, причем основным субстратом дыхания служат сахара. И. П. Бородин (1876) в серии точных опытов установил, что интенсивность дыхания листоносных побегов в темноте зависит от количества углеводов, накопленных ими на свету.

Во второй половине XIX в. в результате изучения дыхания у растительных и животных объектов общее уравнение этого процесса приняло следующий вид:



Швейцарский химик Х. Ф. Шейнбайн, открывший озон, изучал причины быстрого потемнения пораненной поверхности растительных тканей, таких, как ткани яблок, картофеля, плодовых тел грибов. В 1845 г. он выступил со своей теорией окислительных процессов, согласно которой в живых клетках имеются соединения, способные легко окисляться в присутствии  $\text{O}_2$  и таким образом активировать молекулярный кислород. Если ткань прокипятить, то потемнения не происходит. Следовательно, потемнение ткани – каталитический окислительный процесс. Шейнбайн ошибочно полагал, что активация кислорода – это образование озона.

Исследования, начатые ученым, продолжил А. Н. Бах, который в 1897 г. разработал перекисную теорию биологического окисления, предложив ее к процессам дыхания. Несколько позже, в том же 1897 г., аналогичные взгляды высказал немецкий исследователь К. Энглер. Суть перекисной теории биологического окисления А. Баха заключается в следующем: по мысли ученого активация кислорода есть образование пероксида.

Много позднее, в 1955 г., две группы исследователей – О. Хаяиши с сотрудниками в Японии и Г. С. Мезон с сотрудниками в США, используя современные методы, проанализировали возможность включения кислорода в органические соединения.

В настоящее время известно, что путь включения кислорода в органические соединения в соответствии с перекисной теорией биологического окисления Бахай-Энглера не имеет отношения к дыханию, однако работы этих исследователей сыграли большую роль и в изучении химизма дыхания, заложив основы современного понимания механизмов активации кислорода.

Какую же роль играет кислород в процессах дыхания? В 1921 г. немецкий биохимик О. Г. Варбург, изучая влияние ингибиторов на дыхание различных объектов, обнаружил, что поглощение кислорода резко ингибируется оксидом углерода и синильной кислотой, взаимодействующими в клетках с железосодержащим веществом порфириновой природы (с цитохромоксидазой). Английский биохимик Д. Кейлин в 1925 г. окончательно доказал присутствие в клетках цитохромоксидазы, ускоряющей поглощение ими кислорода, и открыл другие цитохромы. Затем цитохромы были обнаружены у всех аэробов и было показано, что у этих организмов на завершающем этапе процесса дыхания осуществляется перенос на кислород электронов и протонов, в результате чего образуется  $H_2O$  (или  $H_2O_2$ ).

Органические соединения могут окисляться и другим способом: благодаря отнятию водорода. Еще А. Бах, сделав упор на перекисную теорию, выдвинул и вторую гипотезу, согласно которой биологическое окисление связано с отнятием от субстрата электронов и протонов. Роль же кислорода состоит в этом случае в регенерации окисленного состояния первичного акцептора водорода.

Вторая гипотеза А. Баха была в дальнейшем развита В. И. Палладиным в стройную теорию химизма дыхания. Занимаясь с 1903 по 1916 г. дыхательными пигментами (темнеющими на воздухе веществами тканей), Палладию нашел удачную искусственную модель, которая помогла расшифровать химизм дыхания. Это был известный краситель метиленовый синий. Если в пробирку с раствором метиленового синего поместить несколько прорастающих зародышей пшеницы и выкачать воздух (удалить кислород), то через некоторое время этот краситель полностью обесцветится. Если затем открыть пробирку и встряхнуть содержимое (т. е. дать кислород), то краситель снова синееет. Таким образом, при контакте с кислородом краситель окисляется, приобретая синий цвет, а живая ткань способна постанавливать краситель, обесцвечивая его. Причем окисление метиленового синего связано не с присоединением кислорода, а с отнятием водорода. Краситель восстанавливается за счет соединения электронов и протонов.

На основании этих и других опытов В. Палладию в 1912 г. представил общую теорию химизма дыхания, разделив основное уравнение дыхания на анаэробную (1) и аэробную (2) части:

1.  $C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 12R \rightarrow 12RH_2 + 6CO_2$
2.  $\frac{12RH_2 + 6O_2 \rightarrow 12H_2O + 12R}{C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6H_2O + 6CO_2},$

где R – это окрашенный дыхательный пигмент, способный отнимать водород от субстрата, а  $RH_2$  – бесцветный дыхательный хромоген. В дальнейшем теория В. Палладина об анаэробной и аэробной фазах дыхания и о роли воды в дыхательном процессе полностью подтвердилась.

В том же 1912 г. появилась работа немецкого биохимика Г. Виланда, который также пришел к заключению, что биологическое окисление связано с отнятием водорода.

Экспериментальные доказательства участия воды в окислении субстрата дыхания и роли  $O_2$  как конечного акцептора водорода были получены лишь в 1955 г. в работе Б. Б. Вартапетяна и А. Л. Курсанова. Опыты ставились с этиолированными проростками пшеницы, которым давали  $^{18}O$  в составе  $O_2$  или  $H_2O$ , а через 2 часа анализировали содержание  $^{18}O$  в  $CO_2$  дыхания.

### Взаимосвязь дыхания и брожения

Из всех приведенных выше данных следует, что окисление органических веществ в ходе дыхания связано с отнятием водорода и что теория А. Лавуазье о сходстве дыхания и горения не соответствует действительности.

Сосюр, работая с зелеными растениями в темноте, обнаружил, что они выделяют  $CO_2$  даже в бескислородной среде. Л. Пастер нашел, что в темноте при отсутствии кислорода в растительных тканях наряду с выделением  $CO_2$  образуется спирт, т. е. идет спиртовое брожение. Он пришел к выводу, что в растительных тканях, так же, как и у бактерий, возможно спиртовое брожение.

Немецкий физиолог Э. Ф. Пфлюгер (1875), изучая дыхание животных объектов, показал, что лягушки, помещенные в среду без кислорода, некоторое время остаются живыми и при этом выделяют  $CO_2$ . Он назвал это дыхание интрамолекулярным, т. е. дыханием за счет внутримолекулярного окисления субстрата. Предполагалось, что интрамолекулярное дыхание – начальный этап нормального аэробного дыхания. Эту точку зрения поддержал Б. Пфедфер – немецкий физиолог растений, который распространил ее на растительные организмы.

С. П. Костычев (1910) экспериментально доказал, что этанол не может быть промежуточным продуктом нормального аэробного дыхания растений по двум причинам: во-первых, он ядовит для растений и не может накапливаться, во-вторых, этанол окисляется растительными тканями значительно хуже, чем глюкоза.

Благодаря работам немецкого биохимика К. Нейберга, С. П. Костычева и других, стало очевидным, что дыхание и все виды брожения связаны между собой через пировиноградную кислоту (ПВК):



Таким образом, теория Костычева о генетической связи дыхания и брожения полностью подтвердилась.

### Окисление субстратов дыхания с участием окислительных ферментов

Основными субстратами дыхания растения являются углеводы – свободные сахара или полисахариды, белки и жиры, но после их гидролиза.

К запасным углеводам относят крахмал (картофель, кукуруза, рис), инулин (георгины, топинамбур), гемицеллюлозы. Субстратами дыхания могут служить кислоты первичного окисления сахаров.

Запасные жиры расходуются на дыхание проростков, развивающихся из семян, богатых жирами (подсолнечник, лен, конопля, клевер и др.).

В результате гидролиза жиры расщепляются липазой на глицерин и жирные кислоты. Благодаря фосфорилированию и последующему окислению, глицерин превращается в фосфоглицериновый альдегид, который включается в основной путь обмена углеводов.

Жирные кислоты окисляются по механизму  $\beta$ -окисления до фосфоенолпирувата (ФЕП). Фосфоглицериновый альдегид и ФЕП служат исходным материалом для синтеза глюкозы (фруктозы и сахарозы) в реакциях гликолиза. Экспериментально доказано, что по мере расходования жиров в прорастающих семенах увеличивается содержание сахаров. В результате синтеза сахаров из запасных жиров в клетках растений взаимодействуют сферосомы, глиоксисомы, митохондрии, пластиды и ферментные системы цитоплазмы.

Запасные белки используются для дыхания в результате гидролиза до аминокислот и последующего окисления до ацетил-СоА или кетокислот, которые поступают в цикл Кребса.

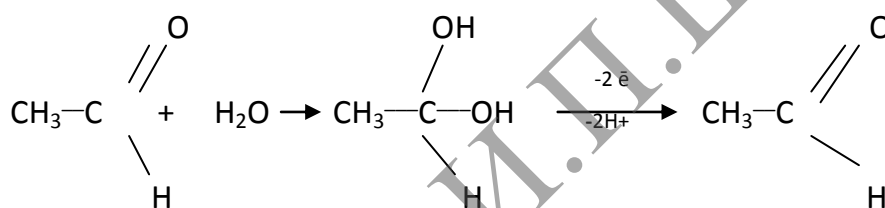
Полное окисление всех рассмотренных субстратов осуществляется до углекислого газа  $\text{CO}_2$  и воды с освобождением окисляемых веществ.

Отношение количества молей выделяемого при дыхании  $\text{CO}_2$  к количеству молей поглощенного кислорода называется дыхательным коэффициентом (ДК).

Величина ДК может характеризовать субстрат окисления. При окислении углеводов  $\text{ДК} = 1$ , при окислении органических кислот  $\text{ДК} > 1$ , при окислении липидов  $\text{ДК} < 1$ . Однако это справедливо при условии, если исключена возможность неполного окисления субстрата и вклад окислительных процессов, происходящих с участием кислорода, но не связанных с выделением углекислого газа.

Существует 4 способа окисления субстратов, все они связаны с отнятием электронов:

1. Непосредственная отдача электронов, например:  $F_e^{2+} \rightarrow F_e^{3+}$
2. Отнятие водорода:  $\text{CH}_3 - \text{CH}_3 \xrightarrow{-2\text{H}^+} \text{CH}_2 = \text{CH}_2$
3. Присоединение  $\text{O}_2$ :  $2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$
4. Образование промежуточного гидратированного соединения с последующим отнятием 2-х электронов и протонов:



Окисление субстратов в процессе дыхания происходит с участием окислительных ферментов.

Первый этап окисления осуществляется дегидрогеназами – ферментами, отнимающими от субстрата водород.

Существуют две группы дегидрогеназ:

- 1) анаэробные дегидрогеназы передают электроны различным промежуточным акцепторам, но не кислороду;
- 2) аэробные дегидрогеназы передают электроны различным акцепторам, в том числе и кислороду.

**Анаэробные дегидрогеназы.** Это двухкомпонентные ферменты, коферментом которых может быть  $\text{НАД}^+$  (никотинамидадениндинуклеотид).

При окислении субстрата  $\text{НАД}^+$  превращается в восстановленную форму  $\text{НАДН}$ , а второй протон субстрата диссоциирует в среду ( $\text{НАДН} + \text{H}^+$ ).

К анаэробным  $\text{НАД}$ -зависимым дегидрогеназам относятся также такие ферменты, как алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа и др. Коферментом анаэробных дегидрогеназ может

быть также НАДФ<sup>+</sup> (никотинамидадениндинуклеотидфосфат), содержащий на одну фосфатную группировку больше, чем НАД<sup>+</sup>. НАДФ-зависимыми дегидрогеназами являются изоцитратдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа и др.

Субстратная специфичность фермента зависит от его белковой части. Многие НАД- и НАДФ-зависимые дегидрогеназы нуждаются в присутствии ионов двухвалентных металлов (медь, молибден, цинк, железо). Например, алкогольдегидрогеназа содержит ионы цинка.

Анаэробные дегидрогеназы передают водород, т. е. электроны и протоны различным промежуточным переносчикам и аэробным дегидрогеназам.

**Аэробные дегидрогеназы.** Это также двухкомпонентные ферменты, получившие название флавиновых (флавопротеины). Помимо белков, в их состав входит прочно связанная с ними простетическая группа – рибофлавин (витамин В<sub>2</sub>).

Различают два кофермента этой группы: флавиномононуклеотид (ФМН) или желтый дыхательный фермент Варбурга, и флавинадениндинуклеотид (ФАД).

ФМН (рибофлавин-5-фосфат) содержит гетероциклическое азотистое основание – диметилизоаллоксазин, спирт рибит (производное рибозы) и фосфат.

Примером дегидрогеназы, в состав которой входит ФАД, является сукцинатдегидрогеназа. Доноры электронов для аэробных дегидрогеназ – анаэробные дегидрогеназы, а акцепторы – хиноны, цитохромы, кислород.

Терминальный этап дыхания осуществляется оксидазами. Оксидазы – это аэробные дегидрогеназы, способные передавать электроны от окисляемого субстрата только на кислород. При этом образуются вода, пероксид (перекись) водорода и супероксидный анион кислорода. Примером оксидаз первой группы могут быть цитохромоксидаза, фолифенолоксидаза и др., второй группы – флавопротеиновые оксидазы (например, оксидазы аминокислот), третьей – ферменты типа ксантиноксидоксидазы.

### **Цитохромная система**

Среди оксидаз очень важную роль играют железосодержащие ферменты и переносчики, относящиеся к цитохромной системе. В нее входят цитохромы и цитохромоксидаза. Включаясь в определенной последовательности в процесс переноса электронов, они передают их от флавопротеинов на молекулярный кислород. Ряд оксидаз содержит железо в виде гема (цитохромоксидаза, пероксидаза, каталаза), другие ферменты могут содержать медь (аскорбатоксидазы, полифенолоксидаза) либо молибден. Передавать электроны непосредственно на кислород способна только цитохромоксидаза. Из всех известных оксидаз она имеет

наибольшее сродство к кислороду. Ингибиторами цитохромоксидазы являются CO, цианид, азид. В растительных митохондриях кроме цитохромоксидазы функционирует оксидаза, не подавляемая цианидом.

Полифенолоксидаза, например о-дифенолоксидаза, катализирует перенос  $e^-$  и  $H^+$  от ряда фенолов (гидрохинон, пирокатехин, пирогаллол и др.) на молекулярный кислород:



В состав полифенолоксидазы входят атомы меди, непосредственно участвующие в присоединении и отдаче электронов.

**Аскорбатоксидаза.** К медьсодержащим оксидазам относится также аскорбатоксидаза, окисляющая аскорбиновую кислоту (АК) в дегидроаскорбиновую (ДАК).

**Пероксидаза и каталаза.** К пероксидазам относят целую группу ферментов, использующих в качестве окислителя перекись водорода: классическую пероксидазу, НАД-пероксидазу, НАДФ-пероксидазу, пероксидазу жирных кислот, цитохромпероксидазу и др. Все они работают по следующей схеме, где А – субстраты:



В последние 2–3 десятилетия показана полифункциональность пероксидаз. Помимо пероксидазной, у них имеется оксидазная функция, т. е. способность переносить электроны в отсутствие пероксидного кислорода на молекулярный кислород. Пероксидаза может также функционировать как анаэробная дегидрогеназа, например НАДН – дегидрогеназа, передающая электроны от восстановленных пиридиновых нуклеотидов на разные акцепторы.

Пероксид водорода, помимо пероксидазы, расщепляется также каталазой, в результате чего образуется молекулярный кислород. В реакции участвуют 2 молекулы пероксида, одна из которых функционирует как донор, а другая – как акцептор электронов.

**Оксигеназы.** Наряду с оксидазами, которые используют молекулярный кислород как акцептор электронов, в клетках широко представлены оксигеназы, активирующие кислород, в результате чего он может присоединяться к органическим соединениям. Ферменты, внедряющие в субстрат два атома кислорода, называют *диоксигеназами*, а присоединяющие один атом кислорода – *монооксигеназами* или *гидроксилазами*.



Оксигеназы присутствуют во всех типах клеток. Они участвуют в гидроксировании многих эндогенных соединений, в частности аминокислот, фенолов, стероидов и др. а также в детоксикации чужеродных токсических веществ (ксенобиотиков). Ряд оксигеназ имеет в своем составе атомы меди или гем, некоторые монооксигеназы – флавиновые ферменты.

### Гликолиз

**Гликолиз** – (от glyco, что означает сахар, и lysis, что означает расщепление) процесс анаэробного распада глюкозы, идущий с освобождением энергии, конечным продуктом которого является пировиноградная кислота. Процесс включает девять последовательных реакций, каждая из которых катализируется специфическим ферментом. Гликолиз – общий начальный этап аэробного дыхания и всех видов брожения. Реакции гликолиза протекают в растворимой части цитоплазмы (цитозоле) и в хлоропластах.

Английский биохимик А. Гарден и ученик К. А. Тимирязева Л. А. Иванов в 1905 г. независимо показали, что в процессе спиртового брожения наблюдается связывание неорганического фосфата и превращение его в органическую форму. А. Гарден установил, что глюкоза подвергается анаэробному распаду только после ее фосфорилирования. Полностью весь процесс гликолиза расшифровали немецкие биохимики Г. Эмбден, О. Ф. Мейергофф и советский биохимик Я. О. Парнас, с именами которых связывают название этого катаболического пути.

#### Этапы гликолиза, фосфорилирование на уровне субстрата

Цепь реакций, составляющих суть гликолиза, можно разбить на три этапа:

1. Подготовительный этап – фосфорилирование гексозы и ее расщепление на две фосфотриозы.

2. Первое субстратное фосфорилирование, которое начинается с 3-фосфоглицеринового альдегида и кончается 3-фосфоглицериновой кислотой. Окисление альдегида до кислоты связано с освобождением энергии. В этом процессе на каждую фосфотриозу синтезируется одна молекула АТФ.

3. Второе субстратное фосфорилирование, при котором 3-фосфоглицериновая кислота за счет внутримолекулярного окисления отдает фосфат с образованием АТФ.

Поскольку глюкоза – стабильное соединение, на ее активацию необходима затрата энергии, что осуществляется в процессе образования фосфорных эфиров глюкозы в ряде подготовительных реакций. Смысл подготовительного этапа состоит в активации молекулы гексозы за счет

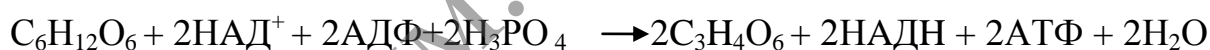
двойного фосфорилирования и перевода в фуранозную форму с последующим распадом на 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) и фосфодиоксиацетона (ФДА). Из-за расщепления молекулы гексозы на две триозы гликолиз иногда называют дихотомическим путем окисления глюкозы.

С 3-ФГА начинается второй этап гликолиза – первое субстратное фосфорилирование. Высокоэнергетическая фосфатная группа с помощью фосфоглицераткиназы передается на АДФ и образуется АТФ. Так как в данном случае высокоэнергетическая ковалентная связь фосфата формируется прямо на окисляемом субстрате, такой процесс получил название *субстратного фосфорилирования*.

Последний этап гликолиза – второе субстратное фосфорилирование. В результате этого фосфорилирования образуется из 3-фосфоглицериновой кислоты фосфоенолпируват – соединение, содержащее высокоэнергетическую фосфатную связь. Таким образом, в результате второго этапа гликолиза образуются АТР и восстановленный НАДН.

Таким образом, в этом случае высокоэнергетическая фосфатная связь формируется на основе того фосфата, который имелся в самом субстрате. Этот фосфат при участии пируваткиназы передается на АДФ и образуется АТФ, а енол-пируват самопроизвольно переходит в более стабильную форму – пируват – конечный продукт гликолиза.

Гликолиз (от глюкозы до пирувата) может быть выражен следующим суммарным уравнением:



### Энергетический выход гликолиза

При окислении одной молекулы глюкозы образуются две молекулы пировиноградной кислоты. При этом за счет первого и второго субстратного фосфорилирования образуются четыре молекулы АТФ. Однако две молекулы АТФ тратятся на фосфорилирование гексозы на первом этапе гликолиза. Таким образом, чистый выход гликолитического субстратного фосфорилирования составляет две молекулы АТФ. Всего в процессе гликолиза (при условии последующего окисления НАДН) образуются восемь молекул АТФ. Поскольку свободная энергия гидролиза одной молекулы АТФ во внутриклеточных условиях составляет около 41,868 кДж/моль (10 ккал), восемь молекул АТФ дают 335 кДж/моль, или 80 ккал. Таков полный энергетический выход гликолиза в аэробных условиях.

### Обращение гликолиза

Возможность обращения гликолиза определяется обратимостью действия большинства ферментов, катализирующих его реакции. Однако реакции фосфорилирования глюкозы и фруктозы, а также реакция образования пировиноградной кислоты из фосфоенолпирувата, осуществляемые с помощью киназ, необратимы. На этих участках процесс обращения идет благодаря использованию обходных путей. Там, где функционируют гексокиназа и фруктокиназа, происходит дефосфорилирование – отщепление фосфатных групп фосфатазами.

### Функции гликолиза в клетке

В аэробных условиях гликолиз выполняет ряд функций:

1. Осуществляет связь между дыхательными субстратами и циклом Кребса.

2. Поставляет на нужды клетки две молекулы АТФ и две молекулы НАДН при окислении каждой молекулы глюкозы (в условиях аноксии гликолиз, по-видимому, служит основным источником АТФ в клетке).

3. Производит интермидиаты, необходимые для синтетических процессов в клетке (например, фосфоенолпируват, необходимый для образования фенольных соединений и лигнина).

4. В хлоропластах гликолитические реакции обеспечивают прямой путь для синтеза АТФ, независимый от постановок НАДФН; кроме того, через гликолиз в хлоропластах запасенный крахмал метаболизируется в триозы, которые затем экспортируются из хлоропласта.

### Цикл Кребса

В анаэробных условиях пировиноградная кислота (пируват) подвергается дальнейшим превращениям в ходе спиртового, молочнокислого и других видов брожений, при этом НАДН используется для восстановления конечных продуктов брожения, регенерируя в окисленную форму. В присутствии достаточного количества кислорода пируват полностью окисляется до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  в дыхательном цикле, получившем название цикла Кребса или цикла ди- и трикарбонавых кислот.

Все участки этого процесса локализованы в матриксе или во внутренней мембране митохондрий.

### Последовательность реакций в цикле Кребса

Еще в 1910 г. шведский химик Т. Тунберг показал, что в животных тканях содержатся ферменты, способные отнимать водород от некоторых органических кислот (янтарной, яблочной, лимонной). В 1935 г. А. Сент-Дьердьи в Венгрии установил, что добавление к измельченной мышечной ткани небольших количеств янтарной, фумаровой, яблочной или

щавелеуксусной кислот резко активизирует поглощение тканью кислорода. Учитывая данные Гунберга и Сент-Дьердьи и исходя из собственных экспериментов по изучению взаимопревращения различных органических кислот и их влияния на дыхание летательной мышцы голубя, английский биохимик Г. А. Кребс в 1937 г. предложил схему последовательности окисления ди- и трикарбоновых кислот до  $\text{CO}_2$  через «цикл лимонной кислоты» за счет отнятия водорода. Этот цикл и был назван его именем. Позднее его работа была удостоена Нобелевской премии.

Непосредственно в цикле окисляется не сам пируват, а его производное ацетил-СоА. Таким образом, первым этапом окислительного расщепления ПВК является процесс образования активного ацетила в ходе окислительного декарбоксилирования. Окислительное декарбоксилирование пирувата осуществляется при участии пируватдегидрогеназного мультиферментного комплекса.

**Цикл Кребса** начинается с взаимодействия ацетил-СоА с енольной формой щавелевоуксусной кислоты. В этой реакции под действием фермента цитратсинтазы образуется лимонная кислота. Далее превращение идет через ряд ди- и трикарбоновых кислот. В результате ЦУК регенерирует в прежнем виде.

Следующий этап цикла включает две реакции и катализируется ферментом аконитазой, или аконитатгидратазой. В первой реакции в результате дегидратации лимонной кислоты образуется *цис*-аконитовая. Во второй реакции аконитатгидратируется и синтезируется изолимонная кислота.

На следующем этапе янтарная кислота окисляется до фумаровой. Реакция катализируется сукцинатдегидрогеназой, коферментом которой является ФАД. Фумаровая кислота под действием фумаразы или фумаратгидратазы, присоединяя  $\text{H}_2\text{O}$ , превращается в яблочную кислоту (малат). И, наконец, на последнем этапе цикла яблочная кислота с помощью НАД-зависимой малатдегидрогеназы окисляется в щавелевоуксусную, ЦУК, которая самопроизвольно переходит в енольную форму, реагирует с очередной молекулой ацетил-СоА, и цикл повторяется снова.

В процессе цикла присоединяются три молекулы воды, выделяются две молекулы углекислого газа. Следует отметить, что большинство реакций цикла обратимы, однако ход цикла в целом практически необратим. Причина этого в том, что в цикле есть две сильно экзергонические реакции – цитратсинтазная и сукцинил-СоА-синтазная.

На протяжении одного оборота цикла при окислении пирувата происходит выделение трех молекул  $\text{CO}_2$ , включение трех молекул  $\text{H}_2\text{O}$  и удаление пяти пар атомов водорода. Роль  $\text{H}_2\text{O}$  в цикле Кребса подтверждает правильность уравнения Палладина, который постулировал, что дыхание идет с участием  $\text{H}_2\text{O}$ , кислород, который включается в окисляемый субстрат, водород с помощью дыхательных пигментов (по современным представлениям – коферментов дегидрогеназ) переносится на кислород.

Выше отмечалось, что цикл Кребса был открыт на животных объектах. Существование его у растений впервые доказал английский исследователь А. Чибнелл (1939). В растительных тканях содержатся все кислоты, участвующие в цикле; обнаружены все ферменты, катализирующие превращение этих кислот; показано, что малонат – ингибитор сукцинатдегидрогеназы – тормозит окисление пирувата и резко снижает поглощение  $O_2$  в процессах дыхания у растений. Большинство ферментов цикла Кребса локализовано в матриксе митохондрий, аконитаза и сукцинатдегидрогеназа – во внутренней мембране митохондрии.

### **Энергетический выход цикла Кребса, его связь с азотным обменом**

Цикл Кребса играет чрезвычайно важную роль в обмене веществ растительного организма. Он служит конечным этапом окисления не только углеводов, но также белков, жиров и других соединений. В ходе реакции цикла освобождается основное количество энергии, содержащейся в окисляемом субстрате, причем большая часть этой энергии не теряется для организма, а утилизируется при образовании высоко энергетических конечных фосфатных связей АТФ.

При окислении глюкозы в процессе дыхания при функционировании гликолиза и цикла Кребса в общей сложности образуются 38 молекул АТФ (8 АТФ связаны с гликолизом). Если принять, что энергия третьей сложноэфирной фосфорной связи АТФ равняется 41,87 кДж/моль (10 ккал/моль), то энергетический выход гликолитического пути аэробного дыхания составляет 1591 кДж/моль (380 ккал/моль), причем, чем основное количество этой энергии – 1256 кДж/моль (300 ккал/моль) – поставляют реакции цикла Кребса. Если учесть, что при полном окислении глюкозы изменения свободной энергии равно 2872 кДж/моль (или 686 ккал/моль), то эффективность использования энергии через гликолиз и ЦТК оказывается весьма высокой:  $380 : 686 \cdot 100 = 55,4 \%$ .

Значение цикла Кребса не исчерпывается его вкладом в энергетический обмен клетки. Не менее важную роль играет то обстоятельство, что многие промежуточные продукты цикла используются при синтезе различных соединений. Следует отметить участие ряда органических кислот в азотном обмене, синтезе и распаде белковых веществ. Для синтеза липидов, полиизопренов, углеводов и ряда других соединений используется ацетил-СоА. Особенно важно, что через реакции цикла Кребса устанавливается тесная связь между обменом трех важнейших групп соединений – белков, жиров и углеводов.

### **Глиоксилатный цикл**

Глиоксилатный цикл можно рассматривать как модификацию цикла Кребса. Этот цикл в 1957 г. был впервые описан у бактерий и плесневых грибов Г. А. Корнбергом и Г. А. Кребсом. Затем оказалось, что он активно

функционирует в прорастающих семенах масличных растений и в других растительных объектах, где запасные жиры превращаются в сахара (глюконеогенез). Глиоксилатный цикл локализован в специализированных микротелах – глиоксисомах. В клетках животных этот цикл отсутствует.

В отличие от цикла Кребса, в глиоксилатном цикле в каждом обороте участвует не одна, а две молекулы ацетил-СоА и этот активированный ацетил используется для синтеза янтарной кислоты. Янтарная кислота выходит из глиоксисом, превращается в ЩУК и участвует в глюконеогенезе (обращенном гликолизе) и других процессах биосинтеза. Глиоксилатный цикл позволяет утилизировать запасные жиры, при распаде которых образуются молекулы ацетил-СоА. Кроме того, на каждые две молекулы ацетил-СоА в глиоксилатном цикле восстанавливается одна молекула НАДН, энергия которой может быть использована на синтез АТФ в митохондриях или на другие процессы.

### **Пентозофосфатный путь окисления глюкозы**

В клетках растений наряду с гликолизом и циклом Кребса, являющимися главным поставщиком свободной энергии в процессах дыхания, существует и другой важнейший способ катаболизма гексоз – пентозофосфатный путь (ПФП), в котором участвуют пятиуглеродные сахара (пентозы). Этот путь дыхания известен также, как гексозомонофосфатный цикл, пентозный шунт или апотомическое окисление. Окисление глюкозы (глюкозо-6-фосфата) по этому пути связана с отщеплением первого (альдегидного) атома углерода в виде  $\text{CO}_2$  (отсюда и название – апотомический путь).

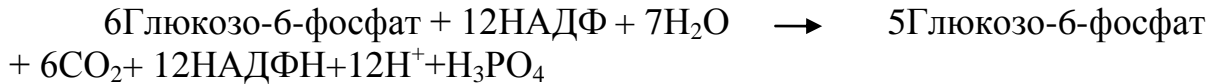
Пентозофосфатный путь дыхания открыт в 1935–1938 гг., в результате исследований О. Варбурга, Ф. Диккенса, В.А. Энгельгардта и позднее Ф. Липмана. Установлено, что все реакции ПФП протекают в растворимой части цитоплазмы клеток, а также в пропластидах и хлоропластах. ПФП дыхания особенно активен в тех клетках и тканях растений, в которых интенсивно идут синтетические процессы, такие, как синтез липидных компонентов мембран, нуклеиновых кислот, клеточных стенок, фенольных соединений. Больные растительные ткани часто окисляют глюкозу ПФП.

### **Этапы пентозофосфатного пути окисления глюкозы**

В ПФП можно выделить два этапа: 1) окисление глюкозы, 2) рекомбинацию сахаров для регенерации исходного субстрата.

Первый, окислительный, этап апотомического пути включает последовательные реакции, катализируемые дегидрогеназно-декарбоксилирующей системой, состоящей из трех ферментов. В результате образуются П-рибулозо-5-фосфат и восстановленный НАДФН. Таким образом, при окислении каждого атома углерода образуется две молекулы НАДФН.

Второй этап связан с регенерацией исходного метаболита – глюкозо-6-фосфата. 6 молекул глюкозо-6-фосфата, участвуя в ПФП дыхания, дают 6 молекул рибулозо-5-фосфата и 6  $\text{CO}_2$ , после чего из 6 молекул рибулозо-5-фосфата регенерирует 5 молекул глюкозо-6-фосфата. Для каждого оборота цикла суммарное уравнение ПФП имеет следующий вид:



### **Энергетический выход ПФП и его роль в обмене веществ**

Универсальным донором водорода для электронтранспортной цепи дыхания служит НАДФ, содержание которого в растительных тканях всегда значительно выше, чем НАДФН. Если бы все 12 пар протонов от НАДФН, которые образуются при полном окислении молекулы глюкозо-6-фосфата по ПФП, были бы переданы через ЭТЦ на  $\text{O}_2$ , то получилось бы  $3 \text{ АТР} * 12 = 36 \text{ АТР}$ , что составляет  $41,868 \text{ кДж} * 36 = 1507 \text{ кДж/моль}$ .

Однако основное назначение ПФП состоит в участии не столько в энергетическом, сколько в пластическом обмене клеток. Это участие в пластическом обмене включает несколько аспектов:

1. НАДФН используется главным образом в различных синтетических реакциях. ПФП служит основным внемитохондриальным и внехлоропластным источником НАДФН, который необходим для синтеза жирных кислот, жиров, изопреноидов, для восстановительного карбоксилирования пирувата, восстановления нитрата и сульфата. НАДФН играет значительную роль и в поддержании восстановленности SH-соединений в клетке, поскольку является первичным восстановителем глутатиона.

2. В ходе пентозофосфатного цикла синтезируются пентозы, входящие в состав нуклеиновых кислот и различных нуклеотидов (пиримидиновых, флавиновых, адениловых и других). Для животных и других гетеротрофных организмов ПФП – единственный способ образования пентоз (рибоз и дезоксирибоз) в клетке. Рибозы необходимы для синтеза АТФ и других нуклеотидов.

3. ПФП имеет большое значение как источник образования углеводов с различным числом углеродных атомов в цепи (от  $\text{C}_3$  до  $\text{C}_7$ ). Эритрозо-4-фосфат, возникающий в ПФП, необходим для синтеза шикимовой кислоты – предшественника многих ароматических соединений, таких, как ароматические аминокислоты, витамины, дубильные и ростовые вещества, лигнин клеточных стенок и др.

4. Компоненты ПФП (рибулозо-1,5-дифосфат, НАДФН) принимают участие в темновой фиксации  $\text{CO}_2$ . По существу ПФП представляет собой фотосинтетический (восстановительный) цикл Кальвина. Только две из 15 реакций цикла Кальвина специфичны для фотосинтеза, остальные участвуют в окислительном ПФП дыхания и гликолизе.

5. В хлоропластах окислительный ПФП функционирует в темноте, предотвращая резкое изменение концентрации НАДФН в отсутствие света. Очень часто на одном из этапов ПП переходит в гликолитический.

### Прямое окисление сахаров

Некоторые организмы способны окислять и нефосфорилированную глюкозу. Этот путь прямого окисления сахаров обнаружен у некоторых бактерий, грибов, животных, а также у фотосинтезирующих морских водорослей. Достоверных сведений о существовании этой системы окисления свободной глюкозы у высших растений пока нет.

Еще в 1904 г. Н. А. Максимов показал, что из мицелия плесневого гриба *Aspergillus niger* может быть выделен ферментный препарат, способный окислять глюкозу в глюконовую кислоту. Реакция сопровождается выделением пероксида водорода, который затем разлагается каталазой или пероксидазой. Первичный продукт окисления – лактон глюконовой кислоты, который, гидратируясь неферментативным путем, превращается в глюконовую кислоту.

Образовавшаяся глюконовая кислота может вовлекаться в дальнейший метаболизм после ее фосфорилирования с образованием 2-кето-3-дезоксиглюконовой кислоты. Последняя распадается на две триозы – пировиноградную кислоту и 3-фосфоглицериновый альдегид, которые через пировиноградную кислоту могут окисляться в цикле Кребса. Такой путь до пирувата был открыт Н. Энтнером и М. Дудоровым (1952) для бактерии рода *Pseudomonas*. Путь Энтнера – Дудорова сближает два пути дыхания ПФП и ЦТК – через пируват. Взаимодействие этих трех путей дыхания можно представить в виде схемы (рисунок 3.1), которой через пируват устанавливается связь с циклом Кребса, а через глюконовую кислоту и 3-фосфоглицериновый альдегид – с ПФП, минуя сахара с 4, 5 и 7 атомами углерода.



Рисунок 3.1. – Взаимодействие различных путей диссимиляции глюкозы

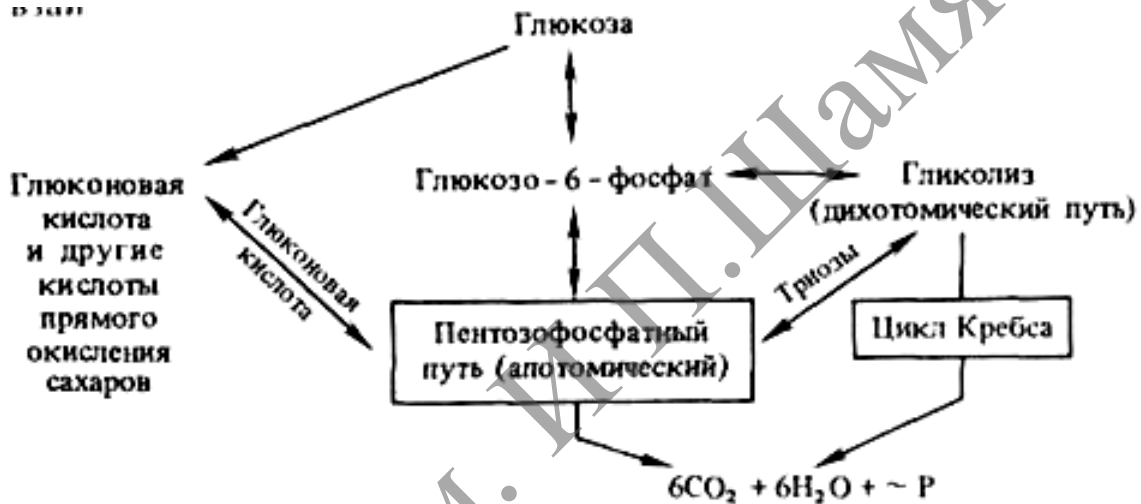


Если в процессе дыхания напрямую окислению подвергаются и другие сахара, кроме глюкозы, то образуется целое семейство кислот, названных кислотами прямого (первичного) окисления сахаров.

В тканях высших растений С. В. Солдатенков с сотрудниками обнаружил ряд кислот первичного окисления сахаров, имеющих в своем составе 4, 5, 6 и 7 углеродов (тетроновая, гентоновая и др.). Введенные в растительные клетки, эти кислоты используются в процессе дыхания. Из глюкуроновой и галактуриноновой кислот в клетках может образоваться аскорбиновая кислота (витамин С).

### Взаимосвязь различных путей диссимилиации глюкозы

Дыхательные циклы – гликолиз и цикл ди- и трикарбоновых кислот, ПФП и прямое окисление сахаров – система взаимосвязанных процессов. Ниже представлена схема этих взаимосвязей:



В клетке гликолиз и ПФП пространственно не отделены друг от друга. Эти процессы протекают в растворимой части цитоплазмы, в пропластидах и в хлоропластах. Они имеют общие субстраты – глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат и 3-фосфоглицериновый альдегид. В норме доля пентозофосфатного цикла в общем дыхательном обмене составляет 10–40% и варьирует в зависимости от типа ткани и ее функционального состояния. В анаэробных условиях гликолиз доминирует над ПФП. Однако в хлоропластах активность окислительного апотомического пути намного выше по сравнению с гликолизом. В цитоплазме большая часть продуктов ПФП метаболизируется через гликолиз.

Активность ПФП увеличивается при неблагоприятных условиях: засухе, калийном голодании, инфекции, затенении, засолении, при старении. Скорость окисления НАДФН или подавляющее действие продуктов одного пути дыхания на реакцию другого играют существенную роль в регуляции соотношения различных дыхательных циклов.

### Дыхательная электронтранспортная цепь и окислительное фосфорилирование

Цикл Кребса, глиоксилатный и пентозофосфатный пути функционируют только в условиях достаточного количества кислорода. В то же время  $O_2$  непосредственно не участвует в реакции этих циклов.

Кислород необходим для заключительного этапа дыхательного процесса, связанного с окислением восстановленных коферментов НАДН и ФАДН<sub>2</sub> в дыхательной электронтранспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. С переносом электронов по ЭТЦ сопряжен и синтез АТФ.

Дыхательная ЭТЦ, локализованная во внутренней мембране митохондрий, служит для передачи электронов от восстановленных субстратов на кислород, что сопровождается трансмембранным переносом ионов  $H^+$ . Таким образом, ЭТЦ митохондрий (как и тилакоидов) выполняет функцию окислительно-восстановительной  $H^+$ -помпы.

Д. Грин (1961) пришел к выводу, что все переносчики электронов в митохондриальной мембране сгруппированы в четыре комплекса, что было подтверждено дальнейшими исследованиями.

Согласно современным данным, дыхательная цепь митохондрий включает в себя четыре основных мультиэнзимных комплекса и два небольших по молекулярной массе компонента – убихинон и цитохром (рисунок 3.2)

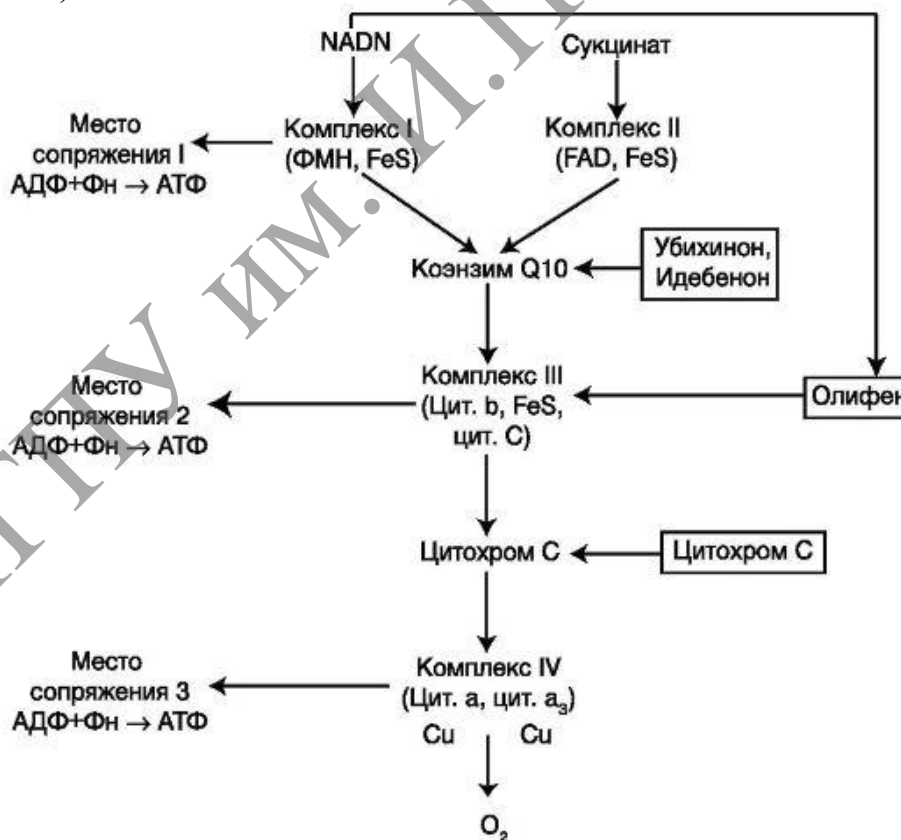


Рисунок 3.2. – Дыхательная электронно-транспортная цепь растительных митохондрий

**Комплекс 1** осуществляет перенос электронов от НАДН к убихинону Q. Его субстратом служат молекулы внутри-митохондриального НАДН, восстанавливающиеся в цикле Кребса. В состав комплекса входит флавиновая ФМН-зависимая НАДН: убихинон-оксидоредуктаза, содержащая три железосерных центра ( $\text{FeS}_{\text{N1-3}}$ ). При встраивании в искусственную фосфолипидную мембрану этот комплекс функционирует как протонная помпа.

**Комплекс 2** катализирует окисление сукцинат-убихиноном. Эту функцию осуществляют флавиновая (ФАД-зависимая) сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза, в состав которой также входят три железосерных центра ( $\text{Fe}_{\text{s1-3}}$ ).

**Комплекс 3** переносит электроны от восстановленного убихинона к цитохрому *c*, т.е. функционирует как убихинон: цитохром *c*-оксидоредуктаза. В своем составе он содержит цитохромы  $b_{556}$  и  $b_{560}$ , цитохром  $c_1$  и железосерный белок Рискс. По структуре и функции этот комплекс сходен с цитохромным комплексом  $b_6-f$  тилакоидов хлоропластов. В присутствии убихинона комплекс 3 осуществляет активный трансмембранный перенос протонов.

В терминальном **комплексе 4** электроны переносятся от цитохром *c* к кислороду, т.е. этот комплекс является цитохром *c*: кислород-оксидоредуктазой (цитохромоксидазой). В его состав входят четыре редокс-компонента: цитохромы *a* и  $a_3$  и два атома меди. Цитохром  $a_3$  и  $\text{Cu}_B$  способны взаимодействовать с  $\text{O}_2$ , на который передаются электроны с цитохрома *a*- $\text{Cu}_A$ . Транспорт электронов через комплекс 4 сопряжен с активным транспортом ионов  $\text{H}^+$ . Взаимодействие цитохрома  $a_3 - \text{Cu}_B$  с  $\text{O}_2$  подавляется цианидом, азидом и CO.

Таким образом, из матрикса митохондрии при транспорте каждой пары электронов от НАДН к  $\frac{1}{2}\text{O}_2$  в трех участках ЭТЦ (комплексы 1, 3, 4) через мембрану наружу переносятся по крайней мере 6 протонов. Как будет показано далее, именно в этих трех участках окислительные процессы в ЭТЦ сопрягаются с синтезом АТФ.

Особенностью растительных митохондрий (отличающей их от митохондрий животных) является способность окислять экзогенный НАДН, т.е. НАДН поступающий из цитоплазмы.

Другое существенное отличие растительных митохондрий состоит в том, что во внутренней мембране помимо основного (цитохромного) пути переноса электронов имеется альтернативный путь переноса  $e^-$ , устойчивый к действию цианида.

### Окислительное фосфорилирование

Перенос электронов от НАДН к молекулярному кислороду через ЭТЦ митохондрий сопровождается потерей свободной энергии. Какова судьба этой энергии? Еще в 1931 году В. А. Энгельгардт показал, что при аэробном дыхании накапливается АТФ. Он первый высказал идею о сопряжении между фосфорилированием АДФ и аэробным дыханием.

В 1937–1939 гг. биохимики В. А. Белицер в СССР и Г. Калькар в США установили, что при окислении промежуточных продуктов цикла Кребса, в частности янтарной и лимонной кислот, суспензиями животных тканей исчезает неорганический фосфат и образуется АТФ. В анаэробных условиях или при подавлении дыхания цианидом такого фосфорилирования не происходит. Процесс фосфорилирования АДФ с образованием АТФ, сопряженный с переносом электронов по ЭТЦ митохондрий, получил название *окислительного фосфорилирования*.

По поводу механизма окислительного фосфорилирования существуют три теории: химическая, механохимическая (конформационная) и хемиосмотическая.

#### **Химическая и механохимическая гипотезы сопряжения**

Согласно химической гипотезе, в митохондриях имеются интермедиаторы белковой природы (X, Y, Z), образующие комплексы с соответствующими восстановленными переносчиками. В результате окисления переносчика в комплексе возникает высокоэнергетическая связь. При распаде комплекса к интермедиатору с высокоэнергетической связью присоединяется неорганический фосфат, который затем передается на АДФ.

Гипотеза химического сопряжения не объясняет, почему окислительное фосфорилирование обнаруживается только в препаратах митохондрий с ненарушенными мембранами. С позиции этой гипотезы не находит объяснения способность митохондрий подкислять внешнюю среду и изменять свой объем в зависимости от степени их энергизации.

Способность митохондриальных мембран к конформационным изменениям и связь этих изменений со степенью энергизации митохондрий послужила основой для создания механохимических гипотез образования АТФ в ходе окислительного фосфорилирования. Согласно этим гипотезам, энергия, высвобождающаяся в процессе переноса электронов, непосредственно используется для перевода белков внутренней мембраны митохондрий в новое, богатое энергией конформационное состояние, приводящее к образованию АТФ.

Таким образом, согласно механохимическим гипотезам, энергия окисления превращается сначала в механическую энергию, а затем в энергию высокоэнергетической связи АТФ. Однако, подобно химической теории сопряжения, механохимические гипотезы также не могут объяснить подкисление митохондриями окружающей среды.

#### **Хемиосмотическая теория сопряжения**

В настоящее время наибольшим признанием пользуется хемиосмотическая теория английского биохимика П. Митчелла (1961). Он высказал предположение, что поток электронов через систему молекул переносчиков сопровождается транспортом ионов  $H^+$  через внутреннюю мембрану митохондрий. В результате на мембране создается электрохимический потенциал ионов  $H^+$ , включающий химический, или

осмотический, градиент (рН) и электрический градиент (мембранный потенциал). Согласно хемиосмотической теории, электрохимический трансмембранный потенциал ионов  $H^+$  и является источником энергии для синтеза АТФ за счет обращения транспорта ионов  $H^+$  через протонный канал мембранной  $H^+$ -АТФазы.

Теория Митчелла исходит из того, что переносчики перешнуровывают мембрану, чередуясь таким образом, что в одну сторону возможен перенос и электронов, и протонов, а в обратную – только электронов. В результате ионы  $H^+$  накапливаются на одной стороне мембраны.

За прошедший период хемиосмотическая гипотеза Митчелла получила целый ряд экспериментальных подтверждений. Одним из доказательств роли протонного градиента в образовании АТФ при окислительном фосфорилировании может служить разобщающее действие на этот процесс некоторых веществ.

Известно, что 2,4-динитрофенол подавляет синтез АТФ, но стимулирует транспорт электронов (поглощение  $O_2$ ), т. е. разобщает дыхание и фосфорилирование. П. Митчелл предположил, что такое действие 2,4-ДНФ связано с тем, что он переносит протоны через мембрану и поэтому разряжает ее. Это предположение полностью подтвердилось. Оказалось, что разные по своей химической природе вещества, разобщающие окисление и фосфорилирование, сходны в том, что, во-первых, они растворимы в липидной фазе мембраны, а во-вторых, это слабые кислоты, т. е. легко приобретают и теряют протон в зависимости от рН среды.

В 1973 г. Э. Рэкеру (США) удалось получить липосомы (везикулы из фосфолипидов), в которые была встроена АТФаза, выделенная из митохондрий сердца быка, и хромопротеин галофильной бактерии – бактериородопсин, обуславливающий создание протонного градиента за счет энергии света. Фосфолипиды для реконструкции мембран этих липосом были выделены из растений (соевые бобы). Полученные таким образом гибридные пузырьки на свету осуществляли фосфорилирование.

### **Эндогенные механизмы регуляции дыхания у растений**

Регуляция процессов дыхания осуществляется на разных уровнях. Прежде всего, это субстратный контроль дыхания: доступность, количество и состав дыхательных субстратов.

На активность ферментов сильно влияют физико-химические условия в клетке (сдвиги рН, состава и концентрации ионов и др.). Фитогормоны действуют на дыхательные процессы через активацию или ингибирование функциональной активности клеток или синтеза белков. Синтез определенных оксидоредуктаз находится под контролем генома и происходит в соответствии с функциональным состоянием клеток и программой развития.

### **Регуляция процессов дыхания. Эффект Пастера**

Уровень  $O_2$  в тканях влияет не только на интенсивность дыхания, но определяет и величину расходования дыхательных субстратов, на что впервые обратил внимание Л. Пастер. В его опытах с дрожжами в присутствии  $O_2$  снижались распад глюкозы и интенсивность брожения, но одновременно наблюдался интенсивный рост биомассы дрожжей вследствие усиления использования сахаров при синтетических процессах. Торможение распада сахаров и более эффективное их использование в присутствии кислорода получило название «эффекта Пастера».

Механизм эффекта Пастера состоит в том, что в присутствии  $O_2$  интенсивно идущий процесс окислительного фосфорилирования конкурентно уменьшает количество молекул АДФ вступающих в гликолиз. По этой причине, а также из-за тормозящего действия АТФ на фосфофруктокиназу, скорость процессов гликолиза в присутствии  $O_2$  снижается. Избыток АТФ может способствовать и ресинтезу глюкозы из части молекул пирувата, образующегося в ходе гликолиза. Без кислорода не функционируют цикл Кребса и ПФП, и, следовательно, клетки не получают многих промежуточных соединений, необходимых для синтеза клеточных структур. В присутствии  $O_2$  все эти циклы работают. Увеличение концентрации молекул АТФ в условиях аэробноза также способствует синтетическим процессам.

Возрастание функциональной активности клеток сопровождается усилением дыхания. В значительной степени это достигается благодаря *механизму дыхательного контроля*, или *акцепторного контроля дыхания*. Дыхательным контролем называют зависимость скорости потребления  $O_2$  митохондриями от концентрации АДФ, который служит акцептором фосфата при окислительном фосфорилировании.

### **Регуляция гликолиза**

Интенсивность гликолиза контролируется в нескольких участках. Вовлечение глюкозы в процесс гликолиза регулируется на уровне фермента гексокиназы по типу обратной связи: избыток продукта реакции (глюкозо-6-фосфат) аллостерически подавляет деятельность фермента.

Высокие концентрации АТФ подавляют активность пируваткиназы, снижая сродство фермента к фосфоенолпирувату. Пируваткиназа подавляется также ацетил-СоА.

### **Регуляция цикла Кребса**

При малой энергетической потребности клетки дыхательным контролем тормозится работа дыхательной цепи, а следовательно, реакций ЦТК и образований интермедиатов цикла, в том числе оксалоацетата, вовлекающего ацетил-СоА в цикл Кребса. Это приводит к большему использованию ацетил-СоА в синтетических процессах, которые также потребляют энергию.

Особенностью регуляции ЦТК является зависимость всех четырех дегидрогеназ цикла (изоцитратдегидрогеназы,  $\alpha$ -кетоглутарат-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы) от отношения  $[НАДН] / [НАД^+]$ .

Регулирующую роль может играть также альтернативный путь транспорта электронов в растительных митохондриях.

### **Регуляция ПФП и глиоксилатного цикла**

Пентозофосфатный путь окисления регулируется концентрацией  $НАДФ^+$ , а также уровнем синтезов в клетке, потребляющих НАДФН (например, синтезом аминокислот и белков).

Активность глиоксилатного цикла снижается при повышении концентрации оксалоацетата, который ингибирует сукцинатдегидрогеназу ЦТК. Другой ингибитор цикла – фосфоенолпируват подавляет активность изоцитратлиазы.

### **Экологические и онтогенетические аспекты дыхания**

Концентрация  $O_2$ . Процесс дыхания связан с непрерывным потреблением кислорода клетками и тканями растений. В то же время окислительные превращения субстратов при дыхании включают не только аэробные, но и анаэробные процессы (гликолиз, брожение). Поэтому интересен тот факт, что при снижении парциального давления  $O_2$  с 21 до 9 % интенсивность дыхания тканей растений меняется незначительно. При 5 %  $O_2$  у молодых растений начинает несколько снижаться поглощение  $O_2$  и в меньшей степени изменяется выделение  $CO_2$ .

### **Зависимость дыхания от факторов внешней и внутренней среды**

Эти факты можно объяснить как тем, что в эволюции дыхательные системы растений формировались в низкокислородных условиях, так и тем, что возможность функционирования аэробной дыхательной цепи при низких парциальных давлениях.  $O_2$  – один из важных адаптивных признаков, элемент надежности энергетики растения. Это тем более важно, что газовый состав внутренних тканей органов растений может отличаться от атмосферного. Так, в листовой паренхиме сахарной свеклы содержание  $O_2$  меняется в течение суток от 7,1 до 17,4 %, а  $CO_2$  – от 0,9 % до 5,1 %; в мякоти зрелых яблок содержится 7,5 %  $CO_2$  и 13,9 %  $O_2$ , а плодов лимона 8,5 %  $CO_2$  и 11,5 %  $O_2$ .

У растений, обитающих в условиях систематического затопления (болотные и др.), существует ряд приспособлений к перенесению недостатка кислорода: развитие аэренхимы, способность использовать кислород нитратов «нитратное дыхание», различные способы устранения избытка продуктов брожения (этанола, молочной кислоты), а также механизмы их использования на нужды обмена веществ.

**Диоксид углерода.** Повышение концентрации  $\text{CO}_2$  как конечного продукта дыхания приводит к снижению интенсивности дыхания. При повышении концентрации  $\text{CO}_2$  тормозятся реакции декарбоксилирования и активность сукцинатдегидрогеназы и, следовательно, уменьшаются выделение  $\text{CO}_2$  и дыхательный коэффициент. При этом наблюдается закисление тканей – ацидоз, что может приводить к вредным последствиям.  $\text{CO}_2$  хорошо растворяется в липидах и таким образом может воздействовать на мембраны. По-видимому, он обладает некоторым наркотическим действием. Предполагается, что  $\text{CO}_2$  способен регулировать метаболизм растений в анаэробных условиях. У листьев ингибирующее действие высоких концентраций  $\text{CO}_2$  на дыхание может быть связано с закрыванием устьиц в этих условиях. Повышенное содержание  $\text{CO}_2$  в тканях семян, покрытых плотной оболочкой, – один из способов поддержания состояния покоя.

**Температура.** Дыхание, подобно другим ферментативным процессам, зависит от температуры. В интервале температур от 0 до 20 °C  $Q_{10}$  дыхания равен 2–3. При температурах выше 20 °C  $Q_{10}$  может понижаться. Одна из причин этого – уменьшение растворимости  $\text{O}_2$  в жидкостях при повышении температуры. Эффект температуры проявляется обычно вместе с другими факторами. Например, в условиях высокой температуры сильнее подавляется дыхание при пониженном содержании  $\text{O}_2$  или повышенной концентрации  $\text{CO}_2$  и т.д.

Для дыхания каждого вида растений и его органов существуют определенные минимальные (когда дыхание еще возможно), оптимальные и максимальные температуры. В отличие от фотосинтеза дыхание у зимующих растений наблюдается при очень низких температурах (у хвой, ели и сосны при – 25 °C). Температурный оптимум его у большинства видов умеренных широт лежит в пределах 35–40 °C, т. е. на 510 °C выше, чем для фотосинтеза.

При рассмотрении влияния на дыхание крайних температур важно учитывать продолжительность действия этого неблагоприятного фактора. Так, при кратковременных экспозициях (30 мин) температурный оптимум дыхания листьев гречихи сахалинской может быть очень высок (меньше 47 °C), тогда как при двухчасовом действии оптимум смещается к 44 °C, при шестичасовом – до 42 °C.

**Водный режим.** Изменение оводненности тканей растения отражается на интенсивности дыхания. В листьях проростков при быстрой потере воды вначале отмечается усиление дыхания – обычная кратковременная реакция на раздражение. При постепенном снижении оводненности этого не происходит.

Необходимость определенной степени оводненности ткани для процесса дыхания отчетливо проявляется при изучении дыхания семян. При влажности семян 10–11 % дыхание ничтожно мало. При повышении



влажности семян до 14–15 % дыхание возрастает в 4–5 раз, а при дальнейшем повышении оводненности семян до 30–35 % дыхание увеличивается в тысячи раз. При этом важную роль играет температура, при которой хранятся семена: при 0–10°C влияние влажности на интенсивность дыхания значительно меньше, чем при 18–25°C. Резкий подъем дыхания набухших семян сопровождается значительным выделением тепла, что может привести к их перегреву (самовозгорание) при хранении.

Реакция растительных тканей на потерю воды зависит также от возраста, физиологического состояния, экологической принадлежности организма.

**Свет.** Действие света на дыхание зеленых органов растений из-за методических трудностей изучено недостаточно, т. к. одновременно с дыханием в них осуществляется фотосинтез. Освещенность, при которой интенсивность фотосинтеза равна интенсивности дыхания (по уровню поглощенного и выделенного  $\text{CO}_2$ ), называется *компенсационным пунктом*.

**Минеральные вещества.** Добавление раствора солей в воду, на которой выращивают проростки, обычно усиливает дыхание корней. Этот эффект получил название «солевого дыхания».

**Повреждения и механические воздействия.** Механические воздействия, например на листьях, вызывают кратковременное усиление поглощения  $\text{O}_2$  (от нескольких минут до часа).

При этом надавливание влияет мало, изгибание – сильнее и очень сильно – срезание. Поранение (нарушение целостности тканей) может стимулировать поглощение  $\text{O}_2$  по крайней мере по трем причинам: 1) из-за быстрого окисления фенольных клеток и других веществ, которые становятся доступными для соответствующих оксидаз; 2) в связи с увеличением количества субстратов для дыхания; 3) вследствие активации процессов восстановления мембранного потенциала и повреждённых клеточных структур.

**Изменение интенсивности дыхания в онтогенезе.** Наиболее высокой интенсивностью дыхания обладают молодые органы и ткани растений, находящиеся в состоянии активного роста. Пока молодой лист развёртывается и увеличивает свою площадь, интенсивность дыхания нарастает. Повышение интенсивности дыхания прекращается, когда заканчивается рост листа.

Цветение и плодоношение сопровождаются усилением дыхания развивающихся цветков и плодов, что связано с образованием новых органов и тканей, обладающих высоким уровнем обмена веществ.

В период, предшествующий полному созреванию сочных плодов (размягчению), наблюдается значительное кратковременное (на 2–3 дня) усиление дыхания тканей плода, после чего продолжается неуклонное падение поглощения  $\text{O}_2$ .

Таким образом, активность дыхательных систем изменяется в соответствии с потребностями процессов роста и развития растения.

Дыхание необходимо для освобождения химической энергии окисляемых субстратов. В реакциях гликолиза (анаэробного этапа дыхания) и дыхательных циклов (цикл ди - и трикарбоновых кислот, пентозофосфатный цикл) восстанавливаются коферменты, которые затем окисляются кислородом воздуха в электротранспортной цепи митохондрий (НАДН, ФАДН<sub>2</sub>) или используются для синтетических процессов (преимущественно НАДФН). Энергия дыхания, помимо восстановленных коферментов, запасается в форме АТФ в результате субстратного и окислительного фосфорилирования. Последнее осуществляется с участием Н<sup>+</sup>-помпы.

Субстратом дыхания является главным образом глюкоза, но могут использоваться также аминокислоты и жиры. Жиры утилизируются с участием глиоксилатного цикла, локализованного в глиоксисомах. Промежуточные метаболиты всех дыхательных циклов необходимы для синтеза разнообразных веществ, входящих в состав клетки.

У растений имеются и другие пути окисления субстратов: альтернативный путь в митохондриях, окисление с участием полифенолоксидазы, аксорботоксидазы, флавопротеиновый оксидаз, пероксидаз и оксигеназ. Эти процессы не связаны с запасанием энергии.

## 3.2. Практическая часть

### 3.2.1. Определение интенсивности дыхания по количеству выделенного диоксида углерода (по Бойсен-Иенсену)

**Цель работы:** ознакомиться с методикой определения интенсивности дыхания по Бойсен-Иенсену.

**Объекты:** проросшие и непроросшие семена пшеницы.

**Материалы и оборудование:** 0,1 н раствор NaOH или KOH (0,02 н раствор Ba(OH)<sub>2</sub>; 0,1 н раствор HCl; колбы с пробками; фенолфталеин; конические колбы на 250–300 мл с резиновыми пробками (пробки с металлическими крючками – 3 шт.); марлевые мешочки 6 x 6 см; приспособления для титрования.

#### Краткие сведения

Дыхание – один из важнейших биологических процессов. Он сопровождается обменом кислорода и углекислого газа с окружающей средой.

Для характеристики дыхательного газообмена используются различные методы регистрации O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>: полярографический метод с использованием кислородного электрода, потенциометрический и манометрический методы. Полярографический и потенциометрический методы основаны на измерении скорости поглощения O<sub>2</sub> проростками с использованием электродов. Подробнее рассмотрим манометрический

метод, к которому также относится метод Бойсен-Иенсена.

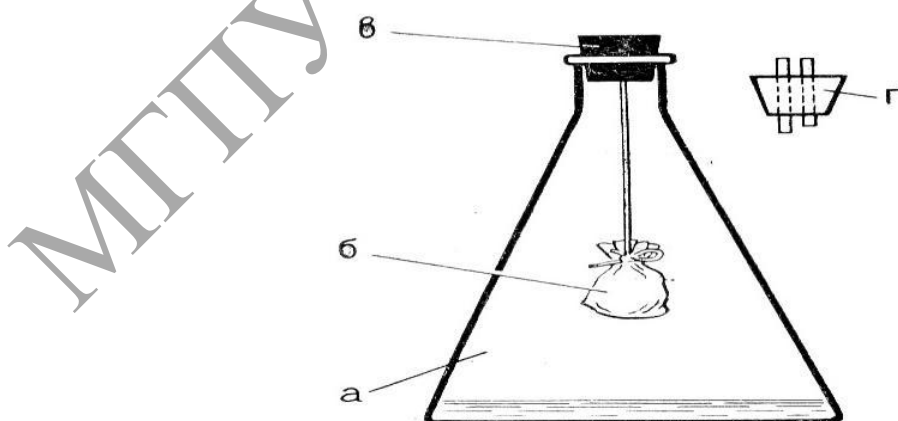
Манометрия как метод отличается высокой чувствительностью и заключается в регистрации изменений количества газа  $\text{CO}_2$  с помощью прибора Варбурга и респирометра. Принцип их заключается в следующем. В замкнутый сосуд, соединенный с манометром, помещаются изучаемый объект и небольшой сосуд со щелочью. В процессе дыхания растения количество  $\text{O}_2$  в сосуде будет постепенно уменьшаться. В то же время выделяемый углекислый газ быстро связывается щелочью, давление в сосуде по сравнению с внешним будет снижаться и жидкость в колене манометрической трубки, сообщающейся с сосудом, начнет подниматься. Объем выделенного  $\text{CO}_2$  учитывают по разнице показаний манометров в опытном и контрольном (вместо щелочи взята вода) сосудах. Далее рассчитывают отношение выделенного  $\text{CO}_2$  к единице веса ткани в единицу времени.

Метод Бойсен-Иенсена основан на учете выделенного при дыхании  $\text{CO}_2$  путем титрования. Растение помещают в замкнутый сосуд, на дно которого налита щелочь.  $\text{CO}_2$ , выделяемый при дыхании, связывается со щелочью. Остаток свободной щелочи титруют соляной кислотой. Чем выше интенсивность дыхания, тем больше выделится  $\text{CO}_2$ , связываемого щелочью, и меньше кислоты пойдет на титрование.

**Ход работы.** Перед опытом три конические колбы в течение 15 минут держат открытыми. Одна колба – контрольная – служит для определения исходного содержания  $\text{CO}_2$  в воздухе, две другие – опытные – для определения интенсивности дыхания объектов, согласно вариантам задачи.

Во все три колбы налить по 20 мл 0,1 н щелочи или 0,02 н  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  и добавляют 2–3 капли фенолфталеина.

Взвесить навески материала (по 3–4 г) и поместить их в марлевые мешочки. Мешочки опустить в опытные колбы – в каждую по мешочку и подвесить на крючок, ввинченный в пробку; при этом не допускать прикосновения мешочка к раствору или стенке колбы (рисунок 3.3).



**а** – колба со щелочью; **б** – марлевый мешочек с семенами; **в** – пробка с крючком;  
**г** – пробка со стеклянными трубками (используется при титровании)

**Рисунок 3.3.** – Прибор для определения интенсивности дыхания



**Контрольные вопросы**

1. Дать определение интенсивности дыхания.
2. Какие методы определения дыхания вам известны? Какие из них можно использовать для демонстрации дыхания в средней школе?
3. Какова зависимость дыхания от видовой специфики растений, органа, ткани?
4. Как изменяется интенсивность дыхания в онтогенезе органа, растения в целом?
5. Какова зависимость дыхания от внешних факторов: температуры, содержания влаги в тканях растений?

**3.2.2. Определение дыхательного коэффициента злаков и бобовых растений**

**Цель работы:** ознакомиться с понятием «дыхательный коэффициент» и с методикой его определения.

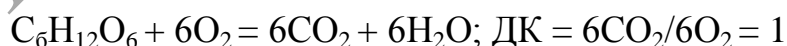
**Объекты:** наклюнувшиеся семена бобовых растений.

**Материалы и оборудование:** 20 % раствор КОН или NaOH; вода, подкрашенная метиленовым синим; пробирка с резиновой пробкой, в которую вставлена изогнутая под углом 90° тонкая стеклянная трубка, горизонтальное колено трубки градуируют, прикрепляя к ней при помощи резиновых колечек полоску миллиметровой бумаги; высокий (по длине пробирки) стакан с ватой, в котором сделано углубление для пробирки; песочные часы на 5 мин, фарфоровая чашечка, пинцет, фильтровальная бумага 2 x 6 см, пипетки с оттянутым носиком.

**Краткие сведения**

Дыхательным коэффициентом (ДК) называется отношение выделенного при дыхании количество углекислого газа к количеству поглощенного кислорода. Величина ДК зависит прежде всего от природы окисляемого субстрата.

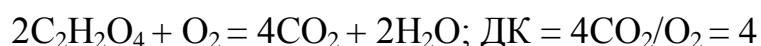
При окислении углеводов, например гексоз ДК = 1:



Если субстратом дыхания являются более бедные  $O_2$  (по сравнению с углеводами) жирные кислоты, то  $\text{ДК} < 1$ . Например, окисление стеариновой кислоты:



При окислении органических кислот, например щавелевой кислоты,  $\text{ДК} > 1$ :



Величина ДК зависит от снабжения тканей  $O_2$ . При его недостатке (например, в меристеме кончиков корней, в семенах с плотными оболочками, при затоплении корней и т. д.) усиливается брожение и ДК возрастает. Если в результате недоокисления продуктов в тканях накапливаются органические кислоты, то ДК падает.

Таким образом, величина ДК зависит от количества кислорода, поступающего к тканям, от состояния организма и фазы его онтогенеза.

Определение ДК разных тканей растений показывает, что в нормальных условиях он близок к 1. Следовательно, растение вначале использует в качестве дыхательного материала углеводы. При недостатке углеводов могут быть использованы другие субстраты. Например, если взять проросшие семена, которые в качестве запасного питательного вещества используют жиры или белки, ДК становится меньше 1. При использовании в качестве субстрата дыхания жиров происходит их расщепление до глицерина и жирных кислот. Жирные кислоты могут быть превращены в углеводы через глиоксилатный цикл. Использованию белков в качестве субстрата дыхания предшествует их расщепление до аминокислот. Хорошим объектом определения ДК являются прорастающие семена, содержащие белки, жиры или углеводы.

Для определения ДК исследуемый материал помещают в пробирку, соединенную с трубкой, к которой присоединяется измерительная шкала из миллиметровой бумаги, в которую введена капля окрашенной жидкости (рисунок 3.4).

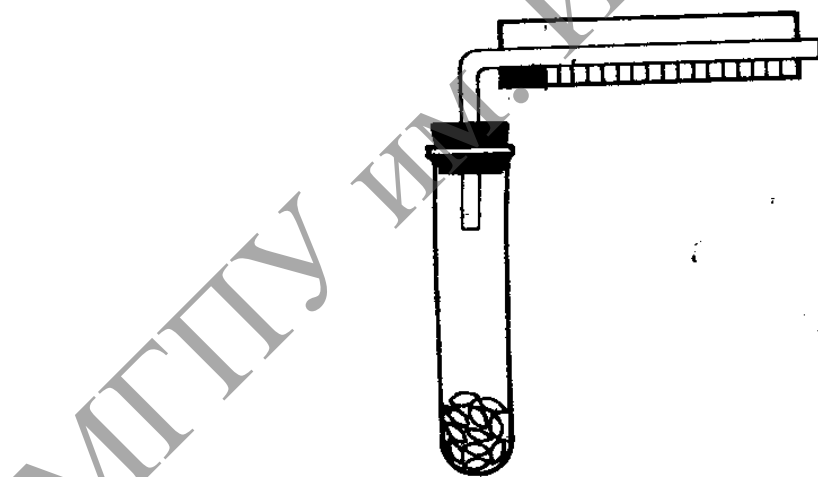


Рисунок 3.4. – Установка для определения дыхательного коэффициента

Если объемы поглощенного  $O_2$  и выделенного  $CO_2$  равны, то капля в трубке передвигаться не будет. Если же величина ДК меньше или больше 1, то будет наблюдаться перемещение капли в трубке. При  $ДК < 1$  капля будет перемещаться в сторону пробирки, при  $ДК > 1$ , капля перемещается от пробирки к концу трубки.

Прибор должен находиться в стабильных температурных условиях.

Для этого во время опыта пробирку ставят в стакан с ватой. Данный метод дает хорошие сравнительные результаты.

**Ход работы.** Поместить в пробирку (примерно до половины) наклюнувшиеся семена пшеницы закрыть ее пробкой, в которую вставлена изогнутая градуированная трубка. Но прежде ввести в трубку каплю воды, подкрашенной метиленовым синим, для этого погрузить наружный конец трубки в окрашенный раствор, зажать пальцем противоположный конец и вставить, держа трубку горизонтально, в пробирку (рисунок 3.2).

Во время опыта обязательно поддерживать постоянную температуру. Для этого поставить прибор в колбу и не нагревать руками.

Отметить положение внутреннего мениска капли и засечь время по секундомеру. После пятиминутной экспозиции измерить расстояние, пройденное каплей, и сделать второй отсчет, а еще через 5 минут – третий.

Вычислить среднее расстояние, пройденное каплей за 5 минут (А), которое соответствует разности между объемами поглощенного кислорода и выделенной углекислоты.

Открыть пробку с семенами и вложить в нее пинцетом свернутую в кольцо полоску фильтровальной бумаги, смоченную 20 %-ным раствором едкого натра. Закрыть пробирку пробкой с трубкой с каплей окрашенной жидкости. Отметить положение мениска при пятиминутных интервалах и вычислить среднюю величину (В). Обозначить объем поглощенного кислорода через В, т. к. весь выделяемый диоксид поглощается щелочью, а объем выделенной углекислоты определять через А, как разницу между поглощенным  $O_2$  и выделенным  $CO_2$ .

Зная величины А и В, найти дыхательный коэффициент:

$$A = O_2 - CO_2; B = O_2; CO_2 = B - A$$

Отсюда дыхательный коэффициент:  $DK = CO_2 / O_2 = (B - A) / B$

Повторить тот же опыт с проросшими семенами гороха.

### Задания

1. Результаты оформите в таблицу.
2. Сделать вывод о зависимости величины дыхательного коэффициента от характера окисляемых веществ.

Таблица 3.2. – Определение дыхательного коэффициента

Условия опыта	Отсчеты, мм, за 5 мин				ДК
	1	2	3	ср	
Без щелочи (А)					
Со щелочью (В)					

### Контрольные вопросы

1. Какие вещества и в какой форме могут быть использованы в качестве субстрата дыхания?
2. Что такое дыхательный коэффициент?
3. Какова зависимость ДК от природы окисляемого субстрата?
4. Как по величине ДК можно судить об энергетической эффективности субстрата дыхания?

### 3.2.3. Потеря сухого вещества при проращении семян

**Цель работы:** убедиться, что в процессе дыхания расходуются запасенные ранее органические вещества.

**Объекты:** семена гороха.

**Материалы и оборудование:** весы; разновес; опилки листовенного дерева, прокипяченные с водой и отжатые для удаления экстрактивных веществ; тарелка; сушильный шкаф; эксикатор; бюкс; стаканы (2 шт.), один из них снабжен этикеткой; фильтровальная бумага; кристаллизатор.

#### Краткие сведения

Дыханием называют биологическое окисление органических веществ до диоксида углерода и воды, происходящее с освобождением энергии. Этот процесс может быть выражен следующим суммарным уравнением:



Интенсивность дыхания определяют, измеряя количество поглощенного клетками кислорода или выделенного диоксида углерода, или окисленного органического вещества. Наиболее удобный объект для учета количества израсходованных на дыхание органических веществ – прорастающие семена. Проращивание ведут в темноте на влажных опилках, т. е. в условиях, исключающих возможность как почвенного, так и воздушного питания. По истечении определенного времени проростки высушивают и взвешивают. Для определения исходной сухой массы необходимо использовать другую порцию таких же семян, поскольку высушивание при высокой температуре убивает зародыши и делает семена невсхожими.

Семена рекомендуется высушивать в течение 2 ч при 130 °С, так как при этой температуре полностью разрушаются белковые глобулы и освобождается заключенная в глобулах иммобилизованная вода. Свежий растительный материал (листья, проростки и пр.) можно довести до абсолютно сухого состояния при 100–105 °С.

**Ход работы.** Поместить на чашку весов 10 здоровых и по возможности одинаковых семян и уравновесить их второй порцией из десяти таких же семян. Одну порцию поместить на 1–2 ч в сосуд с небольшим количеством воды, чтобы вызвать набухание семян. Вторую порцию семян взвесить, поместить в бюкс, высушить при температуре 130 °С (не менее 2 ч), охладить в эксикаторе и снова взвесить.

Наполнить стакан влажными и отжатыми от избытка воды опилками, отсыпать часть опилок, разложить набухшие семена и покрыть



их сверху опилками, которые следует слегка уплотнить. Поместить стакан в темноту и по мере подсыхания опилок поливать водой.

Через 1–2 недели извлечь проростки из опилок, тщательно промыть корни, обсушить проростки фильтровальной бумагой и взвесить. Поместить проростки в пакет из фильтровальной или газетной бумаги, высушить при 100–105 °С до абсолютно сухого состояния (для этого требуется 4–6 ч), охладить в эксикаторе и взвесить. Если проросли не все семена, то учитывают только проросшие, а затем пересчитывают сырую и сухую массу проростков на 10 экземпляров.

### Задания

1. Полученные данные оформить в виде таблицы 3.3

Таблица 3.3. – Изменение массы семян при прорастании

Вес 10 семян, г		Содержание воды в семенах, %	Вес 10 проростков, г		Содержание воды в проростках, %	Потеря сухого вещества	
воздушно-сухой	абсолютно сухой		сырой	абсолютно сухой		в г на 10 семян	в % от исходного веса

2. Сделать выводы о причинах изменения сырого и сухого веса при прорастании семян.

### Контрольные вопросы

1. Какой процесс называют дыханием?
2. Каким образом определяют интенсивность дыхания?
3. Почему в ходе опыта происходила потеря сухого вещества при прорастании семян?

### 3.2.4. Обнаружение полифенолоксидазы и пероксидазы

**Цель работы:** изучить активность полифенолоксидазы и пероксидазы в зависимости:

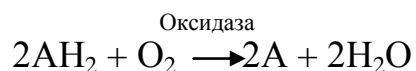
- 1) от видовой специфики запасавшей ткани разных видов растений (мякоть картофеля, яблока, моркови);
- 2) от типа ткани определённого органа (кожура, глазки, мякоть клубня картофеля; побегов конского каштана, дуба и др. древесных растений).

**Объекты:** клубни картофеля (свежие и варёные), яблоко, морковь, побеги дуба, конского каштана и других растений.

**Материалы и оборудование:** 1 %-ный спиртовой раствор гваяковой смолы в капельнице, 3 %-ный раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$  в капельнице, скальпель или лезвие безопасной бритвы, пинцет, электроплитка, тарелка, стаканы с водой (2 шт.), фильтровальная бумага.

### Краткие сведения

Оксидазы – ферменты, активирующие молекулярный кислород (переносящие на него электроны от окисляемого вещества). Активированный кислород соединяется с отщепляемым от субстрата водородом, образуя воду или пероксид водорода по схеме:



Ферменты группы оксидаз широко представлены в растительных клетках. Они участвуют в процессе дыхания на терминальной его стадии передачи электронов на кислород в электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. Ферментами, осуществляющими эту реакцию, являются цитохромоксидаза и оксидаза, не чувствительная к цианидам.

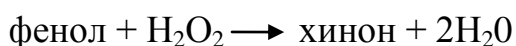
Однако большая часть оксидаз катализирует реакции окисления, не связанные с дыхательной цепью митохондрий. Они завершают многие окислительные процессы, происходящие вне митохондрий. Субстратами оксидаз могут служить ароматические вещества, фенолы, аскорбиновая кислота и др.

Ряд оксидаз содержит железо в виде гема (цитохромоксидаза, пероксидаза, каталаза), другие ферменты содержат медь (аскорбатоксидаза, полифенолоксидаза) либо молибден.

Пероксидазы – ферменты, окисляющие субстрат при помощи перекиси водорода. Общий вид реакции:

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow \text{A} + 2\text{H}_2\text{O}$ , где А и  $\text{AH}_2$  – окисленный и восстановленный субстраты.

Субстратами пероксидаз служат фенолы и ароматические соединения, органические гидроперекиси с небольшими алифатическими заместителями, НАД $\cdot$ Н(НАДФ $\cdot$ Н), нафтогидрохинон, индолилуксусная кислота и др. Пероксидаза – железосодержащие ферменты, простетической группой которых является гем – феррипротопорфирин(железопорфирин). Первой стадией каталитического процесса является образование комплекса между железом фермента и пероксидом водорода. Следовательно, окисление субстрата осуществляется пероксидом водорода, активированным ферментом:



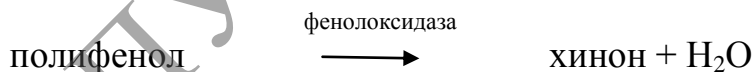
В растительных тканях пероксидазы широко распространены: в пероксисомах, клеточной стенке. Известно более 20 изоформ пероксидазы с различной каталитической активностью, но до сих пор их физиологическое значение окончательно не выяснено. Однако в онтогенезе растений, при патогенезе, в условиях стресса изменяется изоферментный состав пероксидаз и их активность. Установлено, что активность пероксидаз препятствует накоплению пероксида водорода в клетке. Пероксидазы играют важную роль в нейтрализации продуктов вторичного обмена (фенолов), в регуляции гормонального статуса растений через окисление индолилуксусной кислоты, в образовании этилена из метионина, участвуют в процессах синтеза лигнина в клеточной стенке.

Однако одноэлектронный механизм окисления субстрата пероксидазой может привести к образованию активированных форм кислорода, вызывающих повреждение в клетке, но существует мнение, что растение может использовать активные формы кислорода для защиты от болезней.

Обнаружение активности пероксидазы основано на ее способности в присутствии  $H_2O_2$  окислять бесцветные фенольные соединения (бензидин, гваякол, гидрохинон, катехол и др.) до окрашенных продуктов.

В данной работе используется наиболее чувствительный и быстрый гваяколовый метод. При действии пероксидаз в присутствии  $H_2O_2$  гваякол окисляется, что приводит к развитию красно-коричневой окраски.

Полифенолоксидаза (ПФО), известная также как катехолоксидаза или фенолоксидаза представляет собой медь - протеиды, субстратами которых могут быть катехол, галловая кислота и другие вещества. Они являются конечными оксидазами в ЭТЦ, передающими водород с фенолов на молекулярный кислород воздуха. При этом фенолы окисляются в хиноны:



Эта система фенолы хиноны способна при наличии фенолоксидаз к обратным окислительно-восстановительным (ОВ) превращениям.

Катехолоксидаза – наиболее изученная и преобладающая форма фенолоксидазы в растениях. В клетках высших растений ПФО локализована в пластидах всех типов (в хлоропластах, лейкопластах). Физиологическая роль ПФО недостаточно ясная. Однако существует изменение ее активности при старении, повреждениях и патогенезе растений.

Обнаружить полифенолоксилазу можно при помощи раствора гваяколовой смолы, который в присутствии этого фермента изменяет окраску из желтой в синюю. Объясняется это тем, что содержащиеся в

гваяколовой смоле полифенолы не способные самопроизвольно реагировать с молекулярным кислородом, окисляются активированным кислородом.

Для обнаружения пероксидазы можно использовать ту же реакцию окисления полифенолов гваяколовой смолы. Но так как пероксидаза с молекулярным кислородом не реагирует, к раствору гваяколовой смолы необходимо добавить перекись водорода.

Работу удобно проводить на двух срезах исследуемой части растения, нанося на первый срез раствор гваяколовой смолы, на второй – растворы гваяколовой смолы и пероксида водорода. Изменение окраски первого среза свидетельствует о присутствии в клетках полифенолоксидазы, тогда как посинение второго среза есть результат совместного действия двух ферментов – полифенолоксидазы и пероксидазы или, в случае отсутствия в данном объекте первого фермента, – одной пероксидазы (показатель присутствия обоих ферментов – более быстрое посинение второго среза).

**Ход работы.** Поместить на стекло два среза клубня картофеля и нанести на них одновременно раствор гваяколовой смолы, причем второй срез дополнительно обработать каплей раствора перекиси водорода. Для контроля обработать таким же образом материал, предварительно подвергнутый кипячению (вареный картофель).

Исследовать несколько объектов, не допуская при этом попадания сока из одного объекта на срез другого (скальпель, используемый для разрезания исследуемых объектов, необходимо каждый раз мыть и вытирать).

#### Задания

1. Результаты оформите в таблицу 3.4, отмечая скорость появления синей окраски (в баллах).

2. Сделать выводы, указав наличие или отсутствие в исследуемых объектах ПФО и пероксидазы (ПО), ориентировочно оценить активность этих ферментов (ПФО – по посинению первого среза, пероксидазы – по разности скоростей посинения второго и первого срезов).

Таблица 3.4. – Обнаружение ПФО и ПО

Объект	Посинение при действии	
	гваяковой смолы	гваяковой смолы + $H_2O_2$

#### Контрольные вопросы

1. Какова роль оксидаз в кислородном дыхании?
2. Каково отношение ПФО и ПО к основной ЭТЦ дыхания?
3. В чем заключается физиологическая роль ПФО и ПО для клетки?

### 3.2.5. Обнаружение пероксидазы в соке картофеля

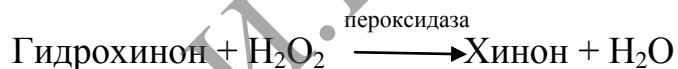
**Цель работы:** изучить характер действия фермента пероксидазы.

**Объекты:** клубни картофеля.

**Материалы и оборудование:** 1 % раствор гидрохинона на дистиллированной прокипяченной воде; 3 % раствор перекиси водорода; скальпель или лезвие безопасной бритвы, пинцет, электроплитка, тарелка, стаканы с водой (2 шт.), фильтровальная бумага.

#### Краткие сведения

Пероксидаза играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах, протекающих в растительном организме при дыхании и брожении, т. е. она является дыхательным ферментом. Она способна окислять органические соединения лишь с помощью каких-либо органических перекисей. В растениях перекись водорода образуется под действием оксидаз (полифенолоксидаза, монофенолоксидаза). Пероксидаза вместе с перекисью водорода образует комплексные соединения, в результате чего перекись активируется и приобретает способность действовать как акцептор водорода. Она может окислять полифенолы и некоторые органические амины. Например, под действием пероксидазы и перекиси водорода гидрохинон переходит в интенсивно буро окрашенный хинон:



**Ход работы.** Клубни картофеля измельчить на пластмассовой терке и из полученной массы через марлю отжать сок, который богат пероксидазой. В три пробирки налить по 5 мл 1 % раствора гидрохинона, приготовленного на прокипяченной дистиллированной воде (перед началом опыта). В первую пробирку добавить по 1 мл 3 % раствора перекиси водорода и картофельного сока, во вторую – внести только перекись водорода, а в третью – сок клубня картофеля.

Интенсивное побурение наблюдается только в первой пробирке, где происходит окисление гидрохинона в хинон за счет кислорода перекиси (при участии пероксидазы). Во второй пробирке окраска раствора почти не изменяется, но при длительном стоянии может появиться слабое побурение, так как гидрохинон окисляется кислородом, образующимся при спонтанном разложении перекиси водорода. Медленное побурение может наблюдаться и в третьей пробирке за счет окисления гидрохинона кислородом воздуха при участии полифенолоксидазы, также в небольшом количестве содержащейся в соке клубня картофеля.

#### Задания

1. Результаты наблюдений записать в таблицу 3.5.
2. Объяснить особенности работы фермента пероксидазы, исходя из результатов опыта.

Таблица 3.5. – Обнаружение пероксидазы

Варианты	Состав смеси в пробирках			Окраска раствора в пробирках
	гидрохинон	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	сок клубня	
1	+	+	+	
2	+	+	-	
3	+	-	+	

### 3.2.6. Определение активности каталазы в растительном материале

**Цель работы:** определить и сравнить активность каталазы в различном растительном материале.

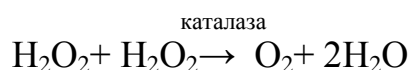
**Объекты:** листья комнатных растений разного возраста; сухие, набухшие и наклюнувшиеся семена ячменя, клубни и корнеплоды;

**Материалы и оборудование:** 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; кварцевый песок для растирания ткани; пробирки; цилиндры на 10 мл, фарфоровые ступки с пестиком, воронки, пробочные сверла, держатели и штативы для пробирок, скальпель или лезвия безопасной бритвы.

#### Краткие сведения

Фермент каталаза относится к классу оксидоредуктаз. Он представляет собой железопротеид. Небелковая часть представлена железопорфирином. Деятельность каталазы в живой клетке связана с активностью флавопротеидов – важнейшего звена ЭТЦ дыхания.

Каталаза в клетках растений выполняет функцию обезвреживания пероксида водорода, который очень токсичен. Реакция идет согласно уравнению:



Этот фермент особенно активен в молодых растущих тканях, в зеленых листьях, где участвует в процессе фотодыхания у C<sub>3</sub>-растений. Предполагается, что в мясистых тканях, лишенных достаточного доступа кислорода, каталаза играет роль поставщика последнего, генерируя его из пероксида водорода.

Активность фермента зависит от ряда факторов: вида растения, возраста клеток и др.

#### Ход работы

1. Определение активности каталазы в тканях растений.

Из листьев растения (молодые, зрелые, старые) пробочным сверлом диаметром 1 см сделать по 5 высечек, не захватывая крупные жилки. При

работе с мясистыми органами растений (клубни, корнеплоды) перед тем как делать высечки, следует нарезать ткань пластинками толщиной 4–5 мм. Диски растереть в ступке с добавлением небольшого количества воды (до 1 мл). Если ткань жесткая, добавить немного песка. К растертой каше прилить 5 мл воды тщательно перемешать и профильтровать в чистую пробирку через увлажненный складчатый фильтр. Для работы достаточно 3–4 мл вытяжки фермента. Добавить к вытяжке 2 мл 3 % перекиси водорода. В результате разложения перекиси водорода ферментом выделяются пузырьки кислорода, дающие хорошо заметную пену. Для сравнения активности каталазы в различных объектах следует брать равное по сухой массе количество материала.

Активность фермента оценить в баллах: интенсивное образование пены – 4 балла, умеренное – 3 балла, слабое – 2 балла, очень слабое – 1 балл, отсутствие активности – 0 баллов. Результаты записать в таблицу 3.6.

#### 2. Определение активности каталазы в семенах.

В три пробирки наливают по 5 мл 3 %-го  $H_2O_2$ . В каждую из пробирок опускают сухие, набухшие и наклюнувшиеся семена ячменя. Наблюдают, что происходит. Результаты записать в таблицу 3.6.

#### Задания

1. Сравнить активность каталазы в различных растительных образцах.

2. Используя активность каталазы как косвенный показатель интенсивности дыхания, сделать вывод о зависимости активности каталазы и (косвенно) интенсивности дыхания от изучаемых внутренних и внешних факторов.

Таблица 3.6. – Определение активности каталазы в растительном материале

Вариант опыта	Активность каталазы, баллы

#### Контрольные вопросы

1. Что собой представляет каталаза, к какому классу ферментов она относится?

2. В чем выражается связь каталазы с основной ЭТЦ дыхания растений?

3. В чем заключается защитная функция каталазы?

4. Каков принцип обнаружения активности ферментов?

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Викторов, Д. П. Практикум по физиологии растений / Д. П. Викторов. – Воронеж : Изд-во ВГУ, 1991. – 160 с.
2. Кузнецов, В. В. Физиология растений : учеб. для вузов / В. В. Кузнецов, Г. А. Дмитриева. – М. : Высш. шк., 2005. – 736 с.
3. Мазец, Ж. Э. Практикум по физиологии растений / Ж. Э. Мазец, И. И. Жукова, А. А. Деревинская. – Минск : БГПУ, 2017. – 176 с.
4. Полевой, В. В. Физиология растений / В. В. Полевой. – М. : Высш. шк., 1989. – 465 с.
5. Практикум по физиологии растений : учеб. пособие для студ. высш. пед. учеб. заведений / И. В. Плотников [и др.] / под ред. В. Б. Иванова. – М. : Академия, 2001. – 144 с.
6. Физиология растений: метод. указания к лаб. работам по теме “Минеральное питание растений” / В. В. Валетов. – Мозырь : МГПУ, 2005. – 31 с.
7. Физиология растений краткий словарь терминов / пособие / В. В. Валетов. – Мозырь : МГПУ им. И. П. Шамякина. – 2013. – 100 с.
8. Храмченкова, О. М. Практикум по физиологии растений: практическое руководство / О. М. Храмченкова ; М-во образования РБ, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Гомель : ГГУ, 2017. – Ч. 1. – 44 с.
9. Якушкина, Н. И. Физиология растений : учеб. для студ. вузов, обуч. по спец. «Биология» / Н. И. Якушкина, Е. Ю. Бахтенко. – М. : ВЛАДОС. – 2005. – 463 с.



*Справочное издание*

СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ  
ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ  
ПО ДИСЦИПЛИНЕ  
«ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»

• В двух частях

Часть I

Составители:

**Валетов** Валентин Васильевич  
**Мищенко** Марина Фёдоровна  
**Курлович** Ирина Алексеевна

Корректор *С. И. Журавлева*  
Оригинал-макет *Л. И. Федула*

Подписано в печать 17.09.2018. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.  
Ризография. Усл. печ. л. 5,12. Уч.-изд. л. 5,86.  
Тираж 143 экз. Заказ 19.

Издатель и полиграфическое исполнение:  
учреждение образования «Мозырский государственный  
педагогический университет имени И. П. Шамякина».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий N 1/306 от 22 апреля 2014 г.  
Ул. Студенческая, 28, 247777, Мозырь, Гомельская обл. Тел. (0236) 32-46-29