

## บทปฏิบัติการที่ 8 การหายใจระดับเซลล์

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการหายใจระดับเซลล์แบบไม่ใช้ก๊าซออกซิเจนของยีสต์
2. เพื่อศึกษาการใช้สารยับยั้งการหายใจระดับเซลล์ชนิด sodium fluoride (NaF) และ sodium azide ( $\text{NaN}_3$ )

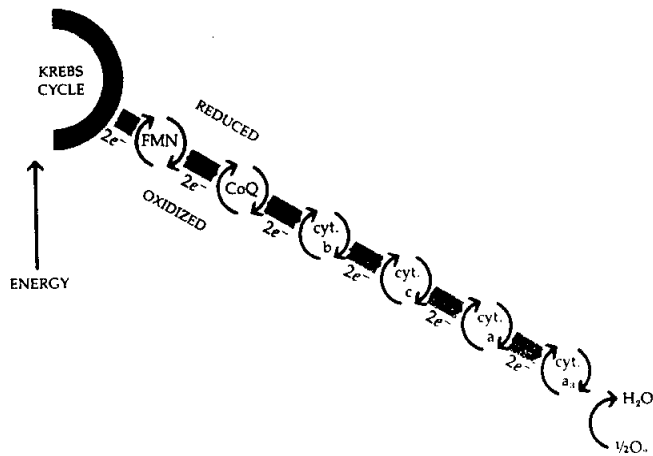
### ความนำ

การหายใจระดับเซลล์เป็นกระบวนการ เมแทบอลิซึม (metabolism) ที่สำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิต ทำให้สิ่งมีชีวิตได้รับพลังงานเก็บไว้ใช้ในรูปของ ATP เพื่อนำไปใช้ในการดำเนินกิจกรรมอย่างอื่นต่อไป การหายใจระดับเซลล์มีกลไกการเก็บพลังงานโดยใช้ ระบบไซโทโครม (cytochrome system) หรือ ห่วงโซ่การหายใจ (respiratory chain) ที่เกิดขึ้นใน ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ห่วงโซ่การหายใจทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนที่ได้จากแหล่งต่างๆ แล้วส่งต่อให้แก่สิ่งที่ใช้รับไฮโดรเจนสุดท้าย ดังนั้นระบบไซโทโครมจึงอาจถูกเรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่า ห่วงโซ่การส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transport chain) ขณะที่อิเล็กตรอนถูกส่งผ่านไปในระบบไซโทโครม พลังงานจากอิเล็กตรอนจะถูกเก็บรวบรวมเอาไว้ในรูปของ ATP กระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปในระบบไซโทโครมเป็น กระบวนการออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction) เนื่องจากมีการรับและถ่ายไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนไปยังสารประกอบและสารไซโทโครมชนิดต่างๆ ดังแสดงไว้ในรูป 8-1 ในกรณีที่สิ่งมีชีวิตใช้ก๊าซออกซิเจนเป็นสารรับหรือรวมตัวกับไฮโดรเจนจากห่วงโซ่การหายใจในขั้นสุดท้ายเรียกว่า การหายใจแบบใช้ก๊าซออกซิเจน (aerobic respiration) สิ่งมีชีวิตบางชนิดมีความสามารถใช้สารหรือสิ่งอื่นมาทำหน้าที่แทนก๊าซออกซิเจนได้ ในกรณีเช่นนี้ จะเรียกว่า การหายใจแบบไม่ใช้ก๊าซออกซิเจน (anaerobic respiration) สิ่งมีชีวิตบางชนิดมีการหายใจได้ทั้งสองแบบ

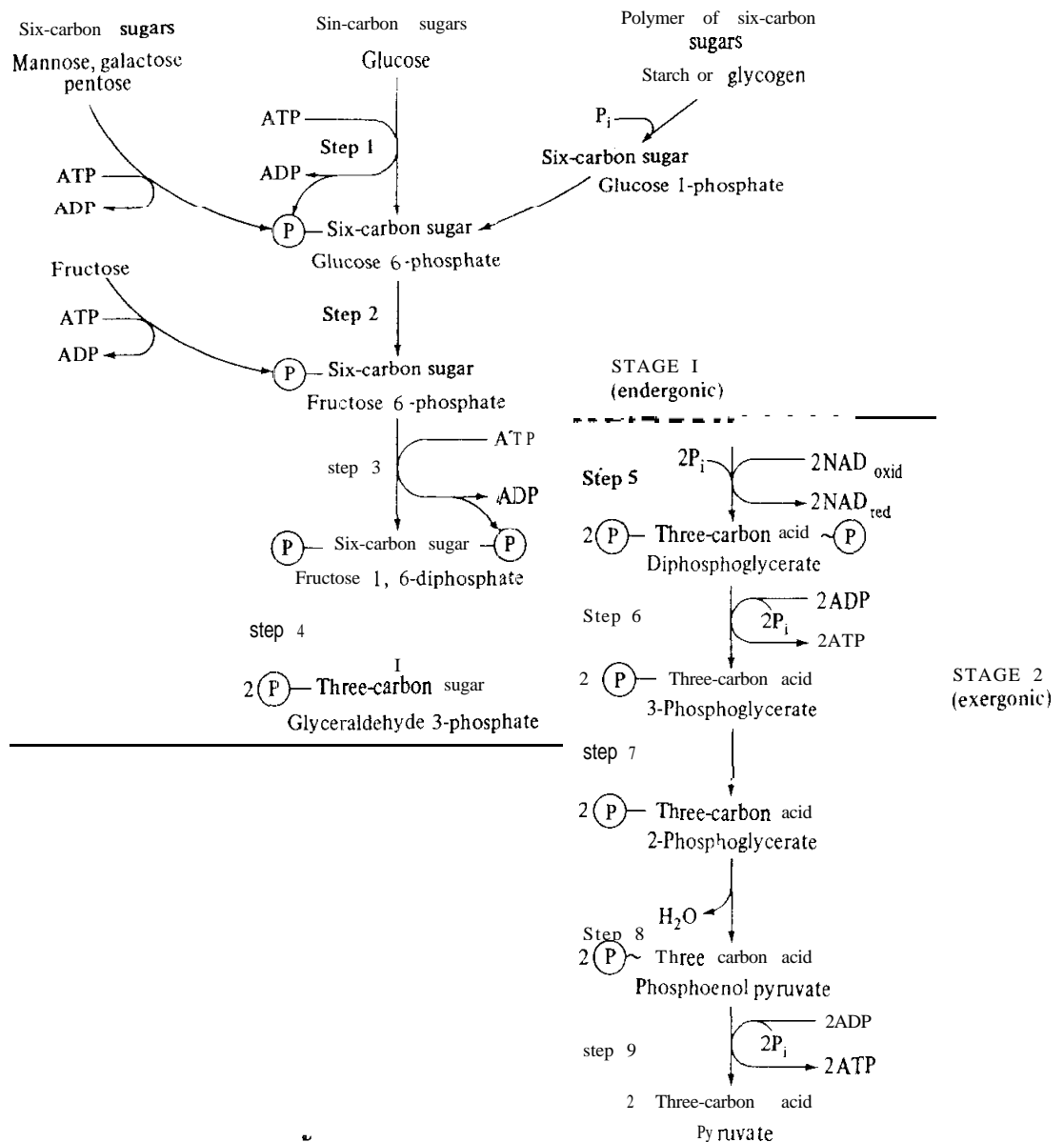
สิ่งมีชีวิตพวก heterotroph เช่น มนุษย์ และสัตว์ เป็นสิ่งมีชีวิตพวกที่ได้พลังงานมาจากการกินสารอินทรีย์และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งของธาตุคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งที่มาของไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนที่จะถูกนำเข้าสู่ห่วงโซ่การหายใจ โดยทั่วไป ไฮโดรเจนได้มาจากการสลายตัวของสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ถ้าใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งของพลังงาน น้ำตาลกลูโคสจะถูกทำให้สลายตัวโดยเอนไซม์หลายชนิด กระบวนการสลายตัวที่สำคัญคือ กระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ซึ่งเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของ

เซลล์ ดังแสดงไว้ในรูป 8-2 ในกระบวนการนี้ น้ำตาลกลูโคสจะถูกทำให้สลายตัวด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่ทำงานต่อเนื่องกันเป็นระบบ แล้วปลดปล่อยไฮโดรเจนออกมาในบางขั้นตอน จนถึงขั้นตอนสุดท้ายได้ กรดไพรูวิก(pyruvic acid) ในบางขั้นตอนของกระบวนการนี้มีการปลดปล่อยพลังงานออกมาด้วย พลังงานส่วนหนึ่งเซลล์จะนำไปใช้ทำให้ ADP รวมตัวกับ กรดฟอสฟอริก( $H_3PO_4$ ) ได้เป็น ATP เก็บไว้ใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ต่อไป พลังงานอีกส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ทำให้ไฮโดรเจนที่ปลดปล่อยออกมานั้น รวมตัวกับ NAD ของเซลล์ ได้เป็น  $NAD \cdot H_2$  เพื่อส่งให้แก่ห่วงโซ่การหายใจ หรือปฏิกิริยาอื่นที่ต้องการไฮโดรเจน

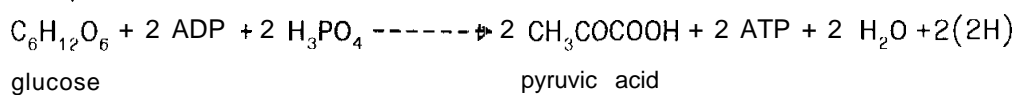
รูป 8-1 แผนผังห่วงโซ่การหายใจ ให้สังเกตขั้นตอนที่มีปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้มีการปลดปล่อยพลังงาน( $e^-$ )มากพอสำหรับนำมาสร้าง ATP



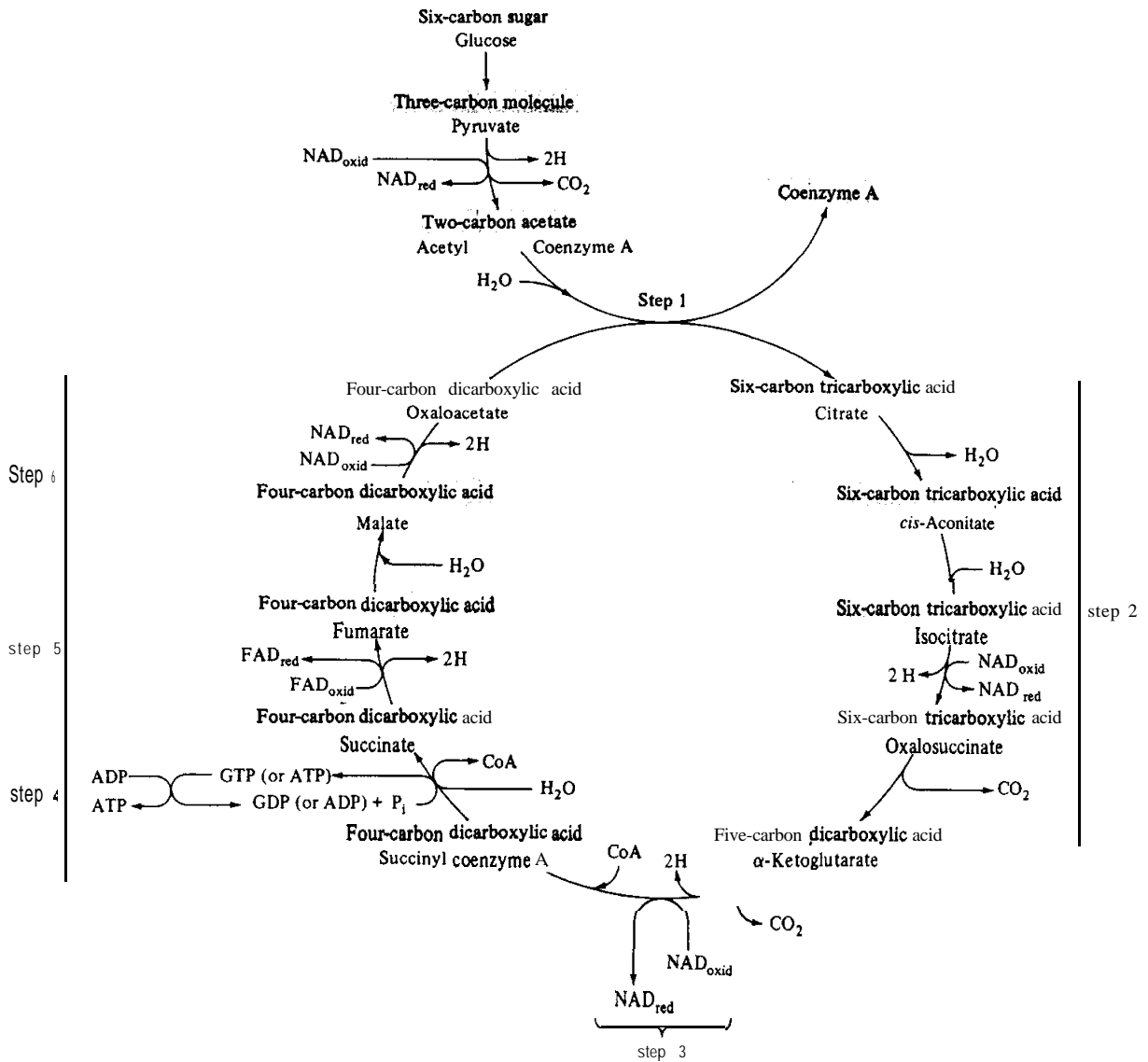
รูป 8-2 แผนผังขั้นตอน The **Embden-Meyerhof pathway** ของกระบวนการไกลโคไลซิส ให้สังเกตขั้นตอนที่ 5 ที่มีตัวรับ H เพื่อนำส่งต่อไปยังขั้นตอนห่วงโซ่การหายใจ และขั้นตอนที่ 6 และ 9 ที่มีการสร้าง ATP



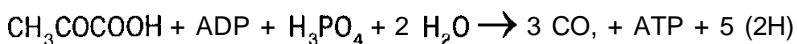
ผลสรุปของปฏิกิริยาทั้งหมด:



รูป 8-3 ก. กรดไพรูวิก(pyruvate)ถูกเปลี่ยนเป็น **acetyl-CoA** ด้วยเอนไซม์ HS-CoA แล้วถูกนำเข้าสู่ ข. วัฏจักรเครบส์(Krebs cycle or citric acid cycle) ให้สังเกตตำแหน่งที่ acetyl-CoA ถูกนำเข้าสู่วัฏจักรเครบส์(ขั้นตอนที่ 1) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของปฏิกิริยาในวัฏจักรนี้ และให้สังเกตขั้นตอนที่ 2, 3, 5, 6 ซึ่งมีตัวรับ H เพื่อนำส่งต่อไปยังห่วงโซ่การหายใจ

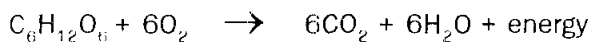


ผลสรุปของปฏิกิริยาทั้งหมด:



สำหรับกรดไพรูวิกที่ได้จากกระบวนการไกลโคไลซิส ต่อมาจะถูกทำให้สลายตัวต่อไปอีก ด้วยระบบเอนไซม์ในกระบวนการที่เรียกว่า **Tricarboxylic acid cycle (Krebs cycle or citric acid cycle)** ซึ่งเกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย ดังแสดงไว้ในรูป 8-3 ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และ ไฮโดรเจน ซึ่งมี **NAD** หรือ **FAD** มาทำหน้าที่เป็นตัวรับตามแต่กรณีว่า ปฏิกิริยาที่ปลดปล่อยไฮโดรเจนออกมานั้นมีพลังงานปลดปล่อยออกมาด้วยมากหรือน้อย ถ้ามากพอก็จะทำให้ไฮโดรเจนรวมตัวกับ **NAD** ได้เป็น **NAD·H<sub>2</sub>** แต่ถ้าไม่มากพอก็จะทำให้ไฮโดรเจนรวมตัวกับ **FAD** ได้เป็น **FAD·H<sub>2</sub>** ทั้ง **NAD·H<sub>2</sub>** และ **FAD·H<sub>2</sub>** มีหน้าที่นำไฮโดรเจนส่งต่อไปยังห่วงโซ่การหายใจ การสลายตัวของกรดไพรูวิกในกระบวนการนี้ ยังทำให้ได้พลังงานซึ่งเซลล์สามารถเก็บไว้ใช้ในรูปของ **ATP** ได้อีกด้วย

การสลายตัวของน้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้สร้างพลังงานในกระบวนการหายใจระดับเซลล์โดยใช้ออกซิเจน สรุปได้ดังสมการ คือ



สารเคมีบางชนิดมีคุณสมบัติยับยั้งการหายใจระดับเซลล์ เช่น **sodium fluoride (NaF)** และ **sodium azide (NaN<sub>3</sub>)** กลไกการยับยั้งคือ ขัดขวางไม่ให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนถูกส่งต่อไปยังห่วงโซ่การหายใจ ปฏิกิริยาการยับยั้งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้สารประเภทอินดิเคเตอร์ (เช่น **methylene blue**) เป็นตัวทดสอบ ในกรณีที่มีการหายใจถูกยับยั้ง ไม่มีการปล่อยไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอน **methylene blue** ไม่ถูกทำให้เปลี่ยนสภาพ จึงคงสีน้ำเงินอยู่ตามปกติ ซึ่งต่างจากสถานะที่มีการหายใจ **methylene blue** จะทำหน้าที่เป็นตัวรับไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอน จึงถูกเปลี่ยนสภาพซึ่งสังเกตได้จากการจางหายไปของสีน้ำเงิน โทนของสี หรืออัตราการจางหายไปของสี ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและประสิทธิภาพของสารยับยั้ง

### วัสดุและอุปกรณ์

1. ยีสต์เซลล์มีชีวิตซึ่งแขวนลอยอยู่ในน้ำ
2. สารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
3. สารละลายสี methylene blue เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์
4. สารละลาย NaF เข้มข้น 0.3 M.
5. สารละลาย NaN<sub>3</sub> เข้มข้น 0.3 M.
6. หลอดทดสอบจำนวน 4 หลอด

7. จุกยางอุดหลอดทดสอบจำนวน 4 จุก
8. หลอดดูดสารเคมี(pipette) ขนาด 5 มล. จำนวน 5 อัน
9. น้ำกลั่น

### ระเบียบวิธี

ปกติยีสต์กับจุลินทรีย์ที่มีการหายใจแบบใช้ก๊าซออกซิเจน แต่สำหรับการทดลองนี้จะใช้ยีสต์ methylene blue เป็นตัวรับไฮโดรเจน แล้วจะกลายเป็น สารไม่มีสี ทำให้สามารถนำมาใช้เพื่อตรวจสอบการหายใจของเซลล์ได้ โดยสังเกตการจางหายไปของสี methylene blue

1. ใช้หลอดดูดสารเคมีดูดสิ่งต่าง ๆ ใส่ลงในหลอดทดสอบตามรายการต่อไปนี้
  - หลอดที่ 1 ยีสต์เซลล์ 3 มล. + น้ำกลั่น 6 มล.
  - หลอดที่ 2 ยีสต์เซลล์ 3 มล. + น้ำตาลกลูโคส 3 มล. + น้ำกลั่น 3 มล.
  - หลอดที่ 3 ยีสต์เซลล์ 3 มล. + น้ำตาลกลูโคส 3 มล. + NaF 3 มล.
  - หลอดที่ 4 ยีสต์เซลล์ 3 มล. + น้ำตาลกลูโคส 3 มล. +  $\text{NaN}_3$  3 มล.
 รวมเป็นปริมาณของเหลวในหลอดทดสอบแต่ละหลอดเท่ากับ 9 มล.
2. หยดสี methylene blue ใส่ลงในหลอดทดสอบหลอดละ 1 หยดเท่าๆ กัน แล้วอุดด้วยจุกยางทันที
3. เขย่าหลอดทดสอบให้สี methylene blue ละลายไปทั่วทั้งหลอด แล้วตั้งทิ้งไว้พร้อมเริ่มจับเวลา
4. สังเกตดูการเกิดฟองก๊าซและความเข้มของสี methylene blue ในหลอดทดสอบภายหลังจากที่ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

### บันทึกผล

ให้นักศึกษารายงานแสดงความเข้มข้นของสี methylene blue และจำนวนฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอดเปรียบเทียบกับกันโดยใช้เครื่องหมาย +++ หมายถึงมีสีเข้มมากหรือมีจำนวนฟองก๊าซเกิดขึ้นมาก ++ หมายถึงมีสีเข้มปานกลางหรือมีจำนวนฟองก๊าซเกิดขึ้นปานกลาง และ + หมายถึงมีสีเข้มน้อยหรือมีจำนวนฟองก๊าซเกิดขึ้นน้อย แต่ถ้าไม่มีสี methylene blue ปรากฏอยู่หรือไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นให้ใส่เครื่องหมาย - ลงไปในตารางต่อไปนี้

ตารางแสดงความเข้มข้นของสี methylene blue และจำนวนฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอดทดสอบภายหลังจากที่ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

หลอดที่	สี methylene blue	จำนวนฟองก๊าซที่เกิดขึ้น
1		
2		
3		
4		

### สรุปและวิจารณ์ผล

ฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอดทดสอบคือ ก๊าซ

.....  
 หลอดที่ 2 มีสี methylene blue เหลือตกค้างอยู่น้อยที่สุดและมีฟองก๊าซเกิดขึ้นมากที่สุด เพราะ .....

.....  
 หลอดที่ 3 และหลอดที่ 4 มีสี methylene blue เข้มมากกว่าหลอดที่ 2 แต่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นน้อยกว่าเพราะ .....

.....  
 หลอดที่ 1 พบว่าสี methylene blue ก็จางหายไปด้วยและมีฟองก๊าซเกิดขึ้นด้วยเนื่องจาก .....

### แบบฝึกหัดบทปฏิบัติการที่ 8

1. ทำไมหลังจากที่หยดสี methylene blue ลงไปในหลอดทดสอบแล้วจึงต้องอุดจุกหลอด ?
2. ถ้านำยีสต์เซลล์ไปต้มให้ตายเสียก่อนแล้วจึงนำมาใช้ในการทดลองนี้ จะทำให้สี methylene blue จางหายไปหรือไม่ ? และมีฟองก๊าซเกิดขึ้นหรือไม่ ? เพราะเหตุใด ?

## บรรณานุกรม

สุพจน์ ไข่เทียมวงศ์ จุลชีววิทยา MI 221 (H) มหาวิทยาลัยรามคำแหง, หมายเลขการพิมพ์ที่ 24433, หน้า 191-217.

สุพจน์ ไข่เทียมวงศ์, ยุพา วรยศ, วราภรณ์ กิจวิริยะ หลักชีววิทยา(**Principle of Biology**) มหาวิทยาลัยรามคำแหง, หมายเลขการพิมพ์ที่ 28168, หน้า 43-54.

Barrett, James M., Peter Abramoff, A. Krishna Kumaran, and William F. Millington, 1986 **Biology** Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1 168 p.

Curtis, Helena, 1979 **Biology 3 rd. edlt.** Worth Publishers Inc., New York, 1043 p.