

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.08>

ROZDZIAŁ VIII. **ODDYCHANIE**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Oddychanie tlenowe – mitochondrialne – jest wielostopniowym procesem uwalniania, na drodze utleniania substratu, energii swobodnej zmagazynowanej w związkach organicznych i sprzęgania jej w formę energii użytecznej metabolicznie, w postaci wiązań wysokoenergetycznych w ATP. Sumarycznie oddychanie można zapisać jako reakcję **utleniania glukozy**:



U roślin źródłem zredukowanego węgla w procesach oddechowych mogą być też inne sacharydy, takie jak: sacharoza, skrobia, fruktozany, lipidy (głównie triacyloglicerole), kwasy organiczne i białka.

W przypadku glukozy, głównego substratu dla tego procesu, oddychanie obejmuje 3 etapy:

- 1) glikoliza przebiegająca w cytoplazmie:** w pierwszej fazie, zużywającej 2 cząsteczki ATP, następuje fosforylacja i izomeryzacja glukozy do fruktozo-1,6-bisfosforanu, który następnie ulega rozbiciu na cząsteczki aldehydu 3-fosfoglicerynowego, które ulegają konwersji do 2 cząsteczek pirogronianu, czemu towarzyszy wytworzenie 2 cząsteczek NADH oraz 4 cząsteczek ATP na drodze fosforylacji substratowej.
- 2) cykl kwasów trikarboksylowych (cykl kwasu cytrynowego, cykl Krebsa) przebiegający w matriksie mitochondrialnej:** pirogronian zostaje oksydacyjnie dekarboksylowany do acetylo-CoA, który przez kondensację ze szczawiooctanem zostaje włączony do cyklu i wieloetapowo utleniony do CO_2 . Całkowita degradacja cząsteczki glukozy obejmuje dwa obroty cyklu z odtworzeniem

szczawiooctanu oraz wytworzeniem 6 cząsteczek CO_2 , 10 cząsteczek zredukowanych nukleotydów NADH (8) i FADH_2 (2), a także 2 cząsteczek ATP na drodze fosforylacji substratowej.

3) **mitochondrialny łańcuch transportu elektronów (łańcuch oddechowy) i fosforylacja oksydacyjna:**

łańcuch oddechowy w wewnętrznej błonie mitochondrialnej tworzy zespół wieloenzymatycznych układów oksydacyjno-redukcyjnych pośredniczących w przenoszeniu elektronów i protonów z NADH i FADH_2 na tlen cząsteczkowy O_2 . Łańcuch oddechowy składa się z: 4 kompleksów białkowych (I–IV), 2 niskocząsteczkowych przenośników elektronów (ubichinon i cytochrom c) i syntetazy ATP (tzw. kompleks V). W czasie transportu elektronów i protonów uwalniana jest energia, która w procesie fosforylacji oksydacyjnej magazynowana jest w 28 cząsteczkach ATP.

Mitochondria roślinne charakteryzują się obecnością w łańcuchu oddechowym dodatkowego kompleksu **oksydazy alternatywnej**, niewrażliwej na inhibitory oksydazy cytochromowej kompleksu IV, która przenosi elektrony ze zredukowanego ubichinonu bezpośrednio na tlen, czyli bez sprzężenia z fosforylacją oksydacyjną. Wyzwolona energia – zamiast służyć do syntezy ATP – ulega rozproszeniu w postaci ciepła (termogeneza), co umożliwia niektórym roślinom wzrost w temperaturze poniżej 0°C oraz odparowywanie lotnych atraktantów. Szlak alternatywny bierze udział w utlenianiu substratów oddechowych, gromadzących się w nadmiarze w stosunku do zapotrzebowania komórek na ATP lub gdy synteza ATP zostaje zahamowana na skutek zaburzenia działania szlaku cytochromowego (np. pod wpływem inhibitorów).

Łańcuch oddechowy, podobnie jak wszystkie procesy przebiegające w błonach, jest wrażliwy na podwyższenie i obniżenie temperatury do wartości wywołujących zmiany płynności błon oraz oddziaływania między lipidowymi i białkowymi składnikami błon.

W **warunkach beztlenowych** (np. w korzeniach zalanych wodą lub pokrytych lodem) – gdy brakuje tlenu cząsteczkowego, będącego końcowym akceptorem elektronów – metabolizm

komórek roślinnych zostaje tymczasowo przestawiony na **fermentację alkoholową**. Proces ten obejmuje 2 etapy:

- 1) wspólną z oddychaniem tlenowym glikolizę,
- 2) dekarboksylację pochodzącego z glikolizy pirogronianu do aldehydu octowego, redukowanego dalej do etanolu. Powstaje wówczas NAD^+ , niezbędny do podtrzymania glikolizy i produkcji ATP na drodze fosforylacji substratowej.

Sumarycznie oddychanie beztlenowe można zapisać:



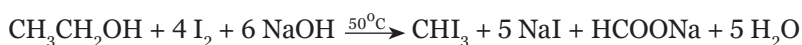
CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

1. Zbadanie wpływu temperatury na intensywność oddychania tlenowego kiełkujących nasion.
2. Detekcja i oznaczenie stężenia etanolu jako produktu oddychania beztlenowego podczas kiełkowania.

Zasada metody

1. Ocena intensywności oddychania polega na pomiarze ilości CO_2 wydzielonego przez kiełkujące nasiona. Wydzielony CO_2 zostaje zaabsorbowany przez NaOH , a następnie wytrącony z roztworu za pomocą BaCl_2 . W kolejnym etapie roztwór NaOH miareczkuje się roztworem HCl w obecności fenoloftaleiny do trwałego odbarwienia. Różnica objętości HCl zużytego na zmiareczkowanie roztworu NaOH z wariantu kontrolnego (bez nasion) i wariantu hodowlanego (z nasionami) odpowiada liczbie moli HCl równoważnej liczbie moli wydzielonego CO_2 .
2. Detekcja etanolu: wydzielony w procesie fermentacji etanol w podwyższonej temperaturze wchodzi w reakcję z NaOH oraz jodem, powstaje jodoform, wytrącający się w postaci żółtych kryształów (pojawia się też charakterystyczny zapach jodoformu):



3. Zawartość wydzielonego etanolu oznacza się za pomocą komercyjnego testu enzymatycznego z dehydrogenazą alkoholową (ang. *alcohol dehydrogenase*, ADH). W obecności ADH i NAD etanol szybko utlenia się do aldehydu octowego i NADH, pomiar absorbancji wykonuje się przy długości fali 340 nm:



Doświadczenie I

Badanie wpływu temperatury na intensywność oddychania tlenowego

Materiał

nasiona grochu (60 g) podkiełkowane w temperaturze 24°C

Odczynniki

0,2 M NaOH, 2% BaCl₂, 1% fenoloftaleina w etanolu, 0,1 M HCl

Sprzęt laboratoryjny

pęsety, łopatkę, zlewka do kielkowania nasion, 4 woreczki z gazy, 5 słoików 500 cm³ ze szczelnymi zakrętkami, pipety 5 i 10 cm³, pipety pasteurowskie, cylinder miarowy 50 cm³, 10 kolb Erlenmeyera 100 cm³, biureta, waga laboratoryjna, lodówka lub chłodnia (5°C), termostaty (20°C, 24°C, 35°C, 50°C), lignina, linijki, markery

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie hodowli

- a) Odważyć cztery porcje po 10 g podkiełkowanych nasion grochu, umieścić w woreczku z gazy i podwiesić bezpośrednio pod nakrętkami do 4 słoików.
- b) Słoiki na 500 cm³ opisać kolejno: Kontrola; Temp. 5°C; Temp. 20°C; Temp. 35°C; Temp. 50°C.
- c) Do każdego słoika wlać po 50 cm³ 0,2 M NaOH i natychmiast zakręcić przygotowanymi nakrętkami. Na słoik kontroli nałożyć nakrętkę bez podwieszonych nasion.
- d) Słoiki umieścić na 48 godzin w chłodni i w termostatach zgodnie z opisem temperatury, słoik kontroli pozostawić w 20°C.

2. Wykonanie oznaczenia zawartości CO_2 wydzielonego w procesie oddychania tlenowego
 - a) Z każdego słoika natychmiast po otwarciu pobrać pipetą po 10 cm^3 roztworu NaOH i przelać do kolb Erlenmeyera na 100 cm^3 .
 - b) Wytrącić CO_2 zaabsorbowany przez NaOH, dodając po 5 cm^3 2% BaCl_2 .
 - c) Dodać 3 krople fenoloftaleiny i miareczkować 0,1 M HCl do momentu trwałego odbarwienia roztworu. Procedurę miareczkowania dla każdego wariantu powtórzyć dwukrotnie, wyniki uśrednić.

Opracowanie wyników

1. Obliczyć różnicę objętości HCl zużytego na zmiareczkowanie roztworu ze słoika kontrolnego i roztworów z wariantów zawierających nasiona. Wyniki przeliczyć na mg wydzielonego CO_2 przez 1 g kiełkujących nasion, korzystając ze wzoru:

$$C_B = (V_K - V_B) \times 5 \times 4,4 \div 10$$

gdzie:

C_B – masa CO_2 [mg] wydzielona przez 1 g świeżej masy kiełkujących nasion [mg g^{-1} ś. m.],

V_K – objętość HCl [cm^3] zużyta na zmiareczkowanie roztworu NaOH z kontroli (bez nasion),

V_B – objętość HCl [cm^3] zużyta na zmiareczkowanie roztworu NaOH z wariantów hodowlanych,

5 – rozcieńczenie wynikające z pobrania do miareczkowania 10 cm^3 roztworów NaOH,

4,4 – współczynnik do przeliczenia objętości HCl zużytego na zmiareczkowanie na mg CO_2 ,

10 – masa nasion [g] w poszczególnych wariantach hodowlanych.

2. Wyniki przedstawić na wykresie, odkładając na osi odciętych (x) temperaturę [$^{\circ}\text{C}$], a na osi rzędnych (y) ilość wydzielonego CO_2 [mg].
3. Wyciągnąć wnioski dotyczące wpływu temperatury na intensywność oddychania kiełkujących nasion.

Doświadczenie II

Detekcja i oznaczenie stężenia etanolu

Materiał

ziarniaki jęczmienia, żyta i kukurydzy (po 120 g) podkiełkowane w temperaturze 24°C

Odczynniki

20% NaOH, 5% I w KI, komercyjny zestaw testowy do wykrywania etanolu oparty na aktywności ADH, np. DRI®Ethyl Alcohol Assay (ThermoScientific), świeżo przegotowana i ostudzona woda destylowana pozbawiona tlenu

Sprzęt laboratoryjny

pęsety, łopatkę, 3 zlewki do kiełkowania nasion, pipety (0,1–10 cm³), pipety pasteurowskie, 3 kolby Erlenmeyera 300 cm³ z dokładnie dopasowanym korkiem ze szklaną kapilarą, 20 szklanych probówek, kuweta kwarcowa 1 cm z przykrywką, spektrofotometr, waga laboratoryjna, termostaty (24°C, 30°C), blok grzejny (50°C), szczypce do probówek, lignina, linijki, markery

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie hodowli
 - a) Odważyć porcję po 100 g podkiełkowanych ziarniaków jęczmienia, żyta oraz kukurydzy i umieścić w podpisanych kolbach Erlenmeyera o pojemności 300 cm³.
 - b) Nasiona całkowicie zalać pozbawioną tlenu wodą destylowaną, kolby zakryć korkami ze szklaną kapilarą (umożliwia wydostawanie się CO₂ jako jednego z produktów oddychania beztlenowego), pozostawić na 48 godzin w termostacie w 30°C.
2. Wykrycie etanolu w płynach pohodowlanych
 - a) Do szklanych probówek pobrać po 5 cm³ płynów pohodowlanych z poszczególnych kolb Erlenmeyera, dodać 3 cm³ I w KI oraz kilka kropli 20% NaOH do momentu odbarwienia roztworu.
 - b) Probówki wstawić do bloku grzejnego umieszczonego pod dygestorium (!) i podgrzewać w temperaturze 50°C przez 5 minut.

- c) Obejmując probówki szczypcami, wydobyć je z bloku, wstawić do statywu i nie wynosząc poza dygestorium, obserwować wytrącanie się żółtych kryształów. Opisać wynik reakcji, podając, jaki związek chemiczny się wytrąca i o czym świadczy intensywność wytrącania się kryształów.
3. Oznaczenie zawartości etanolu w płynach pochodowlanych
- a) Do szklanych probówek pobrać płyny pochodowlane z poszczególnych kolb (do dwóch probówek z każdej hodowli), w objętości zgodnej z procedurą oznaczenia opisaną dla wybranego komercyjnego testu z ADH.
- b) Przeprowadzić oznaczenie zgodnie z daną procedurą i wykonać pomiar absorbancji przy 340 nm. Wyniki wpisać do tabeli 8.1.

Opracowanie wyników

Uzyskane wyniki uśrednić i przeliczyć na miligramy C_2H_5OH wydzielonego przez 1 g świeżej masy kiełkujących ziarniaków [$mg\ g^{-1}\ \acute{s. m.$] i przedstawić w tabeli 8.1.

Tabela 8.1. Ilość etanolu wydzielonego w procesie oddychania beztlenowego ziarniaków

Gatunki	A_{340}			Wydzielony C_2H_5OH [$mg\ g^{-1}\ \acute{s. m.$]
	A_1	A_2	$\bar{A}$	
Jęczmień				
Żyto				
Kukurydza				

Literatura

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Szweykowska A., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2002.