

บทปฏิบัติการที่ 7

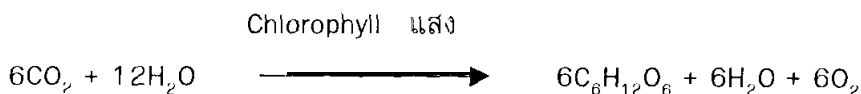
การสังเคราะห์ด้วยแสง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ผู้ปฏิบัติสามารถตรวจสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง
2. เพื่อให้ผู้ปฏิบัติสามารถแยกสารสีชนิดต่างๆ ออกจากใบพืชได้

ความนำ

การสังเคราะห์ด้วยแสง เป็นกระบวนการทางเคมีแสงและทางเคมีชีวะ ซึ่งมีผลทำให้พลังงานแสงจากดวงอาทิตย์ถูกเปลี่ยนมาเป็นพลังงานในรูปของสารเคมีสะสมอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่มีคลอโรฟิลล์เป็นองค์ประกอบโดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งมีชีวิตในกลุ่มพวกพืช กระบวนการนี้มีปัจจัยหลายอย่างเป็นองค์ประกอบ เช่น สารสี(pigment) แสง น้ำ และ คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยสรุปมีดังนี้



สารสีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงมี 3 ประเภทหลัก คือ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) แคโรทีนอยด์(carotenoid) และ ไฟคอบิลิน(phycobillin) แต่ละประเภทมีสีต่างกัน และทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ด้วยแสงต่างกัน โดยทั่วไปสารสีดังกล่าวสามารถรับพลังงานจากแสงได้ และสามารถส่งพลังงานดังกล่าวไปใช้ในกระบวนการทางเคมีโดยตรง หรือโดยทางอ้อม พลังงานดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการทางเคมีชีวะต่อไป สารสีที่มีอยู่ในใบพืชสามารถแยกออกมาได้หลายวิธี วิธีที่ง่ายต่อการปฏิบัติและสามารถทำได้ผลในเวลาจำกัด คือ การแยกโดยระเบียบวิธี **paper chromatography** ซึ่งสามารถแยกสารสีที่มีสีต่างกันชัดเจนได้อย่างน้อย 3-4 ชนิด

ระเบียบวิธี

1. การศึกษาอิทธิพลของแสงและ CO_2 ที่มีต่อกระบวนการการสังเคราะห์ด้วยแสง
วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ สำหรับการทดลอง คือ
 - หลอดทดลองขนาดกว้างประมาณ 15 มม. 4 หลอด
 - น้ำกลั่นหรือน้ำประปา

2. การศึกษาอิทธิพลของสารสีบางชนิดที่มีต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลองมีดังนี้

- ใบพืชสดที่มีสีต่างกัน(เช่น ใบโกศล หรือ ใบถั่วมสม) จากต้นพืชที่ปลูกไว้ในที่มีแสง
- น้ำกลั่นหรือน้ำประปา
- อ่างน้ำหรือถาดอะลูมิเนียม ขนาดประมาณ 1 ฟุต 1 ใบ
- เมทิลแอลกอฮอล์ หรืออะซิโตน หรือเอทิลแอลกอฮอล์ 200 มล.
- บีกเกอร์ขนาด 1,000 มล. 2 ใบ
- เพตริดิช 1 คู่
- สารละลาย I_2/KI
- hot plate หรือเตาแก๊ส 1 ชุด

2.1 เด็ดใบพืชตัวอย่างจากต้นพืชที่ปลูกไว้ในที่มีแสง จำนวน 1 ใบ

2.2 วาดรูปใบพืชตัวอย่าง พร้อมทั้งแสดงตำแหน่งของสีต่างๆ ที่เห็นบนใบ

2.3 นำใบพืชไปต้มน้ำเดือดประมาณ 2-3 นาที แล้วนำขึ้นจากน้ำเดือด

2.4 นำใบพืชที่ต้มแล้ว ไปต้มในแอลกอฮอล์(โดยใส่แอลกอฮอล์ใส่ลงในบีกเกอร์ แล้วนำไปวางลงในอ่างน้ำเดือด หรือนำบีกเกอร์ที่มีแอลกอฮอล์ไปวางบนเตาไฟที่มีเปลวเพราะจะทำให้แอลกอฮอล์ติดไฟได้) ต้มใบพืชในแอลกอฮอล์จนกระทั่งใบมีสีขาวซีด

2.5 นำใบพืชไปวางแผ่ลงในเพตริดิช

2.6 หยดสารละลาย I_2/KI ลงบนใบพืช 3-4 หยดจนทั่วใบ

2.7 สังเกตสีที่เกิดขึ้นบนใบพืช

2.8 วาดรูปของใบตัวอย่างหลังการทดลองเปรียบเทียบกับรูปใบตัวอย่างก่อนการทดลอง

3. การศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลองมีดังนี้

- ใบพืชสดตัวอย่างชนิดเดียวกับที่ใช้ในระเบียบวิธีที่ 2 แต่ต้องเก็บมาจากต้นพืชที่ปลูกไว้ในที่มีตมาแล้วประมาณ 3-7 วัน
- วัสดุและอุปกรณ์อื่น ใช้ร่วมกับระเบียบวิธีที่ 2

3.1 นำใบพืชที่ได้จากที่มีตไปทำการทดลองเช่นเดียวกับระเบียบวิธีที่ 2 ตามลำดับ ในทางปฏิบัติควรทำการทดลองไปพร้อมกันกับการทดลองตามระเบียบวิธีที่ 2 เพื่อลดเวลาที่จะใช้ในการทดลอง เพื่อป้องกันการสับสน ควรทำเครื่องหมายไว้ที่ใบ เช่น ดัดปลายใบพืชที่มาจากที่

มีดอกเล็กน้อย เป็นต้น แล้วจึงนำไปต้มในน้ำเดือด แล้วต้มในแอลกอฮอล์ และทดสอบด้วยสารละลาย I_2/KI ตามลำดับ พร้อมกับใบพืชที่ได้มาจากที่ที่มีแสง

4. การแยกสารสีบางชนิดออกจากใบพืช

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลองมีดังนี้

- ใบพืชสดที่มีสีเขียว 1-2 กรัม
- โกร่งพร้อมที่บิด หรือครกไฟฟ้าขนาดเล็ก ๆ 1 ชุด
- อะซีโตน 10 มล.
- โครมาโตกราฟีคโซลเวนท์ 20 มล. (ใช้ petroleum ether ผสมกับ acetone ในอัตราส่วน 9:1)
- กระดาษกรอง เช่น whatmann # 1
- หลอดทดลองพร้อมจุกคอร์ก 15 มม.
- เข็มหมุด 1 เล่ม
- ก้านไม้ขนาดเล็กปลายแหลม 1 ก้าน
- test tube rack 1 อัน

4.1 การแยกสารสีออกจากใบพืช

นำใบพืชน้ำหนักประมาณ 1-2 กรัมมาฉีกให้เป็นเป็นชิ้นขนาดเล็ก แล้วใส่ลงในโกร่ง เติม acetone ลงไปในโกร่งประมาณ 5-6 มล. ตำใบพืชให้ละเอียด สารสีในใบพืชจะละลายอยู่ใน acetone สารละลายนี้เรียกว่า **acetone extract**

4.2 การเตรียมอุปกรณ์ **paper chromatography**

4.2.1 ตัดกระดาษกรองขนาดยาวประมาณ 10 ซม. กว้างประมาณ 1 ซม. จำนวน 1 แผ่น ตัดปลายกระดาษกรองข้างหนึ่งให้แหลม

4.2.2 ออเข็มหมุดแล้วปักลงที่จุกคอร์ก นำแผ่นกระดาษกรองมาแขวนกับเข็มหมุดแล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองดังรูป โดยให้ปลายกระดาษกรองอยู่เหนือกันหลอดทดลองขึ้นมาเล็กน้อย ทำเครื่องหมายไว้ที่ข้างหลอดทดลองให้ตรงกับปลายกระดาษกรองแล้วนำกระดาษกรองและจุกคอร์กออกจากหลอดทดลอง นำ chromatographic solvent ใส่ลงในหลอดทดลอง โดยให้ระดับผิวของสารสูงกว่าขีดที่ทำเป็นเครื่องหมายไว้ประมาณ 0.5 ซม.

4.3 การแยกสารสีบางชนิด

4.3.1 นำก้านไม้จุ่มลงใน acetone extract แล้วนำไปหยดบนกระดาษกรองให้ห่างจากปลายกระดาษกรองด้านแหลมประมาณ 1-1.5 ซม. แล้วปล่อยให้แห้ง ทำเช่นนี้อีก 2-3 ครั้ง จนกระทั่งขนาดของ จุด acetone extract มีขนาดกว้างประมาณ 0.3-0.5 ซม.

4.3.2 เมื่อ acetone extract บนกระดาษกรองแห้งดีแล้ว นำกระดาษกรองใส่ลงในหลอดทดลอง ให้ปลายกระดาษกรองจุ่มอยู่ใน chromatographic solvent และให้จุด acetone extract อยู่เหนือระดับ chromatographic solvent พอประมาณ นำหลอดทดลองไปตั้งไว้บน test tube rack โดยให้หลอดทดลองตั้งอยู่ในแนวตั้ง และอย่าให้กระดาษกรองสัมผัสกับข้างหลอดทดลอง

4.3.3 ปล่อยให้ chromatographic solvent เลื่อนขึ้นมาตามกระดาษกรองจนกระทั่งแถบสารสีต่างๆ เลื่อนขึ้นมาสูงประมาณ 5-7 ซม. นำกระดาษกรองออกจากหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง

บันทึกผล

1. ให้บันทึกผลการทดลองตามระเบียบวิธีที่ 1 ดังนี้

สารละลาย (น้ำ) ที่เติม phenol red88.....

เวลาที่ใช้ในการทดลอง.....

สารละลายในหลอด A, เปลี่ยนเป็นสี.....

สารละลายในหลอด A, เปลี่ยนเป็นสี.....

สารละลายในหลอด B₁, เปลี่ยนเป็นสี.....

สารละลายในหลอด B₂, เปลี่ยนเป็นสี.....

2. ให้บันทึกผลการทดลองตามระเบียบวิธีที่ 2 ดังนี้

2.1 วาดรูปใบพืชตัวอย่าง พร้อมทั้งแสดงตำแหน่งของสี

ก่อนการทดลอง

หลังการทดลอง

2.2 บันทึกสีของใบพืชที่เปลี่ยนไปลงในตาราง

ก่อนการทดลอง

หลังการทดลอง

สีเขียว

สีเหลือง

สีชมพู

สี.....

สี.....

สี.....

3. ให้บันทึกผลการทดลองตามระเบียบวิธีที่ 3 ดังนี้

3.1 วาดรูปใบพืชตัวอย่าง พร้อมทั้งแสดงตำแหน่งของสี

ก่อนการทดลอง

หลังการทดลอง

3.2 บันทึกสีของใบพืชที่เปลี่ยนไป

ก่อนการทดลอง

หลังการทดลอง

สีเขียว

สีเหลือง

สีชมพู

สี.....

สี.....

สี.....

4. ให้บันทึกผลการทดลองตามระเบียบวิธีที่ 4 ดังนี้
วาดรูปแถบสารสี สีต่างๆ ที่เห็นบนกระดาษกรอง

สรุปและวิจารณ์ผล

แบบฝึกหัดบทปฏิบัติการที่ 7

1. สารละลาย (น้ำ) เริ่มต้นมีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่าง ? เพราะเหตุใด
2. การเป่าอากาศลงในสารละลายของหลอด A_1 และ A_2 เพื่ออะไร ?
3. สารละลายในหลอดทดลอง A_1 และ B_1 เปลี่ยนสีหรือไม่ ? เพราะเหตุใด ?
4. สารละลายในหลอดทดลอง A_2 และ B_2 เปลี่ยนสีหรือไม่ ? เพราะเหตุใด ?
5. ถ้ายึดระยะเวลาทดลองนานออกไปประมาณ 2 วัน โดยคงสภาพการทดลองไว้ตามระเบียบวิธีข้อ 1.9
6. ท่านคิดว่าสารละลายในหลอด A_2 และ B_2 จะเปลี่ยนเป็นสีอะไร ? เพราะเหตุใด ?
7. ทำไมจึงใช้การทดสอบปริมาณแอมโมเนียในใบพืชวัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง
8. สารชนิดใดที่อยู่ในใบพืชที่รับพลังงานจากแสง และสารชนิดใดมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

9. สารสีที่เห็นบนกระดาษกรองมีกี่ชนิด ? อะไรบ้าง ?
10. สารสี สีใดอยู่สูงที่สุด ? เพราะอะไร ?
11. สารสี สีใดอยู่ต่ำที่สุด ? เพราะอะไร ?
12. สารที่อยู่ในใบพืชมีชนิดใดบ้างที่รับพลังงานจากแสงได้ และสารชนิดใดที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงมากที่สุด ?
13. ให้เขียนไดอะแกรมสรุปปฏิกิริยา light reaction และพลังงานที่พืชรับไว้ถูกเก็บอยู่ในสารชนิดใด

บรรณานุกรม

Kaufmann, P. B., J. Labavitch, A. Anderson-Proute and N. S. Ghosheh, 1975

Laboratory Experiments In Plant Physiology Mc. Millan Publishing Co., Inc., New York, pp. 38-39.

Ramalingam, S. T., S. Pereira and C. T. Perira, 1977 **Modern Biology** PEP International Private Ltd., Singapore, pp. 1 '75-I 78.

Shiple, D. D., J. H. Menees, R. A. Kroman and B. H. Carpenter, 1965 **Selected Laboratory Experiments In General Biology** (Revised edition) The National Press, Palo Alto, California, pp. 21 -22.