

**Министерство сельского хозяйства Российской  
Федерации**

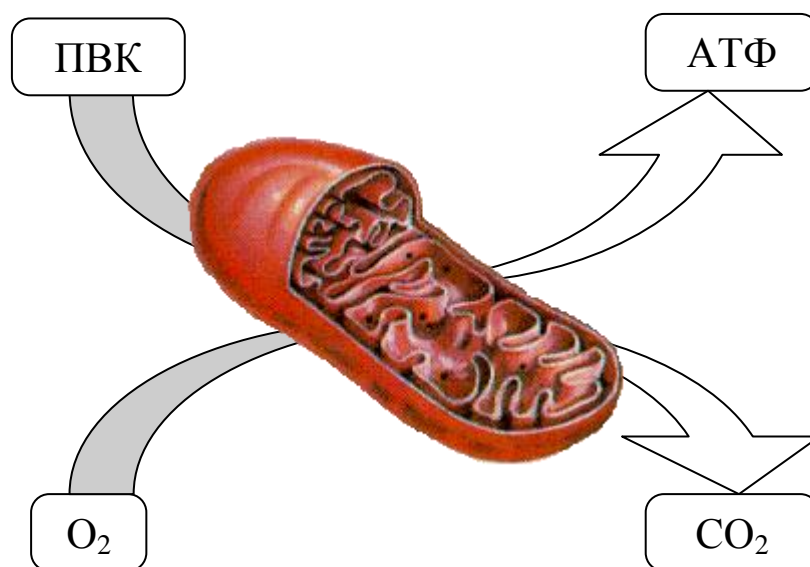
**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ**

**Кафедра физиологии и биохимии растений**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
к лабораторным занятиям по теме**

## **ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ**

**для бакалавров агробиологических специальностей**



**КРАСНОДАР 2013**

Составители:

Профессор, д.б.н. Ю.П.Федулов,  
профессор В.В. Котляров,  
доцент К.А. Доценко,  
доцент Я.К. Тосунов,  
ст.преп. Ю.В. Подушин

Утверждены учебно-методической комиссией факультета:

Протокол № 5 от 20 мая 2013 года

Рецензент доктор химических наук,  
профессор Доценко С.П.

## ВВЕДЕНИЕ

**Дыхание растений** - сложный многоступенчатый процесс, в ходе которого происходит окислительный распад органических соединений (субстратов дыхания). Значительная часть выделяющейся при окислении энергии запасается в итоге в макроэргических связях АТФ (рис.1).

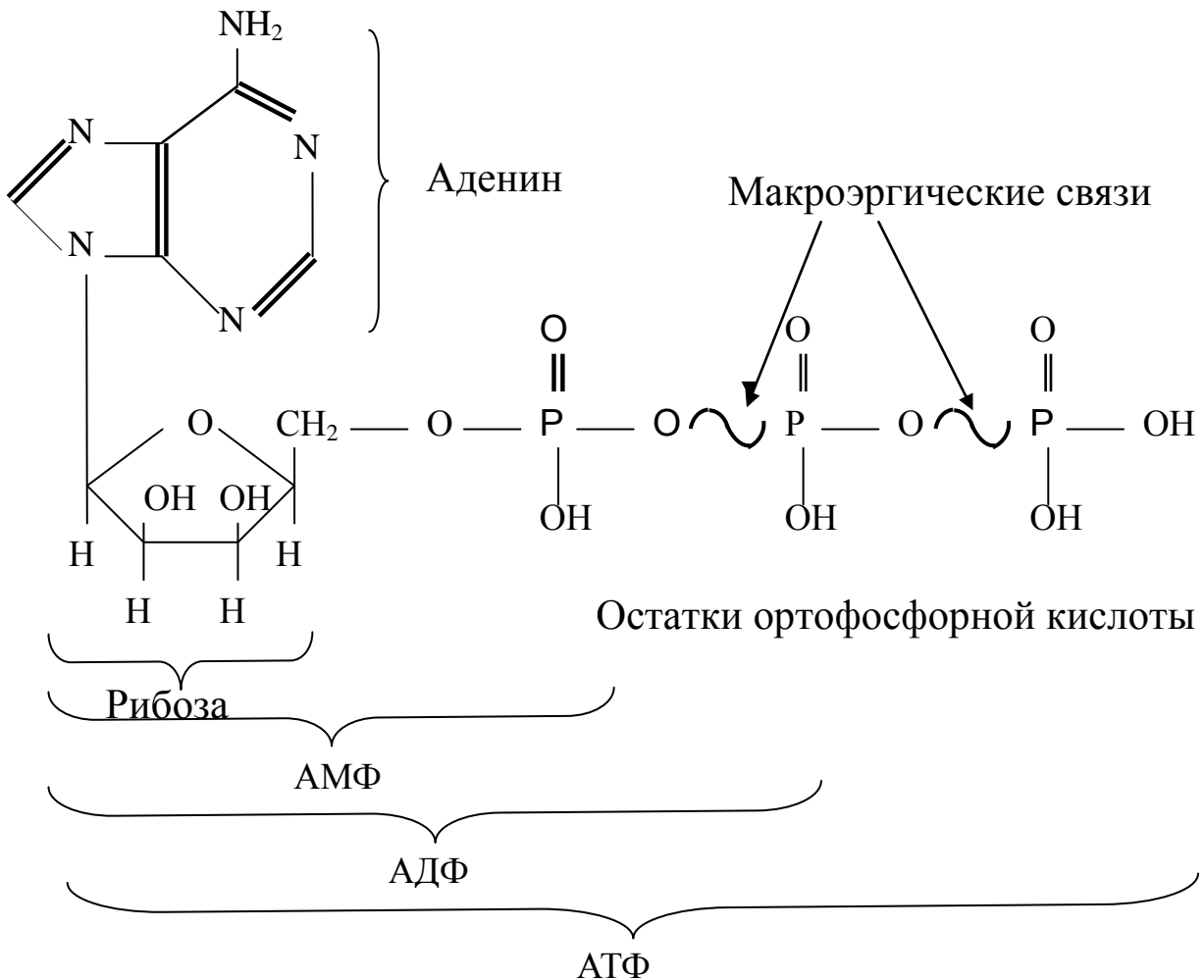


Рис.1. Строение молекулы АТФ – аденозинтрифосфорной кислоты.

Поэтому основной функцией дыхания считается *энергетическая*.

Вторая важнейшая функция дыхания – *пластическая* - состоит в образовании целого ряда промежуточных продуктов распада, необходимых для синтеза многих соединений.

Протекающие в растениях процессы жизнедеятельности требуют постоянного притока энергии. Основным источником свободной энергии выступают макроэргические соединения, содержащие энергоемкие (макроэргические) связи и способные легко отдавать свою энергию другим молекулам. К числу этих соединений относится аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) - соединение азотистого основания аденина, сахара рибозы и трех остатков ортофосфорной кислоты, два из которых связаны макроэргическими фосфорноэфирными связями.

АТФ называют "энергетической валютой" клетки, поскольку заключенная в макроэргических связях энергия велика и легкодоступна.

Чтобы биохимический процесс смог произойти, реагирующие молекулы должны быть активированы, то есть им должно быть передано определенное количество энергии. Активация субстрата, как правило, осуществляется путем переноса энергии макроэргической связи на его молекулу вместе с одним или двумя остатками ортофосфорной кислоты от АТФ, то есть фосфорилированием субстрата. Так, активация глюкозы протекает по схеме:



Напротив, при фосфорилировании АМФ или АДФ происходит запасание энергии.

Основным источником энергии для синтеза АТФ в клетках служит процесс дыхания, в ходе которого энергия высвобождается за счет распада дыхательных субстратов.

Образование АТФ за счет энергии окисления субстрата называется окислительным фосфорилированием:



В зависимости от механизма и места синтеза АТФ различают субстратное и коферментное окислительное фосфорилирование. При субстратном фосфорилировании макроэргическая связь образуется в молекуле окисляемого (расщепляемого) субстрата и затем переносится на АДФ. Коферментное окислительное фосфорилирование осуществляется в митохондриях за счет окисления восстановленных коферментов дегидрогеназ.

## ОБЩАЯ СХЕМА ПРОЦЕССА ДЫХАНИЯ

Распад и окисление потребляемых в процессе дыхания веществ протекают различными путями, которые, при всем их многообразии, в аэробных условиях могут быть разделены на **3 этапа** или **2 фазы**.

На **первом этапе** происходит гидролиз сложных молекул до более простых (белков - до аминокислот, полисахаридов - до сахаров, жиров - до глицерина и жирных кислот) и их частичное разложение и окисление (аминокислот - до кетокислот и других продуктов путем переаминирования и окислительного дезаминирования, сахаров - до пировиноградной кислоты в ходе гликолиза, жирных кислот - до ацетилкоэнзима А в результате бета-окисления, глицерина - до пировиноградной кислоты и т.д.

На этом этапе окисление субстратов осуществляется путем отнятия от них водорода (при участии воды) анаэробными дегидрогеназами. Высвобождающаяся энергия запасается в форме восстановленных коферментов дегидрогеназ (НАДН +  $H^+$ ). Поскольку прохождение реакций этого типа возможно в условиях недостатка или полного отсутствия кислорода, его относят к **анаэробной фазе дыхания**.

В анаэробных условиях часть образующейся пировиноградной кислоты или продуктов ее распада может подвергаться восстановлению водородом, отнятым от окисляемых субстратов дегидрогеназами. При этом коферменты дегидрогеназ окисляются и становятся способными к новым дегидри-

рованиям, а из пирувата могут образоваться молочная кислота, этиловый спирт и другие продукты различных типов **брожения**.

В присутствии молекулярного кислорода осуществляется **второй этап** аэробного дыхания, в ходе которого продукты первого этапа (анаэробной фазы) окончательно окисляются (опять-таки при участии воды) дегидрогеназами и распадаются до углекислого газа. Как правило, это происходит в митохондриях через цикл ди- и трикарбоновых кислот (цикл Кребса). На этом этапе, как и на первом, кислород воздуха также не принимает непосредственного участия в окислении субстратов, но его присутствие необходимо для регенерации окисленного состояния коферментов дегидрогеназ. Поэтому данный этап относят к **аэробной фазе** дыхания.

На **третьем, заключительном этапе** аэробного дыхания, в ходе окисления восстановленных на двух предыдущих этапах коферментов дегидрогеназ их "восстановительная сила" трансформируется в свободную энергию макроэргических связей АТФ. Конечным акцептором отнятых от субстратов электронов и протонов служит молекулярный кислород. Поэтому этот этап тоже относится к **аэробной фазе**.

Третий этап включает два взаимосвязанных процесса: транспорт электронов по электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий и сопряженное с ним коферментное окислительное фосфорилирование. Конечные продукты этапа - окисленные коферменты дегидрогеназ, вода и АТФ.

## **ПУТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО РАСПАДА САХАРОВ**

В качестве субстратов дыхания в растениях используются различные соединения. Преобладание того или иного субстрата определяется тканевой принадлежностью конкретной клетки, этапом развития ее и организма в целом, влиянием внешних факторов, но основной поток углерода, "сжигаемого" в ходе дыхания, приходится на углеводы (сахара). Поэтому основное внимание при рассмотрении химизма дыхания

обычно уделяется именно превращениям сахаров. Окислительный распад сахаров в высших растениях осуществляется главным образом по двум путям: гликолитическому (гексозодифосфатному, дихотомическому) и пентозофосфатному (гексозомонофосфатному, апотомическому).

## ГЛИКОЛИТИЧЕСКИЙ ПУТЬ РАСПАДА САХАРОВ

Гликолитический путь включает два этапа:

1. Гликолиз.
2. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты и цикл Кребса.

1. ПЕРВЫЙ ЭТАП ГЛИКОЛИТИЧЕСКОГО ПУТИ - ГЛИКОЛИЗ (путь Эмбдена - Мейергофа - Парнаса, дихотомический путь окисления глюкозы, гексозодифосфатный путь) - цепь реакций анаэробного распада гексоз до пировиноградной кислоты, сопровождающегося восстановлением НАД<sup>+</sup> и синтезом АТФ (рис.2). Гликолиз протекает в цитоплазме и пластидах.

Процесс гликолиза можно разбить на три части:

а) подготовительную - гексоза дважды фосфорилируется и расщепляется пополам (отсюда название - дихотомический путь) на две триозы;

б) первое субстратное фосфорилирование - образование АТФ, осуществляемое за счет энергии окисления фосфоглицеринового альдегида до кислоты;

в) второе субстратное фосфорилирование - образование АТФ, происходящее за счет дегидратации 2-фосфоглицериновой кислоты.

При субстратном фосфорилировании макроэргическая связь образуется между остатком молекулы окисляемого или расщепляемого субстрата и потребляемой из раствора фосфорной кислоты за счет выделяющейся в ходе окисления или расщепления энергии. Эта энергия затем переносится вместе с фосфатной группой на АДФ или АМФ.

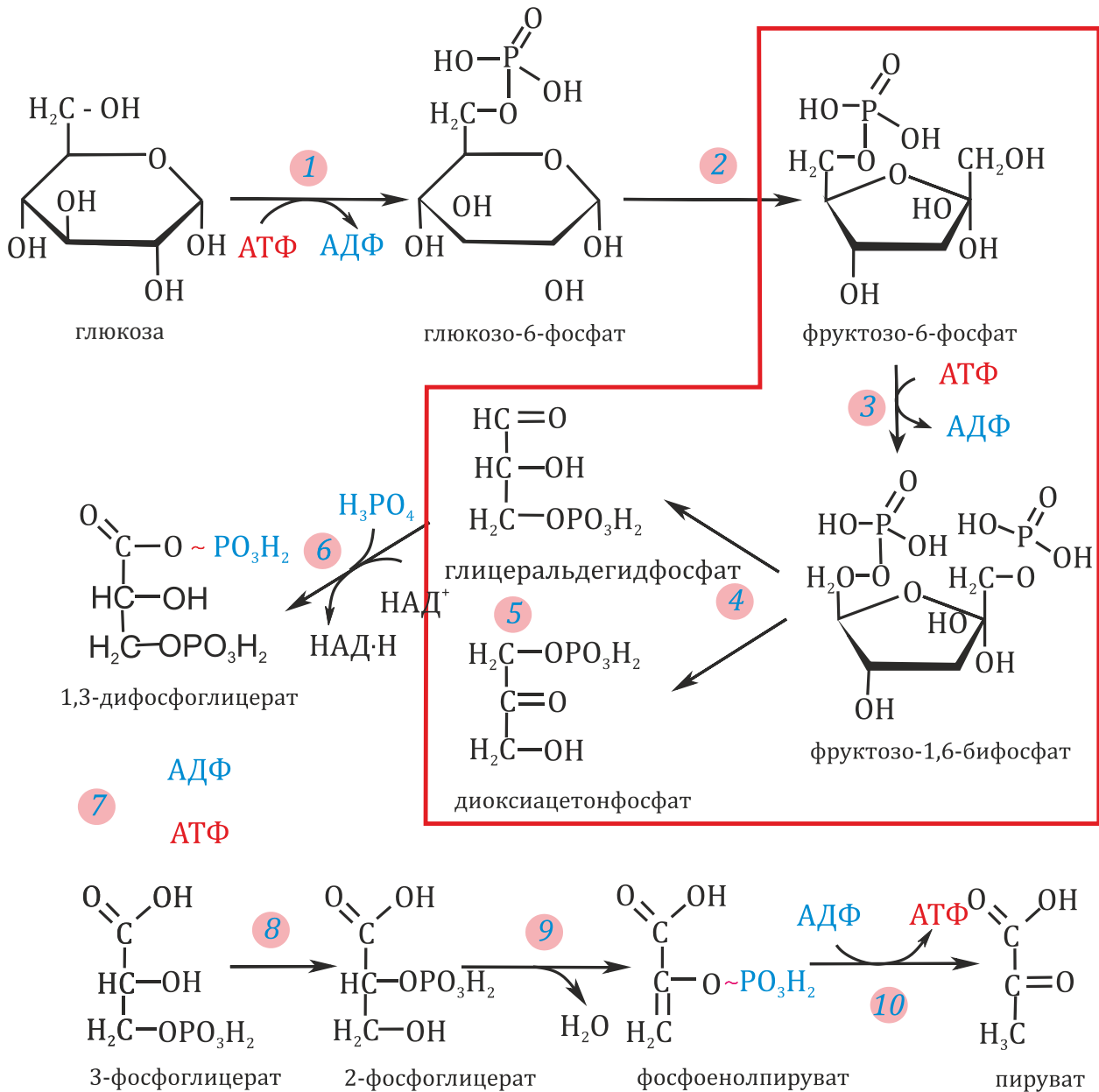


Рис.2. Схема гликолиза

А - подготовительная фаза, Б - первое субстратное фосфорилирование, В - второе субстратное фосфорилирование

Поскольку, начиная со второй стадии, число участников процесса (триоз и др.) удваивается, то в результате гликолиза из одной молекулы гексозы образуются две молекулы пирувата, восстанавливаются два НАД<sup>+</sup> и синтезируются 2×2=4 макроэргические связи АТФ (за счет первого и второго субстратных фосфорилирований). Так как на активацию гексозы предварительно были затрачены 2 молекулы АТФ, энерги-



ческий выход гликолиза при анаэробном дыхании составляет:  $4-2=2$  АТФ. В присутствии кислорода воздуха, т.е. при аэробном дыхании, энергетический выход гликолиза составляет 8 АТФ, ибо каждый из двух восстановленных НАД при окислении в ЭТЦ дыхания добавит дополнительно по 3 молекулы АТФ:  $2+2\times 3=8$  АТФ.

Значение гликолиза. Он является начальным этапом аэробного дыхания (за счет сахаров) и всех видов брожения. Он поставляет пировиноградную кислоту в митохондриях, где в присутствии кислорода происходит окончательное ее окисление. В процессе гликолиза образуются исходные компоненты (ФГА, ФДА, ФЕП и др.), необходимые для синтеза различных соединений. Многие промежуточные продукты гликолиза являются общими и для фотосинтеза. Гликолиз - главный немитохондриальный (в анаэробных условиях - единственный) источник АТФ. Гликолиз обратим. Путем обращения гликолиза растения могут синтезировать сахара из фосфоглицериновой, пировиноградной, яблочной и других кислот (глюконеогенез).

2. ВТОРОЙ ЭТАП ГЛИКОЛИТИЧЕСКОГО ПУТИ распада сахаров начинается с окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты, осуществляемого пируватдекарбоксилазным мультиферментным комплексом (рис.4). При этом восстанавливается НАД<sup>+</sup> и выделяется СО<sub>2</sub>, а высвобождающаяся при окислении энергия запасается в макроэргической тиоэфирной связи продукта- ацетилкоэнзима А (СН<sub>3</sub>СО~SCoA):

### Цикл Кребса

Ацетил-кофермент А вступает далее в цикл Кребса - цепь протекающих в матриксе митохондрий окислительно-восстановительных реакций (цикл ди- и трикарбоновых кислот, цикл лимонной кислоты (рис. 3).

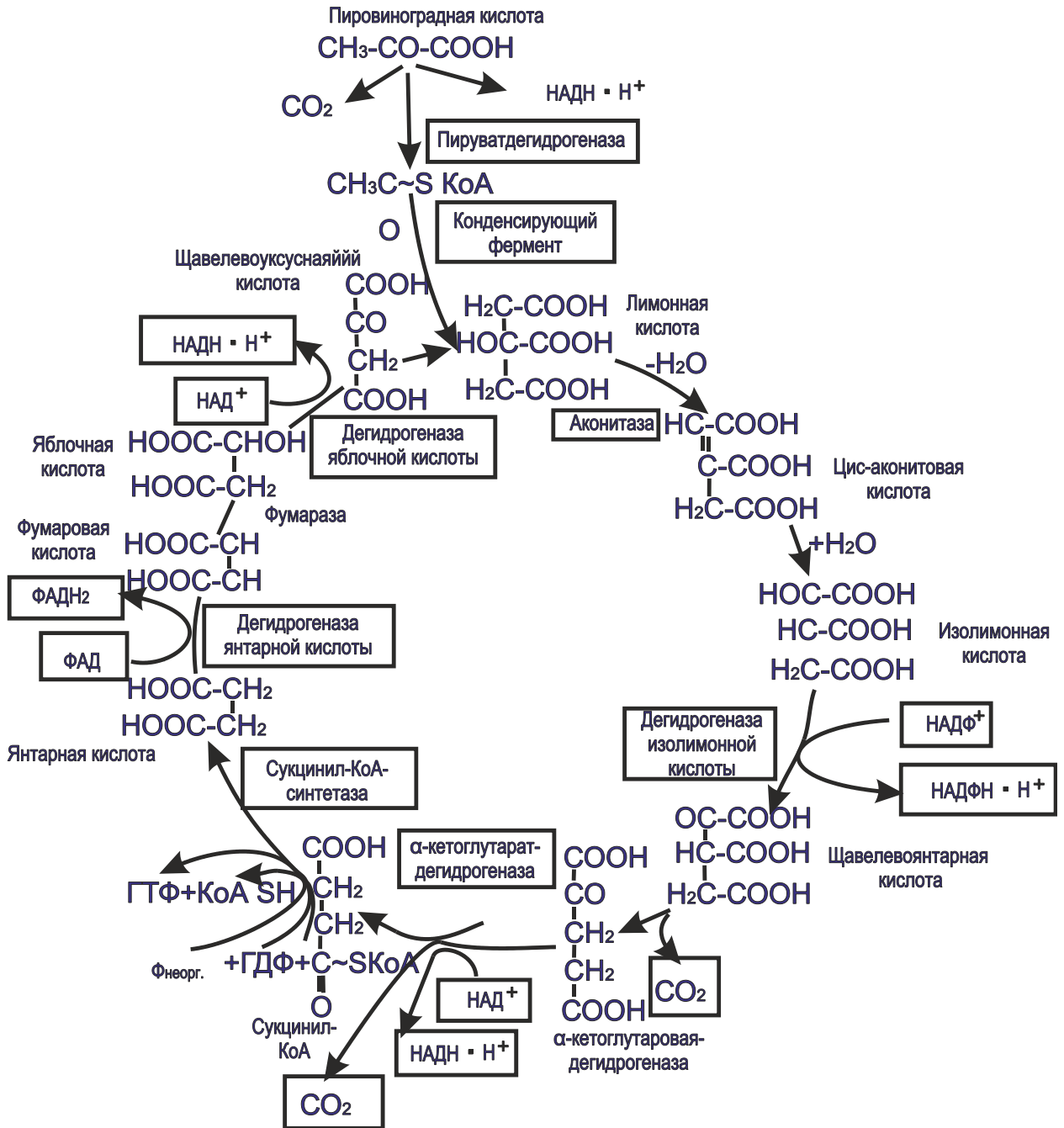


Рис.3. Схема окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты и цикла Кребса

В результате ряда последовательных превращений молекула пировиноградной кислоты полностью распадается до трех молекул  $\text{CO}_2$  при одновременном восстановлении четырех пиридиновых ( $\text{NAD}^+$  - зависимых) и одной флавиновой (ФАД) дегидрогеназ. Кроме того, за один оборот цикла Кребса путем субстратного фосфорилирования синтезируется одна молекула АТФ.

Хотя газообразный кислород не принимает непосредственного участия в цикле, он необходим для поддержания окисленного состояния дегидрогеназ. Поэтому цикл Кребса относят к **аэробной фазе** дыхания. Восстановленные пиридиновые и флавиновые дегидрогеназы отдают отнятый от окисляемых субстратов водород в электронно-транспортную цепь дыхания и в конечном счете на кислород воздуха.

#### Значение цикла Кребса.

1. В цикле лимонной кислоты происходит окончательное расщепление дыхательного субстрата, сопровождающееся выделением углекислого газа.

2. В ходе цикла энергия окисления субстрата превращается в "восстановительную силу" восстановленных дегидрогеназ и этим подготавливается к трансформации в макроэнергетические связи АТФ.

3. Образовавшиеся органические кислоты могут служить материалом для синтеза аминокислот, жиров и углеводов и в этом случае выводятся из цикла.

## **ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ (ПФП) РАСПАДА САХАРОВ**

Пентозофосфатный путь протекает в растворимой части цитоплазмы, пропластидах, пластидах. В ходе его превращается не дифосфатный, а монофосфатный эфир глюкозы, она расщепляется не пополам (дихотомически), как в гликолитическом пути, а посредством отнятия одного атома углерода, т.е. усековением (апотомически). Отсюда происходят другие названия ПФП - гексозомонофосфатный, апотомический. Количество превращений окисляемого субстрата в ходе ПФП гораздо меньше, чем при гликолитическом распаде, поэтому данный путь окисления иногда называют пентозным шунтом.

ПФП - процесс циклический, протекающий в два этапа (рис.4).

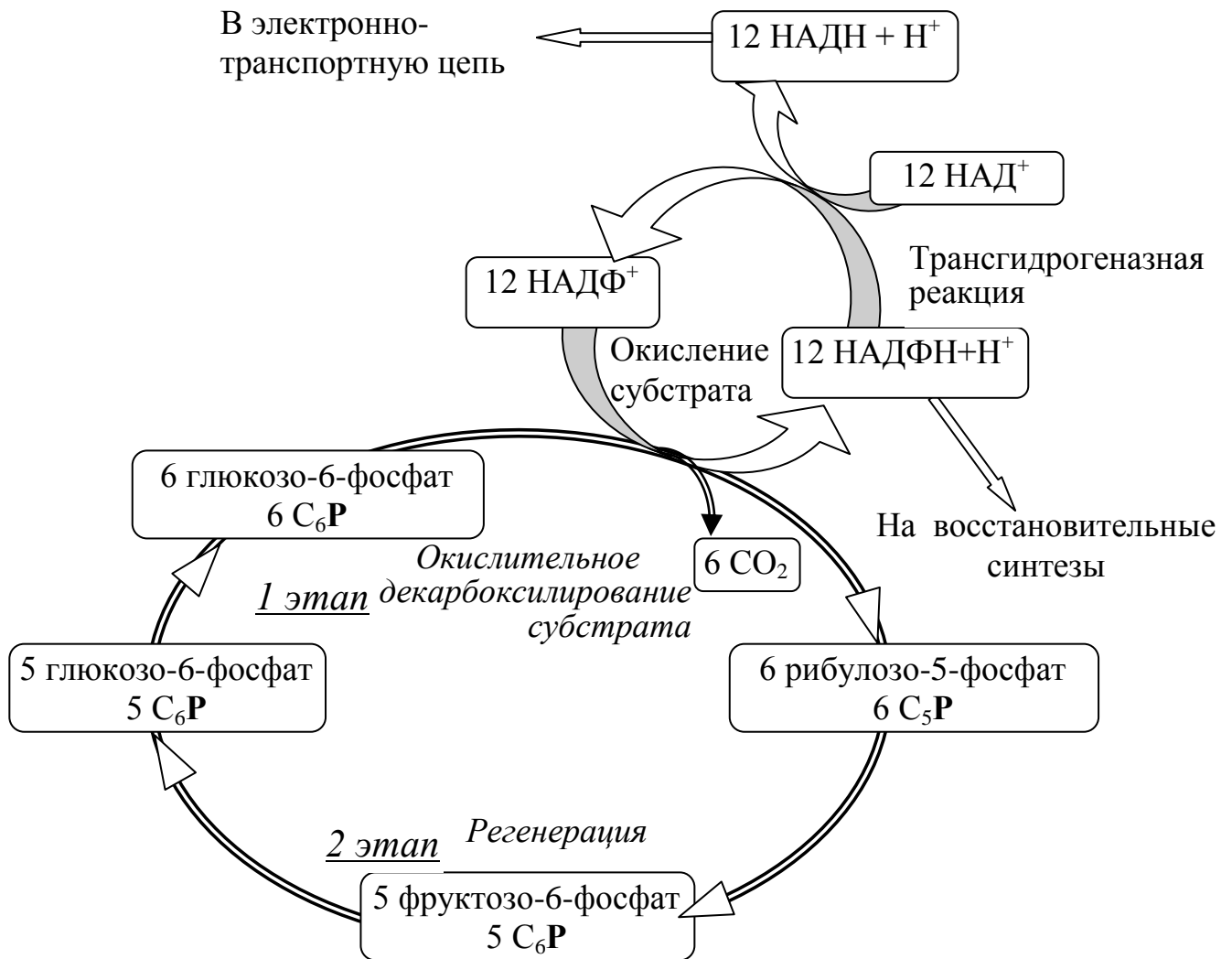


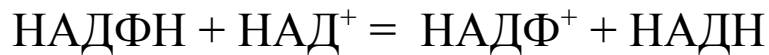
Рис.4. Общая схема пентозофосфатного пути окисления ГЛЮКОЗЫ

Первый этап ПФП – окислительный - состоит в окислении вначале глюкозо-фосфата, а затем фосфоглюконовой кислоты путем отнятия водорода (дегидрирования) НАДФ-зависимыми дегидрогеназами. Окисление фосфоглюконовой кислоты сопровождается ее декарбоксилированием, в результате чего образуется пентоза - рибулозо-5-фосфат.

Сущность второго этапа – регенерационного - состоит в образовании из шести молекул рибулозо-5-фосфата пяти молекул глюкозо-6-фосфата. В этом процессе участвуют фосфорные эфиры  $C_3$ -  $C_7$  сахаров.

Таким образом, для полного оборота цикла необходимо окислить 6 молекул глюкозы. При этом выделяется 6 молекул  $\text{CO}_2$ , восстановятся 12 НАДФ<sup>+</sup>.

Значение пентозофосфатного пути. Главным донором электронов и водорода для ЭТЦ дыхания служит восстановленный НАД. В нормальных условиях в клетке преобладает его окисленная форма - НАД<sup>+</sup>, тогда как фосфорилированное производное - НАДФ<sup>+</sup>, как правило, находится в восстановленном состоянии - НАДФН + Н<sup>+</sup>. Восстановленный НАДФ может послужить донором водорода для ЭТЦ дыхания только после трансгидрогеназной реакции:



Если все шесть пар атомов водорода, отнятые НАДФ-зависимыми дегидрогеназами ПФП, будут переданы на НАД<sup>+</sup> и затем в ЭТЦ дыхания, энергетический выход ПФП составит:  $6 \times 2 \times 3 = 36$  АТФ (без учета затрат АТФ на активацию гексозы), что почти соответствует энергетическому выходу гликолитического пути (38 АТФ).

Однако главное предназначение ПФП состоит в его участии не столько в энергетическом, сколько в пластическом обмене. Особенно интенсивно ПФП протекает в клетках и тканях, в которых активно идут синтетические процессы, такие как синтез нуклеиновых кислот, белков, липидов, полисахаридов и др.

Участие ПФП в пластическом обмене клеток проявляется с различных сторон:

1. ПФП - основной внехлоропластный и немитохондриальный источник восстановленного НАДФ, который необходим для гидрогенизации жирных кислот, восстановительного карбоксилирования, аминирования, восстановления нитратов, сульфатов и др. веществ. НАДФН участвует в поддержании необходимого уровня ОВП клетки, являясь первичным восстановителем глутатиона.

2. ПФП поставляет клетке пентозы и другие сахара с числом углеродных атомов от трех до семи. Пентозы используются на синтез нуклеотидов, компонентов клеточной стенки и т.д. Эритрозо-4-фосфат, конденсируясь с фосфодиоксиацетоном, образует шикимовую кислоту - предшественник ароматических соединений, например, фенолов, дубильных веществ, некоторых витаминов, ростовых веществ, ароматических аминокислот и др.

3. Участники ПФП ( $C_3$ - $C_7$ -сахарофосфаты, НАДФН) в хлоропластах могут принимать участие в темновой фиксации углекислого газа. Не случайно цикл Кальвина называют восстановительным или обращенным ПФП.

4. ПФП имеет общие промежуточные продукты с гликолизом (ФГА, ФДА, Ф-1,6-диФ, Ф-6-Ф, Г-6-Ф), поэтому в хлоропластах в отсутствие света возможно превращение участников ПФП по гликолитическому пути с целью поддержания необходимого уровня АТФ.

Поскольку гликолиз и ПФП не разобщены пространственно, в клетках могут наблюдаться различные соотношения этих путей. В анаэробных условиях преобладает гликолиз. В хлоропластах, как правило, активность апоцитохимического окисления гораздо выше, чем гликолитического, в цитоплазме - наоборот. Активность ПФП существенно возрастает при неблагоприятных условиях - засухе, инфицировании, затенении, засолении, калийном голодании, при старении.

## **ТРЕТИЙ, ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЙ ЭТАП АЭРОБНОГО ДЫХАНИЯ**

Сущность третьего этапа аэробного дыхания состоит в превращении "восстановительной силы" восстановленных дегидрогеназ в энергию макроэргических связей АТФ. Осуществляется этот процесс на внутренней мембране митохондрий, где локализована цепь переносчиков электронов и протонов (электронно-транспортная цепь дыхания) (рис. 5, 6).

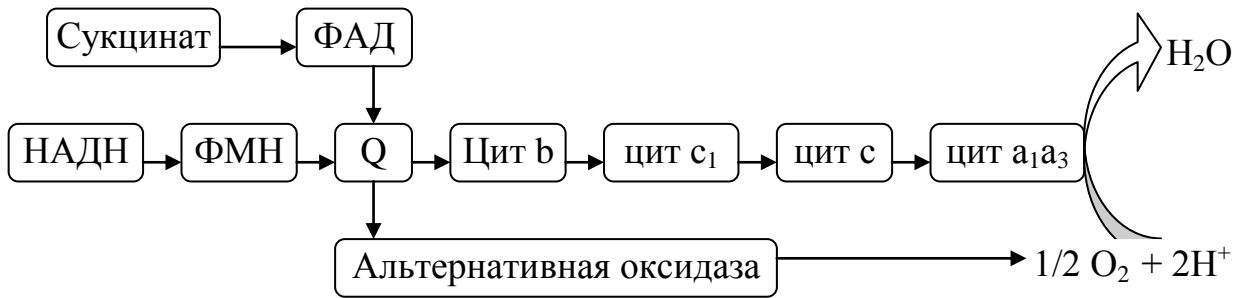


Рис.5. Схема митохондриальной электронно-транспортной цепи дыхания

Внутренняя мембрана митохондрии образует впячивания, складки, называемые кристами, позволяющие значительно увеличить ее поверхность.

Передача электронов по цепи переносчиков происходит в соответствии с величинами их окислительно-восстановительных потенциалов (ОВП) от более сильных восстановителей к более сильным окислителям. Стандартный ОВП наиболее восстановленного участника цепи - восстановленного НАД - имеет величину  $-0.32$  мВ, тогда как наиболее окисленного - кислорода воздуха -  $+0.82$  мВ. Перепад ОВП в ЭТЦ дыхания составляет, таким образом,  $0.82 - (-0.32) = +1.24$  мВ, что соответствует стандартному изменению свободной энергии в  $221$  кДж/моль, или приблизительно 7 макроэргических связей АТФ.

Восстановленные при гликолизе, в цикле Кребса и других окислительно-восстановительных процессах НАД-зависимые (пиридиновые) дегидрогеназы отдают отнятый от субстратов водород (электроны и протоны) флавопротеидам, которые при посредничестве железо-серных белков и липидорастворимых убихинонов восстанавливают систему цитохромов.

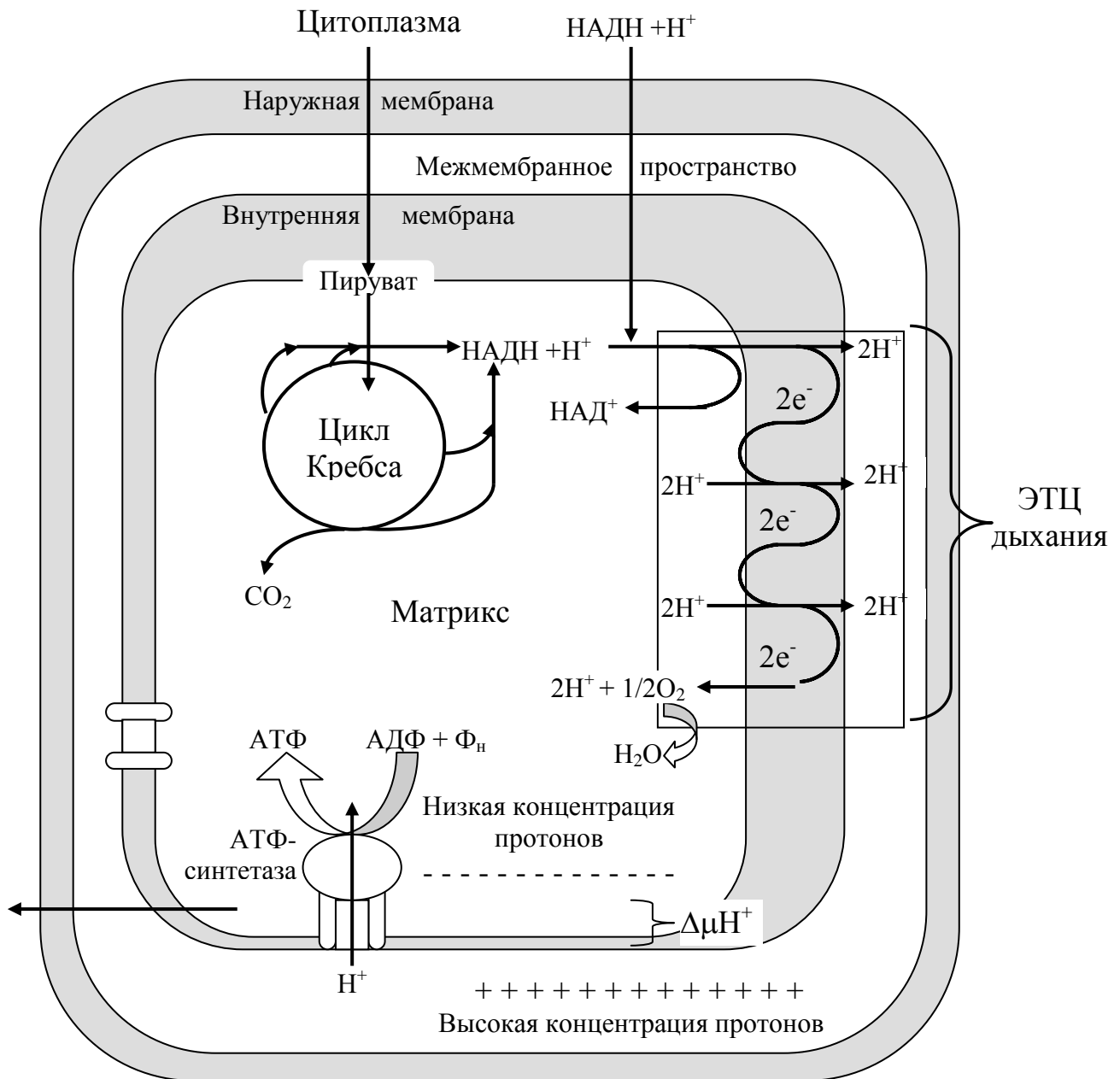


Рис.6. Схема коферментного окислительного фосфорилирования в митохондриях

Цитохромы при участии железо-серных белков восстанавливают цитохромоксидазу. Этот фермент, захватывая из матрикса митохондрии протоны, восстанавливает молекулярный кислород до воды. В этой реакции кислород встречается с отнятым ранее от субстрата водородом.



Итог работы ЭТЦ состоит в сжигании отнятого от окисляемого субстрата водорода до воды. Высвобожденная при этом энергия запасается в форме созданного в процессе транспорта электронов по ЭТЦ градиента активности (концентрации) ионов водорода, направленного перпендикулярно внутренней мембране митохондрии. Иначе говоря, энергия дыхания запасается в форме мембранного электрохимического потенциала протонов -  $\Delta\mu\text{H}^+$ . Таким образом, ЭТЦ дыхания выступает в роли ионного насоса, активно перекачивающего протоны через внутреннюю митохондриальную мембрану (окислительной  $\text{H}^+$ - помпы).

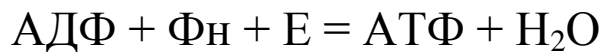
Механизм возникновения мембранного электрохимического потенциала ионов  $\text{H}^+$  (протонного градиента) объясняют следующим образом.

Все участники ЭТЦ дыхания могут быть разделены на две группы: 1) переносящие только электроны, и 2) переносящие одновременно и электроны и протоны. В первую группу входит большинство компонентов ЭТЦ (цитохромы, железо-серные белки и т.д.). Вторая группа представлена дегидрогеназами и липидорастворимыми убихинонами (коэнзим Q). Убихиноны (УХ) свободно диффундируют в липидной фазе мембран как в продольном, так и в поперечном направлениях, играя роль своеобразных извозчиков, челноков, переносящих протоны через мембрану. Особенность убихинонов, как и дегидрогеназ, в том, что их окислительно-восстановительные превращения сопряжены с одновременным присоединением и отдачей и электронов, и протонов.

Восстанавливаются УХ со стороны матрикса, а окисляются с наружной стороны внутренней мембраны. Остальные переносчики перешнуровывают внутреннюю мембрану митохондрии таким образом, что транспорт через нее снаружи вовнутрь митохондрии электронов сочетается с транспортом в обратном направлении и электронов, и протонов. Кроме того, часть протонов захватывается из матрикса цитохромоксида-

зой при восстановлении молекулярного кислорода до воды в заключительной реакции дыхания.

Коферментное окислительное фосфорилирование. Параллельно с транспортом электронов по ЭТЦ дыхания осуществляется сопряженный с ним процесс запасания энергии посредством синтеза на мембране АТФ из АДФ и ортофосфата - коферментное (мембранное) окислительное фосфорилирование:



АТФ синтезируется специфической АТФ-синтетазой, называемой сопрягающим фактором (СФ). На электронно-микроскопических снимках СФ имеет форму грибовидных выростов на внутренней мембране, обращенных "шляпками" в сторону матрикса митохондрии.

Известно несколько гипотез, объясняющих механизм сопряжения окисления и фосфорилирования при дыхании. В настоящее время наибольшее признание получила **хемиосмотическая теория** П. Митчелла - В.П. Скулачева. В соответствии с ней, синтез АТФ на мембранах осуществляется за счет энергии протонов, пассивно движущихся по протонным каналам сопрягающих АТФ-синтетаз по градиенту активности, созданному дыхательной электронно-транспортной цепью. АТФ-синтетазы можно уподобить турбинам теплоэлектростанций, вырабатывающим электроэнергию при прохождении через них водяного пара, а ЭТЦ дыхания - котлам, превращающим воду в пар.

Нарушение сопряжения окисления и синтеза АТФ (разобщение дыхания и фосфорилирования) снижает эффективность запасания энергии и может привести к гибели клетки.

Альтернативные пути электронного транспорта. Наряду с основным путем электронов по ЭТЦ дыхания, заканчивающимся цитохромоксидазой и молекулярным кислородом, в митохондриях возможен обходной (альтернативный) путь, проявляющийся в случаях отравления металлсодержащих пе-

реносчиков ЭТЦ дыхательными ядами (угарным газом, азидами, цианидами и др.). При этом энергетическая эффективность дыхания резко снижается.

Кроме того, и в цитоплазме присутствуют различные окислительные системы, которые могут отдавать отнятые электроны и протоны молекулярному кислороду, то есть выступать в качестве терминальных оксидаз. В этих случаях электроны полностью или частично минуют митохондрии, происходит так называемое «свободное окисление», и эффективность запасания энергии дыхания существенно понижается. К таким системам относятся каталаза, пероксидаза, полифенолоксидаза, аскорбатоксидаза и некоторые другие. В роли акцепторов электронов могут выступать перекиси, нитраты и другие соединения. Значение этих систем состоит в поддержании определенной величины ОВП клетки и ее компонентов, в детоксикации ряда веществ, либо, напротив, повышении их токсичности (фенолы-хиноны), в образовании необходимых предшественников для биосинтеза вторичных веществ.

Иногда энергия дыхания расходуется непосредственно на повышение температуры органов (например, у ароидных во время цветения).

Значение альтернативных путей окисления особенно возрастает в неблагоприятных условиях. Так, флавиновые оксидазы гораздо менее чувствительны к понижению температуры по сравнению с цитохромоксидазой. При механических повреждениях клеток высокая активность полифенолоксидазы и пероксидазы способствует окислению фенолов до хинонов, что повышает устойчивость растения к патогенным микроорганизмам.

## **БРОЖЕНИЕ**

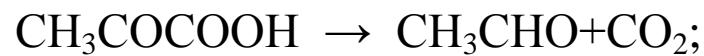
**Брожение** - это внутренний окислительно-восстановительный процесс, при котором акцептором электронов слу-

жит органическая молекула и суммарная степень окисления образующихся продуктов, отличается от степени окисления сбраживаемого вещества. С.П. Костычев выдвинул положение о генетической связи процессов брожения и дыхания. При этом он опирался на следующие факты:

1. У высших растений был найден весь набор ферментов, который катализирует отдельные этапы процесса брожения.
2. При временном попадании в условия анаэробнозиса высшие растения определенное время существуют за счет энергии, выделяющейся в процессе брожения. Правда, поскольку процесс брожения энергетически значительно менее эффективен, в анаэробных условиях рост растений приостанавливается. Кроме того, продукты брожения, в частности спирт, ядовиты, и их накопление приводит к гибели растения.
3. При добавлении к клеткам факультативных анаэробов (дрожжи) полусброженных сахаров интенсивность дыхания у них резко возрастает, следовательно, полусброженные продукты являются лучшим субстратом дыхания по сравнению с неизмененными сахарами.

В настоящее время общепризнано, что первые этапы (гликолиз) протекают одинаково при процессах, как дыхания, так и брожения. В этом и состоит генетическая связь брожения и аэробного дыхания. Поворотным моментом является образование пировиноградной кислоты. В аэробных условиях пировиноградная кислота распадается до  $\text{CO}_2$  и воды в результате декарбоксилирования и цикла Кребса (дыхание), тогда как в анаэробных она преобразуется в различные органические соединения (брожение). Впервые в опытах Пастера было показано, что в присутствии кислорода процесс брожения у дрожжей тормозится и заменяется процессом дыхания. Одновременно резко сокращается распад глюкозы. Это явление оказалось характерным для всех факультативных анаэробных организмов, включая высшие растения, и получило

название эффекта Пастера. Сокращение расхода глюкозы в присутствии кислорода целесообразно, поскольку при дыхательном распаде выход энергии значительно выше, поэтому глюкоза используется более экономно. В зависимости от получаемого продукта различают разные типы брожения. При спиртовом брожении пировиноградная кислота, образовавшаяся в процессе гликолиза, декарбоксилируется с образованием уксусного альдегида при участии фермента пируватдекарбоксилазы, а затем восстанавливается до этилового спирта ферментом алкогольдегидрогеназой:

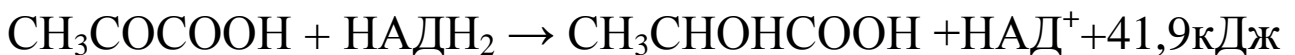


пировиноградная кислота      уксусный альдегид



уксусный альдегид      этиловый спирт

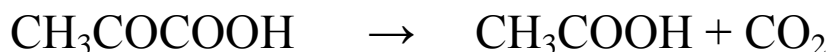
Обе эти реакции не сопровождаются образованием АТФ. В связи с этим выход АТФ при спиртовом брожении такой же, как при гликолизе (первой фазы брожения и дыхания), и составляет две молекулы при распаде 1 моль глюкозы. Разные микроорганизмы осуществляют и разные типы брожения. Так, молочнокислые бактерии накапливают молочную кислоту. При этом пировиноградная кислота восстанавливается до молочной кислоты:



пировиноградная кислота      молочная кислота

Этот тип брожения часто встречается в прорастающих семенах, клубнях картофеля, корнеплодах моркови и свеклы.

Если ПВК подвергается окислительному декарбоксилированию, образуется уксусная кислота.



пировиноградная кислота      уксусная кислота

Путем конденсации она превращается в ацетоуксусную, которая, восстанавливаясь, дает масляную кислоту  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ . При этом энергетический выход составляет 62,8 кДж.

## ДЫХАТЕЛЬНЫЙ КОЭФФИЦИЕНТ (ДК)

Дыхательным коэффициентом называется отношение объема или массы выделенного в процессе дыхания углекислого газа к объему или массе потребленного кислорода:

$$\text{ДК} = \text{M CO}_2 / \text{M O}_2$$

Величина ДК определяется степенью обеспеченности дышащей ткани кислородом (аэрированностью) и типом окисляемого при дыхании субстрата, а также генетическими особенностями и возрастом растения. Если дыхательный субстрат представлен углеводами, ДК равен 1.



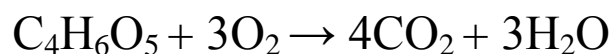
В случае менее окисленных субстратов (белков, липидов, многоатомных спиртов и др.) ДК меньше 1, так как кислорода поглощается больше, чем выделяется углекислого газа. Например, при окислении стеариновой кислоты:



У прорастающих масличных семян ДК меньше 0,5, так как на этот показатель могут влиять и процессы обмена веществ, не имеющие отношения к дыханию. В данном случае часть жирных кислот идет на образование углеводов.

Когда дыхание осуществляется с использованием некоторых ди- и трикарбоновых кислот, например, яблочной, лимонной, более окисленных по сравнению с сахарами, ДК, как и при анаэробнозе, больше 1.

Например, при окислении яблочной кислоты:



В качестве примеров можно привести следующие минимальные значения ДК во время прорастания семян

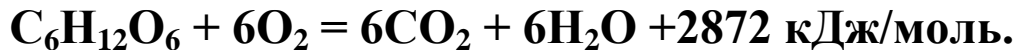
(при 12-25<sup>0</sup>С): кукуруза - 0,73; пшеница – 0,61; ячмень – 0,74; горох – 0,85; подсолнечник – 0,55; лен – 0,30; горчица – 0,49.

## ЭНДОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДЫХАНИЯ. ЭФФЕКТ ПАСТЕРА

Луи Пастер обнаружил, что при обеспечении доступа кислорода к бродящему суслу резко снижаются потребление сахара и выделение углекислого газа при одновременном увеличении биомассы дрожжей - эффект Пастера. Интенсивность и энергетическая эффективность дыхания определяются действием комплекса факторов, как внешних, так и внутренних. В число последних входят наличие и качественный состав дыхательных субстратов, баланс фитогормонов, физико-химические условия, присутствие и активность ферментов и др. При прочих равных условиях интенсивность и качество дыхания зависят в первую очередь от потребности в главном продукте дыхания - АТФ. Чем интенсивнее АТФ расходуется, тем выше в ней потребность, и тем выше отношение АДФ/АТФ. Скорость образования АТФ при дыхании определяется соотношением активностей (концентраций) АТФ и АДФ, и основным механизмом эндогенной (внутренней) регуляции дыхания считают акцепторный контроль дыхания, т.е. зависимость этого процесса от концентрации главного акцептора процесса фосфорилирования - АДФ.

С позиции механизма акцепторного контроля сущность эффекта Пастера объясняется конкуренцией гликолиза и аэробной фазы дыхания за АДФ. В ходе полного аэробного распада одной молекулы глюкозы синтезируется 38 молекул АТФ, тогда как в ходе брожения - только 2, поэтому с энергетических позиций для растения аэробный тип дыхания гораздо выгоднее. Вместе с тем, в растениях нередко аэробное дыхание сочетается с анаэробным. В таких случаях говорят об аэробном, или кислородном, брожении, или об аэробной ферментации.

Итак, суммарное (общее) уравнение процесса дыхания выглядит следующим образом:



В соответствии с ним, интенсивность дыхания можно определить тремя способами: а) по количеству поглощенного при дыхании кислорода, б) по количеству выделенного углекислого газа, в) по количеству израсходованного на дыхание сухого вещества.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

### Определение интенсивности дыхания по количеству выделенной углекислоты (по Бойсен-Йенсену)

Задание. Определить интенсивность дыхания различных растительных образцов. Составить таблицу.

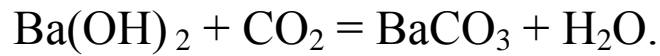
**МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.** Растительный материал, 0.1 н. раствор Ва(ОН)<sub>2</sub>, 0.1 н. раствор НС1, спиртовой раствор фенолфталеина (в капельнице), весы, бюретка, две одинаковые конические колбы и каучуковые пробки к ним (одна пробка с металлическим крючком), куски марли (10\*10 см).

**ПРИНЦИП МЕТОДА.** Под интенсивностью дыхания подразумевают, в зависимости от метода определения, интенсивность поглощения кислорода, выделения углекислого газа либо расходования дыхательного субстрата в расчете на единицу массы (объема) дышащего материала в единицу времени. Соответственно выражают интенсивность дыхания в мкл О<sub>2</sub> / г × час, мг СО<sub>2</sub> / г × час, мг сухого вещества / г × час.

Метод Бойсен-Йенсена основан на определении массы выделенного при дыхании углекислого газа. Для этого навеску исследуемого материала помещают в замкнутый сосуд (колбу), в которую предварительно наливают строго опреде-



ленное количество раствора щелочи. Выделяющаяся в процессе дыхания углекислота реагирует со щелочью, вследствие чего концентрация щелочи уменьшается:



Через определенное время раствор в колбе титруют раствором кислоты для определения непрореагировавшего с  $\text{CO}_2$  остатка щелочи. По разности между результатом холостого определения (все операции проводятся так же, только в колбу не помещается дышащий материал) и опытного находят уменьшение концентрации щелочи, вызванное выделением при дыхании  $\text{CO}_2$ .

К недостаткам данного метода следует отнести недостаточную его чувствительность и снижение концентрации кислорода в ходе экспозиции вследствие замкнутости объема. Продолжительность экспозиции зависит от размера навески и от интенсивности дыхания исследуемого объекта. При очень короткой экспозиции разность между результатами титрования контрольной и опытной колб будет недостоверной. Наоборот, если в колбе останется слишком мало барита, может произойти неполное поглощение  $\text{CO}_2$ .

Желательно подобрать такую экспозицию, чтобы на связывание  $\text{CO}_2$  было израсходовано 20-50% щелочи (если, например, на титрование барита в контрольной колбе пошло 10 мл  $\text{HCl}$ , то на титрование в опытной колбе должно пойти не более 8 и не менее 5 мл).

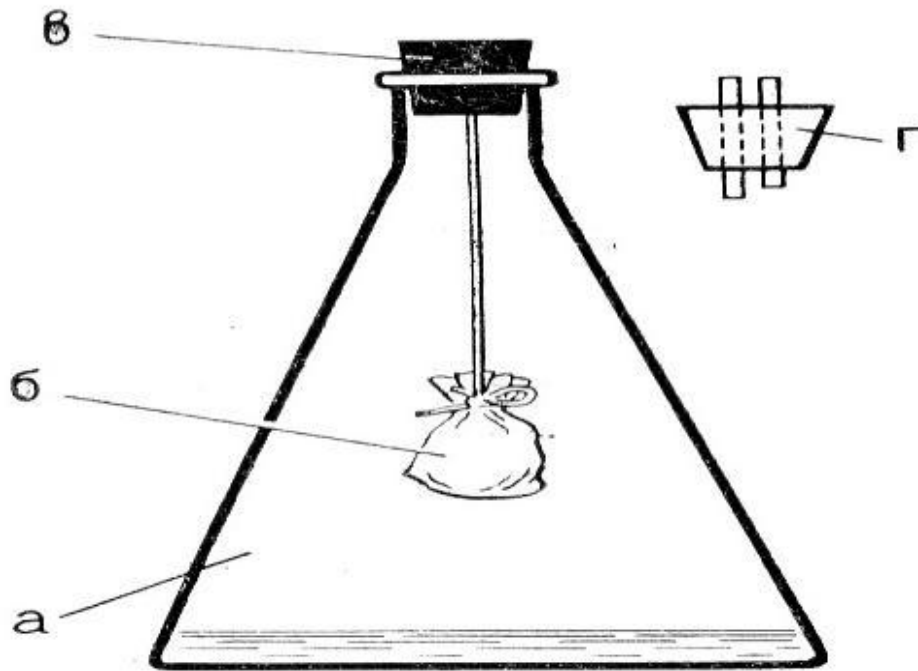


Рис. 7. Прибор для определения интенсивности дыхания:  
 а – колба со щелочью; б – марлевый мешочек с набухшими семенами; в – пробка с крючком; г – пробка со стеклянными трубками (используется при титровании)

**ХОД РАБОТЫ.** Навеску исследуемого материала (5 г) неплотно заворачивают в марлевый мешочек, завязывают его суровой ниткой и прикрепляют к пробке с помощью крючка, вставленного в пробку. Проверяют, свободно ли мешочек проходит через горло колбы и регулируют длину нити, так чтобы расстояние от мешочка до дна колбы составляло около трех сантиметров.

Наливают в колбу из капельницы 2-3 капли раствора фенолфталеина и точно 10 мл (пипеткой Мора) 0.1 н. раствора  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . Быстро опускают прикрепленный к пробке мешочек с материалом в колбу, плотно закрывают ее (вращательным движением), засекают и записывают время начала опыта.

В контрольную (пустую) колбу также наливают такие же количества растворов фенолфталеина и барита и тоже закрывают пробкой.

Образующуюся в ходе опыта на поверхности раствора барита карбонатную пленку необходимо разрушать, периодически осторожно покачивая колбу.

Спустя 1-2 часа мешочек с исследуемым материалом вынимают, фиксируют время окончания эксперимента и сразу титруют 0.1 н. раствором НС1 до исчезновения розовой окраски.

Содержимое контрольной колбы можно титровать уже через 20 минут экспозиции.

Данные наблюдений заносят в таблицу.

Интенсивность дыхания рассчитывают по формуле:

$$X = (a - b) \times 2.2 / p \times t, \text{ где}$$

a - результат титрования содержимого контрольной колбы, мл

b - результат титрования содержимого опытной колбы, мл

2.2 - количество мг  $\text{CO}_2$ , эквивалентное 1 мл 0.1 н. НС1

p - масса навески исследуемого материала, г

t - продолжительность опыта, час

Делают вывод об интенсивности дыхания различных материалов.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2

Определение дыхательного коэффициента.

Задание. Определить величину дыхательного коэффициента на примере прорастающих семян масличных культур.

**МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.** Прибор для определения ДК, состоящий из пробирки (18-20 см), закрытой резиновой пробкой со вставленной микропипеткой или стеклянной трубкой, наклюнувшиеся семена подсолнечника, полоски фильтровальной бумаги (1 на 5 см), смоченной 20-процентным раствором едкого натра, пинцет, линейка.

**ПРИНЦИП МЕТОДА.** (См. также с. 23 настоящих указаний).

Для определения величины ДК исследуемый материал помещают в пробирку, соединенную с градуированной трубкой, в которую введена капля масла или воды. Если объемы обмениваемых при дыхании газов равны, капля в трубке передвигаться не будет. Если же величина ДК меньше или больше единицы, то будет наблюдаться перемещение жидкости в трубке, соответствующее разности между объемами поглощенного  $O_2$  и выделенного  $CO_2$ .

Затем с тем же материалом проводят второй опыт, предварительно введя в пробирку бумажку, смоченную крепким раствором щелочи для поглощения выделяемого при дыхании  $CO_2$ . Скорость передвижения капли в этом случае будет соответствовать объему поглощенного материалом кислорода.

**ХОД РАБОТЫ.** Поместить в пробирку (примерно до половины) проросшие семена подсолнечника или другой масличной культуры, закрыть ее пробкой, в которую вставлена градуированная трубка. Ввести в трубку каплю воды или любого жидкого масла (для этого погрузить наружный конец трубки на несколько секунд в воду или масло и подождать, когда столбик жидкости в 1-1.5 см попадет в трубку).

Когда фронт столбика достигнет первой риски пипетки, засечь время (в минутах) по часам и после десятиминутной экспозиции определить пройденное жидкостью расстояние (А), соответствующее разности между объемами поглощенного кислорода и выделенного углекислого газа.

Вынуть пробку из пробирки с семенами, проветрить пробирку и вложить пинцетом в верхнюю часть пробирки кусочек фильтровальной бумаги, смоченной крепким раствором щелочи. Закрыть пробирку и вновь ввести в трубку столбик жидкости, как и в первом опыте. После достижения мениском первой риски засечь время, и через 10 минут замерить пройденный жидкостью путь (В), соответствующий объему поглощенного при дыхании кислорода.

Рассчитать величину дыхательного коэффициента.

Обозначим объем выделенной углекислоты  $\text{CO}_2$ , а объем поглощенного кислорода  $\text{O}_2$ . Зная величины А и В, находим:

$$A = \text{O}_2 - \text{CO}_2, \quad B = \text{O}_2, \quad \text{CO}_2 = B - A, \quad \text{отсюда}$$

$$\text{ДК} = \text{CO}_2 / \text{O}_2 = (B - A) / B.$$

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3

Определение интенсивности дыхания манометрическим методом на приборе Варбурга.

**ПРИНЦИП МЕТОДА.** Манометрические методы основаны на измерении смещения мениска жидкости в чувствительном манометре под влиянием изменения давления газов в замкнутом сосуде, присоединенном к манометру. Если в замкнутом сосуде под влиянием объекта будет происходить выделение или поглощение газа, то давление внутри сосуда будет изменяться пропорционально изменению парциального давления газа и вызовет смещение мениска жидкости в манометре.

При постоянных температурах и атмосферном давлении смещение мениска будет происходить только под влиянием газового обмена.

Для определения интенсивности дыхания необходимо исключение одного из обмениваемых при дыхании газов, для

чего углекислота, выделяемая при дыхании, поглощается щелочью, помещенной в сосуд с объектом. В этом случае смещение мениска жидкости в манометре будет показывать поглощение кислорода.

Для расчета объема поглощенного кислорода необходимо знать константу сосудов.

Преимуществом манометрического метода является высокая чувствительность прибора, что позволяет работать с малыми навесками дыхательного материала и регистрировать изменение газообмена за короткие промежутки времени. Последнее дает возможность исследовать динамику газообмена.

Дыхание определяется при постоянном объеме газового пространства. Изменение атмосферного давления и температуры корректируется термобарометрами.

**ХОД РАБОТЫ.** Определение поглощенного кислорода.

1. Взять навеску растительного материала (250-1000 мг).
2. В чистые сухие сосудики Варбурга, снабженные центральными стаканчиками, помещают (в главное пространство сосудика) навеску растительного материала.
3. Отмеривают пипеткой в центральный стаканчик 0,2 мл щелочи (20% КОН).
4. Помещают полоску бумаги в щелочной раствор центрального стаканчика.
5. Смазывают соединительный шлиф манометра.
6. Соединяют сосудик с манометром.
7. Помещают приборчик в ванну с постоянной температурой.
8. Качают 15 минут для выравнивания температуры.
9. При открытом кране приводят к отметке 150 манометрическую жидкость в закрытом колене манометра.
10. Закрывают кран.
11. Записывают в таблицу уровень манометрической жидкости в открытом колене.

Включают качание и засекают время. Через 10-15 мин. прибор останавливают, вращением винта приводят уровень

манометрической жидкости в закрытом колене к отметке "150" и снимают показания с открытого колена (данные заносят в таблицу).

Рассчитывают изменение уровня жидкости в открытом колене за время опыта (как правило, отрицательное), вычитают из него поправку термобарометра и определяют интенсивность дыхания по формуле:

$$И = Н \cdot К / t \cdot p , \quad \text{где}$$

И - интенсивность дыхания, мкл  $O_2$  / г сырого вещества за час; Н- изменение уровня жидкости в манометре с учетом показаний термобарометра, мм; К - константа сосуда по  $O_2$ ; t - время, ч, p - масса навески, г.

Таблица

Расчет интенсивности дыхания

Вариант	Время, мин	№ манометра	Навеска, г	Показание открытого колена манометра	Изменение уровня жидкости в манометре	С учетом показания термобарометра, Н	Конс - танта сосуда, $CO_2$	ИД, мкл $O_2$ /г сырого в-ва за час
1	15							
	30							
...	60							
Термобарометр	15							
	30							
	60							

## ВОПРОСЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ

1. Какие органические соединения являются основным дыхательным материалом в клетках растений?
2. Как называется группа ферментов, роль которых состоит в активации водорода дыхательного субстрата, его отнятии от субстрата и переносе на акцептор с более высоким окислительно-восстановительным потенциалом?
3. На какие стадии разделяют процесс дыхания?
4. Сколько молекул АТФ затрачивается в ходе гликолиза при расщеплении одной молекулы глюкозы?
5. Какое соединение является конечным продуктом окисления пировиноградной кислоты в цикле Кребса?
6. Какие значения принимает дыхательный коэффициент у прорастающих семян масличных культур?
7. Какие органические соединения могут использоваться в растительных клетках в качестве дыхательного материала?
8. Какие соединения являются коферментами анаэробных дегидрогеназ?
9. В ходе каких этапов дыхания имеет место субстратное фосфорилирование?
10. Сколько молекул АТФ, синтезируемых в процессе окислительного фосфорилирования, приходится на каждую молекулу НАДН, поступающую в дыхательную цепь?
11. Какой вид имеет суммарное уравнение биохимических превращений в процессе дыхания?
12. Какие соединения являются коферментами аэробных дегидрогеназ?
13. В каких органеллах протекает цикл Кребса?
14. Сколько молекул АТФ, синтезируемых в процессе окислительного фосфорилирования, приходится на каждую молекулу флавиновых дегидрогеназ, участвующих в ЭТЦ дыхания?
15. Чему равен дыхательный коэффициент, если дыхательным субстратом служат углеводы?



16. Сколько молекул АТФ синтезируется в цикле Кребса?
17. Какой показатель дыхания определяется путем учета количества поглощенного кислорода или выделенного углекислого газа в единицу времени единицей площади или массы растения?
18. Какие соединения использует растение на дыхание, если дыхательный коэффициент меньше единицы?
19. В каких компартментах клетки осуществляется гликолиз?
20. Чему равен чистый выход гликолитического субстратного фосфорилирования?
21. Какой показатель дыхания равен объемному или молярному отношению выделенного в процессе дыхания углекислого газа к поглощенному за этот же период времени кислороду?
22. Какое соединение является универсальным источником энергии для процессов жизнедеятельности растений?
23. Какое соединение является простетической группой у цитохромов?
24. Что является движущей силой транспорта электронов по ЭТЦ?
25. Сколько молекул АТФ синтезируется в ходе гликолиза?
26. Сколько молекул АТФ образуется при полном аэробном окислении одной молекулы глюкозы в процессе дыхания?
27. Как называется процесс накопления в АТФ освобождающейся при биологическом окислении энергии, связанный с переносом электронов по дыхательной цепи от восстановленных дегидрогеназ к кислороду?
28. Какое вещество является конечным акцептором водорода, и какое - конечным продуктом окисления при аэробном дыхании?
29. За счет чего в ходе гликолиза происходит активация глюкозы?
30. Какие промежуточные продукты фотосинтеза могут служить субстратами дыхания?

31. Какие органы и ткани растения дышат наиболее интенсивно?
32. Где осуществляется цикл Кребса?
33. Какая доля (%) освобождаемой в процессе дыхания энергии превращается в энергию макроэргических связей АТФ?
34. Какой промежуточный продукт дыхания служит исходным веществом для синтеза жирных кислот?
35. Почему дыхание считают катаболическим процессом?
36. В чем состоит энергетическая сущность дыхания?
37. Как дыхание связано с обменом веществ в клетке?
38. В чем состоят преимущества и недостатки анаэробного дыхания?
39. Каким образом осуществляется регенерация окисленного состояния дегидрогеназ при анаэробном и аэробном дыхании?
40. В чем особенность АТФ и других макроэргических соединений?
41. Почему гликолиз называют подготовительной стадией аэробного дыхания?
42. Что общего между аэробным дыханием и брожением?
43. В чем состоит сущность процесса окисления (восстановления)?
44. В чем сходство и различия между горением и дыханием?
45. В чем состоит сущность эффекта Пастера?
46. Благодаря чему растения имеют возможность запасать выделяющуюся при окислении дыхательных субстратов энергию?
47. Каков механизм коферментного (мембранного) фосфорилирования?
48. Как происходит субстратное окислительное фосфорилирование, в чем его преимущество перед коферментным (мембранным)?
49. Что является причиной возникновения электро-химического потенциала на внутренней мембране митохондрии при дыхании?

50. Какие факторы могут вызвать разобщение окисления и фосфорилирования?
51. Какую роль играют альтернативные пути окисления?
52. Какая оксидаза перерабатывает наибольшее количество кислорода при нормальных условиях жизнедеятельности?
53. Чем аэробные дегидрогеназы отличаются от анаэробных?
54. Какие вещества участвуют в переносе электронов по ЭТЦ?
55. Чем объясняют движение электронов по ЭТЦ?
56. В чем состоит биохимическая сущность цикла ди- и трикарбоновых кислот?
57. Как цикл Кребса связан с белковым и липидным обменами клетки?
58. Кислород воздуха не принимает непосредственного участия в цикле Кребса, тем не менее, последний относят к аэробной фазе дыхания. Почему?
59. Каков основной принцип эндогенной (внутренней) регуляции дыхания растений?
60. В чем состоит сущность акцепторного контроля дыхания?