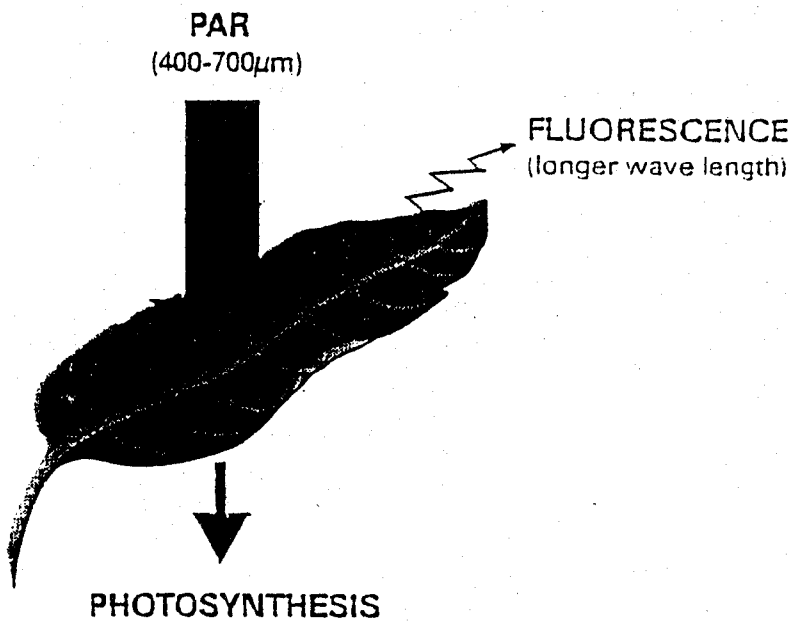
บทปฏิบัติการที่ 6

STUDY ON THE PHOTOCHEMICAL EFFICIENCY OF CHLOROPHYLL OF PLANT UNDER STRESS CONDITION

Chlorophyll Fluorescence



CHLOROPHYLL FLUORESCENCE = PHOTOCHEMICAL EFFECIENCY

Chlorophyll Fluorescence complements gas exchange measurements.

Chlorophyll Fluorescence occurs before gas exchange in photosynthesis.

Chlorophyll Fluorescence is used as an indication to environmental stress.

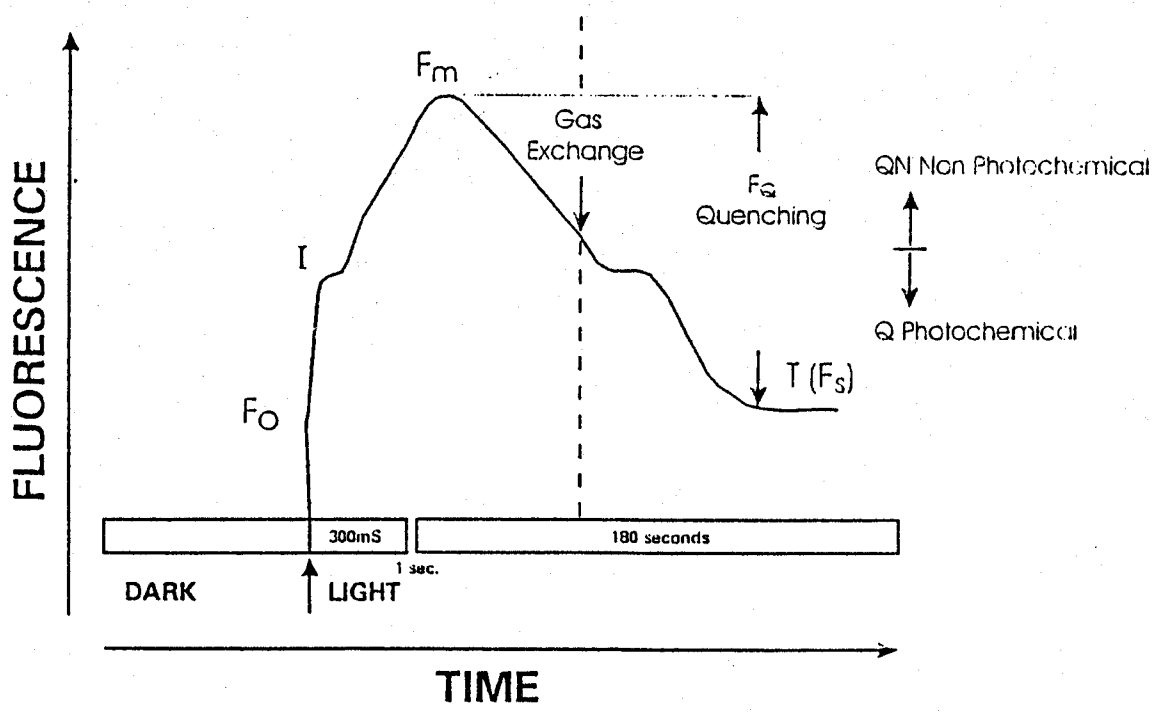
Plant Science Instrumentation

PLANT PHYSIOLOGY

Chlorophyll Fluorescence

Expose Leaf to Saturating PAR:

Kautsky Induction Curve



Fm - Fo = Fv
Important Relative Parameter Fv/Fm (lower Fv/Fm - more plant is stressed)

Fo - Effected by Thermal Damage (heat damage increases Fo).
Fo can also be used to measure chlorophyll content.

Fv - Lowered by heat, freezing and photoinhibition

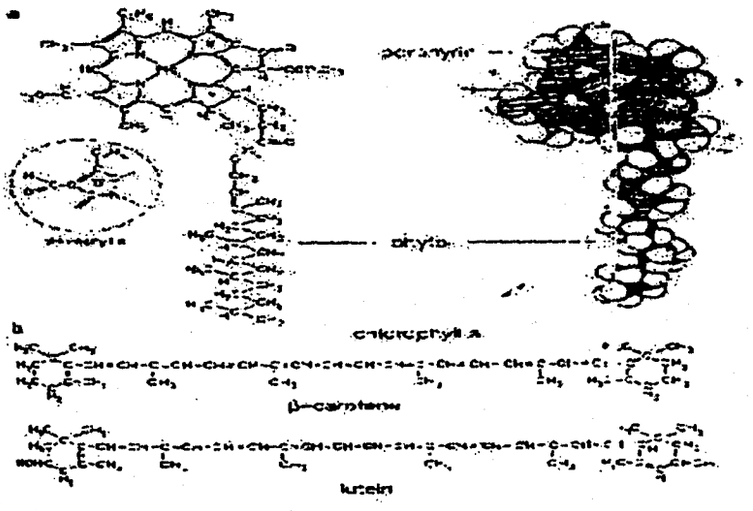
Fm - Decreases by high but not injurious temperatures

Fm/Fo - Lowered by water potential/drought conditions. Shows before wilting.
Relationship to sap flow.

คำนำ

รงควัตถุเป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่ดูดซับพลังงานจากแสงอาทิตย์ รงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงทั้งหมดพบอยู่ในไทลาคอยด์เมมเบรนของคลอโรพลาสต์ รงควัตถุสังเคราะห์ด้วยแสงในพืชและสาหร่ายมีหลายชนิดแบ่งออกได้ เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ คลอโรฟิลล์ คาโรทีนอยด์ และไฟโคบินิน รงควัตถุแต่ละกลุ่มยังแบ่งออกเป็นหลายชนิด แต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการดูดแสงแตกต่างกันไป คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่ทำให้พืชมีสีเขียว ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ คลอโรฟิลล์เอมีสีเขียวแกมน้ำเงิน พบในพืชและสาหร่ายสีเขียว ในใบพืชชั้นสูงพบคลอโรฟิลล์บีอยู่เป็นปริมาณหนึ่งในสามของคลอโรฟิลล์เอ รงควัตถุที่ละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน จะแสดงคุณสมบัติในการดูดแสงแตกต่างกันเล็กน้อย เช่น คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ที่ละลายในอีเธอร์มี absorption maxima ในช่วงแสงสีแดง ที่ 660 และ 643 นาโนเมตรตามลำดับ แต่คลอโรฟิลล์บีที่ละลายในอะซีโตนจะมีค่า absorption maxima ที่ 663 และ 645 นาโนเมตรตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าคลอโรฟิลล์เอที่อยู่ในไทลาคอยด์เมมเบรนยังมีหลายรูปแบบ แต่ละรูปแบบมีช่วงคลื่นที่ดูดแสงได้สูงสุดแตกต่างกันไป

คลอโรฟิลล์เอ มีสูตรโมเลกุล $C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$ ส่วนคลอโรฟิลล์บี มีสูตรโมเลกุล $C_{55}H_{70}N_4O_6Mg$ Fischer เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่ศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลของคลอโรฟิลล์อย่างสมบูรณ์ในปีค.ศ. 1940 โมเลกุลของคลอโรฟิลล์ (รูปที่ 1) ประกอบด้วยโครงสร้างส่วนหัวเรียกว่า พอร์ฟีริน (porphyrin) และส่วนห่างเรียกว่า ไฟทอล (phytol) โครงสร้างพอร์ฟีรินเป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ประกอบด้วยวงแหวน tetrapyrrole ซึ่งมีอะตอมของ Mg อยู่ตรงกลาง นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าพอร์ฟีรินเป็นส่วนที่เกาะอยู่กับโปรตีน ส่วนไฟทอลเป็นส่วนที่ฝังตัวลงในลิปิดไบเลเยอร์



รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของรงควัตถุสังเคราะห์ด้วยแสง คลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี

คาโรทีนอยด์ 2 ชนิด คือ เบตา-แคโรทีน และ ลูเทอิน (Mohr and Schopfer, 1995) เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลืองหรือส้ม พบในสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้ทุกชนิดโครงสร้างของคาโรทีนอยด์เป็น conjugated double bond ดังแสดงในรูปที่ 1 คาโรทีนอยด์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ แคโรทีน (darotene) ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนอะตอม ส่วนซานโทฟิลล์ (xanthophyll) จะมีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย สาหร่ายสีน้ำเงินแกมสีเขียวและสาหร่ายสีแดง มีรงควัตถุอีกพวกหนึ่ง คือ ไฟโคบิลิน (phycobilin) โครงสร้างหลักของไฟโคบิลินเป็น tetraprrole เช่นเดียวกับคลอโรฟิลล์แต่เป็น tetraprrole ที่เป็นแนวตรง ไม่มีอะตอมของ Mg และไม่มีส่วนหางไฟทอล รงควัตถุไฟโคบิลินมี 3 จำพวก คือ ไฟโคอิริทริน(phycoerythrin), ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) และ อัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin)

รงควัตถุแต่ละชนิดสามารถดูดแสงช่วงคลื่นต่าง ๆ ได้ในปริมาณที่แตกต่างกันไปซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของรงควัตถุนั้น ๆ เช่น คลอโรฟิลล์ดูดแสงสีม่วง-น้ำเงินและสีแดงได้ดี แต่ไม่ดูดแสงสีเขียวจึงปล่อยผ่านแสงสีเขียวออกมา รูปที่ 2 แสดง absorption spectrum ของคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี ที่ละลายในอีเธอร์ จะเห็นว่าคลอโรฟิลล์เอดูดแสงสีน้ำเงินในช่วงคลื่น 420 นาโนเมตร และสีแดงช่วงคลื่น 660 นาโนเมตรได้ดีที่สุด ส่วนคลอโรฟิลล์บี ดูดแสงสีน้ำเงินในช่วงคลื่น 435 นาโนเมตร และแสงสีแดงช่วงคลื่น 643 นาโนเมตรได้ดีที่สุด จะเห็นว่าในช่วงแสงสีแดงกราฟของคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี ตัดกันที่ 652 นาโนเมตร สารละลายคลอโรฟิลล์ใน 80% acetone ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรมีค่า absorbance เท่ากับ 34.5 ที่ 652 นาโนเมตร จากค่ามาตรฐานนี้สามารถคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์จากคลอโรพลาสต์ที่แยกออกจากใบพืชได้โดยนำสารละลายคลอโรพลาสต์ที่แยกได้จากใบพืชมา 0.1 มิลลิลิตร เติม80% acetone ลงไปให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปหาค่า absorbance ที่ 652 นาโนเมตร โดยใช้หลอดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่มี light path 1 เซนติเมตร นำค่า absorbance ที่ 652 นาโนเมตร โดยใช้หลอดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่มี light path 1 เซนติเมตร นำค่า absorbance ไปแทนสูตร A = Ecd เมื่อ A = ค่า absorbance ที่ 652 นาโนเมตร E = ค่า extinction coefficient ของคลอโรฟิลล์ซึ่งมีค่า 34.5 ที่ 652 นาโนเมตร d = ระยะทางที่แสงผ่านคือ 1 เซนติเมตร c = ความเข้มข้นของสารละลายคลอโรฟิลล์ที่เจือจางแล้ว แล้วคูณค่า c ที่คำนวณได้ด้วยค่า dilution factor คือ 200 ก็จะได้ค่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในสารละลายตั้งต้น มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คาโรทีนอยด์ดูดแสงได้ดีในช่วงคลื่น 400-500 นาโนเมตร มีพีค (peak) ของการดูดแสงอยู่ 3 พีค (รูปที่ 3) คาโรทีนอยด์เมื่อดูดแสงแล้วสามารถถ่ายเทพลังงานให้แก่คลอโรฟิลล์ได้ นอกจากนี้คาโรทีนอยด์ยังมีบทบาทในการป้องกันคลอโรฟิลล์ไม่ให้ถูกทำลายโดยปฏิกิริยาโฟโตออกซิเดชั่น

ไฟโคอิริทซึ่งดูดแสงสีเขียวได้ดี (รูปที่ 4) จะพบมากในสาหร่ายสีแดงซึ่งอาศัยอยู่ใต้ทะเลลึกซึ่งมีแสงสีเขียวสองผ่านลงไปได้มากกว่าแสงสีอื่น ๆ ส่วนสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่อาศัยอยู่บนพื้นดินหรือบริเวณผิวน้ำจะมีรงควัตถุไฟโคไซยานินและอัลโลไฟไซยานิน ซึ่งดูดแสงสีแดงได้ดี จากการศึกษาในสาหร่ายสีแดง Porphyridium cruentum พบว่ารงควัตถุพวกไฟโคบิลินสามารถดูดรับแสงช่วงที่คลอโรฟิลล์ดูดได้ไม่ดี และถ่ายทอดพลังงานต่อไปเป็นทอด ๆ ให้กับคลอโรฟิลล์เอ ในทิศทางดังนี้ คือ ไฟโคอิริทริน → ไฟโคไซยานิน

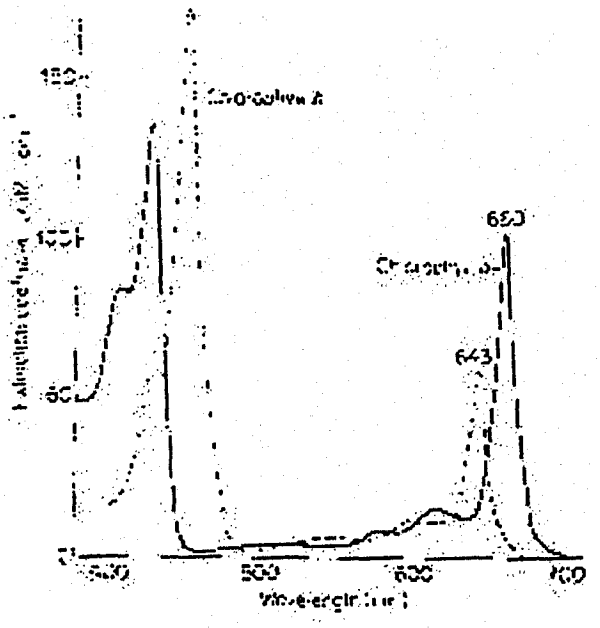
→ อัลโลไฟโคไซยานิน → การที่สิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้มีรงควัตถุหลายชนิดที่สามารถดูดแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ กันก็เป็นการปรับตัวให้ใช้แสงที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

แสงและการดูดแสงโดยรงควัตถุ

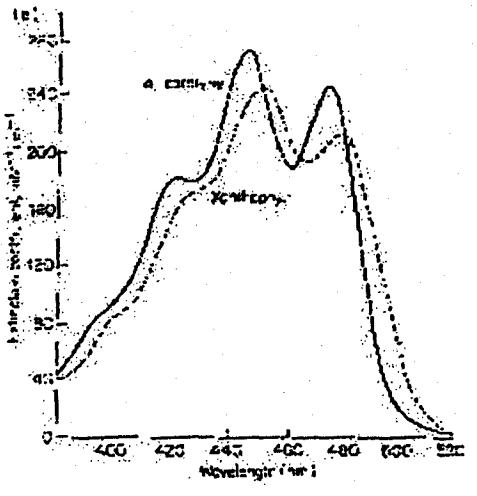
พลังงานแสง

แสงเป็นพลังงานที่มีคุณสมบัติเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งตาของมนุษย์สามารถมองเห็นได้ (Visible light) พลังงานที่เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าซึ่งแผ่รังสีมาจากดวงอาทิตย์ มีอยู่หลายรูปแบบได้แก่ รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ รังสีอัลตราไวโอเล็ต แสง รังสีอินฟราเรด และคลื่นวิทยุ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าทุกชนิดเดินทางด้วยความเร็วเท่ากัน คือ 3×10^8 m s^{-1} แต่จะมีความถี่ (frequency) และความยาวคลื่น (wavelength) แตกต่างกันไป คลื่นที่มีความถี่สูงจะมีพลังงานสูงและมีความยาวคลื่นสั้น ส่วนคลื่นที่มีความถี่ต่ำจะมีพลังงานต่ำและมีความยาวคลื่นมาก คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่เป็นคลื่นสั้นและเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เช่น รังสีเอกซ์ และรังสีอุลตราไวโอเล็ต จะไม่สามารถผ่านชั้นบรรยากาศของโลกเข้ามาได้ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่ตกมาถึงพื้นผิวโลกประกอบด้วย รังสีอัลตราไวโอเล็ตบางส่วนและแสง (Visible light) ซึ่งมีความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-775 นาโนเมตร และรังสีอินฟราเรด ซึ่งมีความยาวคลื่นตั้งแต่ 800-3,000 นาโนเมตร (รูปที่ 8) แสงที่พืชสามารถดูดไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้แก่ แสงที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-775 นาโนเมตร ซึ่งนักสรีรวิทยานิยม เรียกว่า **photosynthetically active radiation (PAR)**

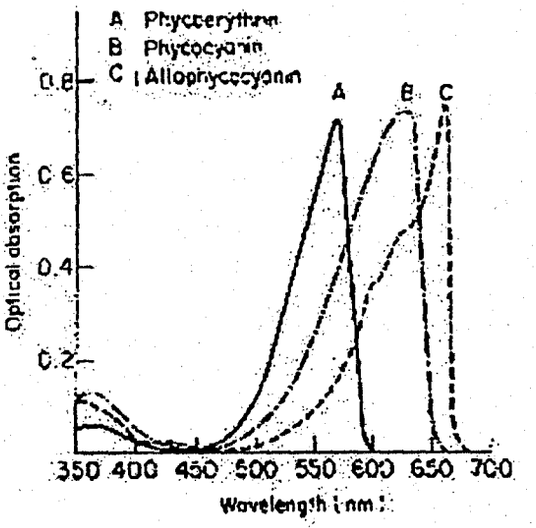
หน่วยที่ใช้ในการวัดแสงนั้นมีหลายหน่วยขึ้นอยู่กับเครื่องมือที่ใช้วัด ในสมัยก่อนนักสรีรวิทยาของพืชใช้เครื่องมือวัดแสงแบบเดียวกับที่ช่างถ่ายรูปใช้ในการวัดความสว่าง มีหน่วยเป็นฟุตแคนเดิ้ล (foot candle, ft-c) หรือ ลักซ์ (lux) โดย 1 ฟุตแคนเดิ้ลมีค่าเท่ากับ 10.76 ลักซ์ ต่อมาได้มีการพัฒนาเครื่องมือที่สามารถวัดแสงออกมาเป็นหน่วยพลังงานต่อพื้นที่ต่อเวลา (irradiance) เช่น Joule m^{-2} s^{-1} (Wm^{-2}) หรือ cal m^{-2} s^{-1} โดย Wm^{-2} = Joule m^{-2} s^{-1} = 2.389×10^{-5} cal m^{-2} s^{-1} ต่อมานักวิทยาศาสตร์ทราบว่าการดูดแสงของรงควัตถุนั้นเกี่ยวข้องกับจำนวนโฟตอน (photon) ไม่ใช่ปริมาณพลังงาน นั่นคือ อิเลคตรอน 1 อนุภาคถูกกระตุ้นโดยแสง 1 โฟตอน เช่น ในกรณีของคลอโรฟิลล์ซึ่งดูดได้ทั้งแสงสีแดงและสีน้ำเงิน แสงสีน้ำเงิน 1 โฟตอน มีผลกระตุ้นอิเลคตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ได้ 1 อนุภาคเช่นเดียวกับแสงสีแดง 1 โฟตอน ถึงแม้ว่าแสงสีน้ำเงินจะมีพลังงานประจำโฟตอน (quantum energy) มากกว่าแสงสีแดงก็ตาม ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเครื่องมือที่เรียกว่า quantum flux meter ซึ่งวัดจำนวนโฟตอนของแสงที่มีความยาวคลื่นช่วง 400-700 นาโนเมตรต่อพื้นที่ต่อเวลา (photon flux density) เช่นแสงแดดในเวลาเที่ยงวันในวันที่ไม่มีเมฆหมอก มีค่า photon flux density ประมาณ 1,800 μmol m^{-2} s^{-1} หมายความว่าในขณะนั้นมีแสงที่มีความยาวคลื่นระหว่าง 400-700 นาโนเมตร ตกลงบนพื้นที่ 1 ตารางเมตร เป็นจำนวน 1,800 μmol photon ในเวลา 1 วินาที (1 mol photon = 6.02×10^{23} photon)



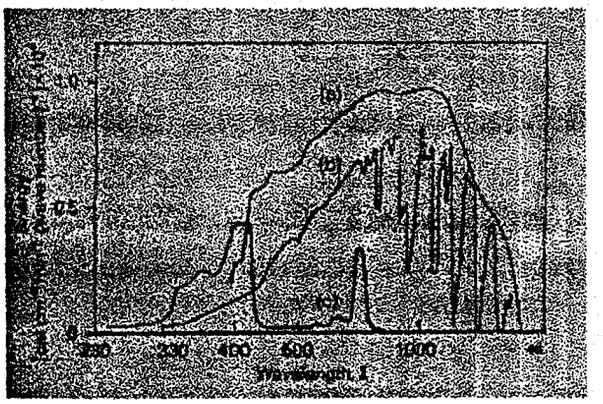
รูปที่ 2 absorption spectrum คลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี (Hall and Rao, 1994)



รูปที่ 3 absorption spectrum ของแอลฟา-แคโรทีนและซานโทฟิลล์ (Hall and Rao, 1994)



รูปที่ 4 absorption spectrum ของไฟโคอิริทริน ไฟโคไซยานิน และอัลโลไฟโคไซยานิน (Hall and Rao, 1994)

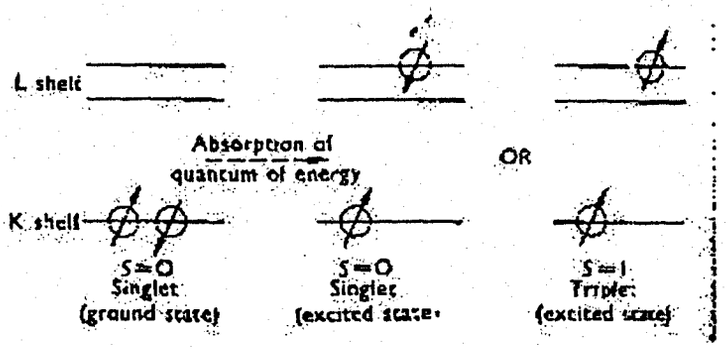


รูปที่ 5 สเปคตรัมของรังสีจากดวงอาทิตย์ (b) สเปคตรัมของรังสีที่ตกถึงพื้นผิวโลก (c) absorption spectrum คลอโรฟิลล์เอ (Taiz and Zieger, 1991)

การดูดแสงและการถ่ายทอดพลังงานโดยคลอโรฟิลล์

การที่แสงจะมีบทบาทต่ออะตอมหรือโมเลกุลของสารใด ๆ นั้น แสงจะต้องถูกดูดโดยอะตอมหรือโมเลกุลของสารนั้น ตามกฎของไอน์สไตล์กล่าวว่าสารแต่ละโมเลกุล สามารถดูดแสงได้ครั้งละ 1 โฟตอน และแสงโฟตอนนั้นจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเลคตรอนเพียงหนึ่งอนุภาคในโมนั้น นั่นคือ อิเลคตรอนจะเคลื่อนที่จากวงโคจรเดิมที่เสถียร ซึ่งเรียกว่าอยู่ในสภาวะพื้น (ground state) ไปโคจรในวงโคจรที่อยู่ห่างนิวเคลียสออกไปเรียกว่า อิเลคตรอนอยู่ในสภาวะกระตุ้น (excited state) ในกรณีที่อิเลคต

รอนที่ถูกกระตุ้นนั้นอยู่กันเป็นคู่ในสภาวะพื้น อิเลคตรอนอยู่สภาวะพื้น อิเลคตรอนคู่นั้นจะหมุนรอบตัวเอง (spin) ในทิศทางตรงข้ามกันทำให้มีค่า electronic spin รวมเป็นศูนย์ (S = ½ - ½ = 0) เรียกว่าอะตอมอยู่ในสภาวะ ground singlet state เมื่อดูดพลังงานจากแสง 1 โฟตอน อิเลคตรอน 1 ใน 2 อนุภาคจะถูกกระตุ้นให้ออกไปโคจรในวงโคจรที่ห่างนิวเคลียสออกไป ถ้าอิเลคตรอนตัวที่ถูกกระตุ้นยังคงหมุนรอบตัวเองในทิศทางเดิม ทำให้ค่า electronic spin เป็นศูนย์เท่าเดิม เรียกว่า อิเลคตรอนอยู่ในสภาวะ excited singlet state แต่ถ้าอิเลคตรอนตัวนั้นหมุนกลับทิศทาง คือหมุนในทิศทางเดียวกับคู่ของมัน จะทำให้มีค่า electronic spin เท่ากับ (S = ½ + ½ = 1) เรียกว่าอิเลคตรอนอยู่ในสภาวะ **triplet excited singlet** ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งแสดงสถานะพลังงานระดับต่าง ๆ ของอะตอมของฮีเลียม



รูปที่ 6 ระดับพลังงานของอิเลคตรอนในอะตอมของฮีเลียม (Hall and Rao, 1994)

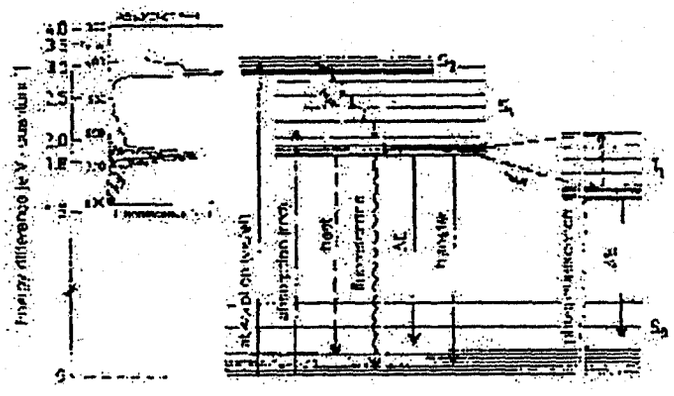
คลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่มีอิเลคตรอนจำนวนมากสามารถดูดพลังงานแสงได้ จากการศึกษาพบว่าอิเลคตรอนที่ดูดรับพลังงานแสง ได้แก่ อิเลคตรอนที่ใช้ในการสร้างพันธะโควาแลนท์ใน double bond ของโครงการสร้างพอร์ฟีนิน เนื่องจากอิเลคตรอนแต่ละอนุภาคมีพลังงานที่สภาวะพื้นที่ไม่เท่า เมื่อเขียนไดอะแกรมแสดงระดับพลังงานของคลอโรฟิลล์ในสภาวะพื้นจึงเขียนแทนด้วยเส้นขนานหลายเส้น (S_0 ในรูปที่ 7) และเมื่อคลอโรฟิลล์แต่ละโมเลกุลมีอิเลคตรอนหลายอนุภาคที่สามารถดูดพลังงานได้ และอิเลคตรอนแต่ละอนุภาคมีค่าความแตกต่างระหว่างพลังงานในสภาวะพื้นและสภาวะกระตุ้นแตกต่างกันไปทำให้คลอโรฟิลล์สามารถดูดแสงได้หลาย ๆ ช่วงคลื่น หรือดูดโฟตอนที่มีพลังงานต่าง ๆ กันได้ ทำให้เกิดแถบดูดแสง (absorption band) ขึ้น 2 บริเวณใหญ่ ๆ คือ บริเวณหนึ่งในช่วงแสงสีน้ำเงินที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-450 นาโนเมตร และอีกบริเวณหนึ่งในช่วงแสงสีแดงระหว่าง 640-700 นาโนเมตร อิเลคตรอนที่ดูดแสงสีน้ำเงินจะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานอยู่ในระดับ 2^{nd} singlet excited state (S_2 ในรูปที่ 7) ทั้งนี้เพราะแสงสีน้ำเงินมีพลังงานประจำโฟตอนสูงกว่าแสงสีแดง อย่างไรก็ตามอิเลคตรอนในสภาพ 2^{nd} singlet excited state จะเกิดการคายพลังงาน (deexcitation) ออกไปในรูปของความร้อนในเวลาอันรวดเร็วเพียง 10^{-12} วินาที แล้วลดระดับลงมาอยู่ที่ 1^{st} singlet excited state (S_1 ในรูปที่ 7) ดังนั้นแสงสีน้ำเงินถึงแม้จะมีพลังงานสูงกว่าแสงสีแดง แต่ก็มีผลต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงเท่า ๆ กับแสงสีแดง เพราะพลังงานส่วนนึ่งสูญเสียไปอย่างรวดเร็วก่อนที่จะถูกนำไปใช้ใน

กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจาก 1st และ 2nd singlet excited state แล้ว จากการศึกษาการดูดและคายพลังงานโดยสารละลายคลอโรฟิลล์ ยังพบว่าคลอโรฟิลล์ในสภาวะกระตุ้นมีระดับพลังงานอีกระดับหนึ่งเรียกว่า triplet excited state (T_1) เกิดขึ้นเมื่ออิเลคตรอนใน 1st singlet excited state ปลดปล่อยพลังงานออกไปเล็กน้อยพร้อมกับเปลี่ยนทิศทางการหมุนรอบตัวเองมาหมุนในทิศทางเดียวกับคู่ของมัน อิเลคตรอนอยู่ในสภาวะ 1st singlet excited state (S_1) เป็นเวลา 10^{-9} ถึง 10^{-6} วินาที ก็จะกลับสู่สภาวะพื้น ส่วนอิเลคตรอนใน triplet excited state (T_1) ใช้เวลานานถึง $10^{-2} - 2$ วินาที ก่อนที่จะกลับสู่สภาวะพื้น

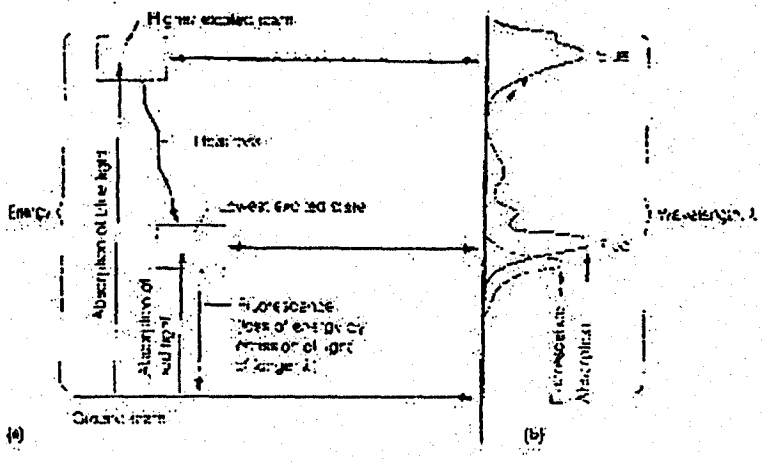
สภาวะกระตุ้น excited state เป็นสภาวะที่ไม่เสถียร อิเลคตรอนจะต้องคายพลังงานออกสู่สิ่งแวดล้อมเพื่อกลับสู่สภาวะพื้น การคายพลังงานนี้เรียกว่า **de-excitation** ซึ่งสามารถเกิดได้หลายรูปแบบดังแสดงในรูป 8 ได้แก่ รูปของความร้อนซึ่งแผ่กระจายไปทั่วอะตอมหรือโมเลกุลทำให้เกิดการหมุนหรือสั่นสะเทือนของโมเลกุล การคายพลังงานในรูปความร้อนไม่มีประโยชน์ต่อการสังเคราะห์ด้วยแสง และอิเลคตรอนในสภาวะกระตุ้นอาจคายพลังงานออกมาในรูปของแสง ซึ่งมี 2 แบบ คือ **ฟลูออเรสเซนซ์** (fluorescence) กับ **ฟอสฟอเรสเซนซ์** (phosphorescence) ฟลูออเรสเซนซ์เกิดขึ้นเมื่ออิเลคตรอนใน 1st singlet excited state คายพลังงานออกมาในรูปของแสง แสงฟลูออเรสเซนซ์นี้จะมีความยาวคลื่นยาวกว่า (มีพลังงานต่ำกว่า) แสงที่อิเลคตรอนดูดรับเข้าไปตอนแรก เนื่องจากพลังงานส่วนหนึ่งถูกถ่ายเทไปให้ส่วนอื่น ๆ ของโมเลกุล ก่อนที่จะปลดปล่อยออกมาในรูปของแสง ในรูปที่ 9 (b) ซึ่งแสดงกราฟการดูดแสง (absorption spectrum) ของคลอโรฟิลล์เอ (เส้นหนัก) และกราฟการคายฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence emission spectrum) (เส้นจุดไข่ปลา) จะเห็นว่าพลังงานที่อิเลคตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เอปลดปล่อยออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนซ์นั้นมีความยาวคลื่นตั้งแต่ 650-750 นาโนเมตร ซึ่งเป็นแสงสีแดงเข้มมีความยาวคลื่นยาวกว่า (พลังงานต่ำกว่า) แสงสีแดงที่ดูดเข้าไป เราสามารถสังเกตปรากฏการณ์ ฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายคลอโรฟิลล์ได้โดยวิธีง่าย ๆ โดยนำสารละลายคลอโรฟิลล์เข้มข้นไปวางใกล้หลอดไฟ แล้วมองดูสารละลายคลอโรฟิลล์ในทิศทางที่ให้แสงตกกระทบสารละลายแล้วสะท้อนมาสู่ตาเรา จะมองเห็นแสงฟลูออเรสเซนซ์สีแดงเข้มซึ่งคลอโรฟิลล์ใน 1st singlet excited state ปลดปล่อยออกมาเพื่อกลับสู่สภาวะพื้น ส่วนฟลูออเรสเซนซ์เกิดขึ้นเมื่ออิเลคตรอนใน excited triplet state คายพลังงานออกมาเมื่อกลับสู่สภาวะพื้น เป็นแสงที่มีความยาวคลื่นยาวกว่าฟลูออเรสเซนซ์

ฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์เป็นรูปแบบของพลังงานซึ่งนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงไม่ได้ แต่การศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติฟลูออเรสเซนซ์ของรงควัตถุมีประโยชน์เกี่ยวกับการศึกษาการถ่ายทอดพลังงานจากรงควัตถุชนิดหนึ่งในระบบแสงไปให้รงควัตถุชนิดหนึ่ง ตัวอย่างเช่น ถ้านำคลอโรฟิลล์เอ กับคลอโรฟิลล์บี มาผสมกันในตัวทำละลาย แล้วให้แสงเฉพาะความยาวคลื่นที่คลอโรฟิลล์บีดูดได้ดีมาก แต่คลอโรฟิลล์เอดูดได้น้อย แล้ววัดปริมาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งออกมาที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ปรากฏว่า สเปคตรัมของฟลูเรสเซนซ์ (fluorescence spectrum) ที่ปรากฏออกมานั้นเป็นลักษณะฟลูออเรสเซนซ์ของคลอโรฟิลล์เอ ไม่ใช่คลอโรฟิลล์บี แสดงว่าคลอโรฟิลล์บี ดูดแสงเข้าไปแล้วเกิด excitation และ de-excitation และพลังงานที่คลอโรฟิลล์บี ปลดปล่อยออกมาขณะเกิด de-excitation ถูกถ่ายทอดไปให้คลอโรฟิลล์เอ อย่างมีประสิทธิภาพโดยกระบวนการ inductive resonance ทำให้เกิด excitation และ de-excitation ของคลอโรฟิลล์เอ ซึ่งปลด

ปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในช่วงคลื่นซึ่งเป็นคุณลักษณะเฉพาะของคลอโรฟิลล์เอ โดยวิธีการนี้นักวิทยาศาสตร์สามารถศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายทอดพลังงานระหว่างรงควัตถุชนิดต่าง ๆ ในระบบแสง ซึ่งอาจสรุปได้ว่าในระบบแสงของพืชและสาหร่าย การถ่ายทอดพลังงานเกิดในทิศทางจา คาโรทีนอยด์ ไปยังคลอโรฟิลล์บี ไปยังคลอโรฟิลล์เอ และศูนย์กลางปฏิกิริยา (reaction center) ส่วนสาหร่ายสีแดง เช่น Porphyridium cruentrum การถ่ายทอดพลังงานจะเป็นไปในทิศทางจาก ไฟโคอิริทริน → ไฟโคไซยานิน → อัลโลไฟโคไซยานิน → คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์เอ ที่เป็นศูนย์กลางปฏิกิริยา ดังนั้นพืชและสาหร่ายจึงสร้างรงควัตถุเสริมหลาย ๆ ชนิด ซึ่งสามารถดูดแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อมที่พืชและสาหร่ายนั้น ๆ อาศัยอยู่รงควัตถุเสริมเหล่านั้นเก็บเกี่ยวพลังงานจากแสงช่วงคลื่นต่าง ๆ แล้วส่งพลังงานต่อกันเป็นทอด ๆ จนถึงคลอโรฟิลล์เอที่ทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางปฏิกิริยา ดังนั้นพืชและสาหร่ายจึงสร้างรงควัตถุเสริมหลาย ๆ ชนิด ซึ่งสามารถดูดแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อมที่พืชและสาหร่ายนั้น อาศัยอยู่รงควัตถุเสริมเหล่านั้นเก็บเกี่ยวพลังงานจากแสงช่วงคลื่นต่าง ๆ แล้วส่งพลังงานต่อกันเป็นทอด ๆ จนถึงคลอโรฟิลล์เอที่ทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางปฏิกิริยาซึ่งพลังงานนี้ไปกระตุ้นให้เกิดการถ่ายทอดอิเลคตรอนจากศูนย์กลางปฏิกิริยาของระบบแสง 2 และ ระบบแสง 1 ไปยัง nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADP^-$) ทำให้$NADP^+$ ถูกรีดิวซ์เป็น NADPH ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีกำลังรีดิวซ์สูง ซึ่งเป็นพาอิเลคตรอนไปรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นคาร์โบไฮเดรตต่อไป



รูปที่ 7 ไดอะแกรมแสดงระดับพลังงานของคลอโรฟิลล์ S_0 = ground state; S_1 = 1ST excited singlet state; S_2 = 2nd excited singlet state; T_1 = triplet excited state. (Mohr and Schopfer, 1995)

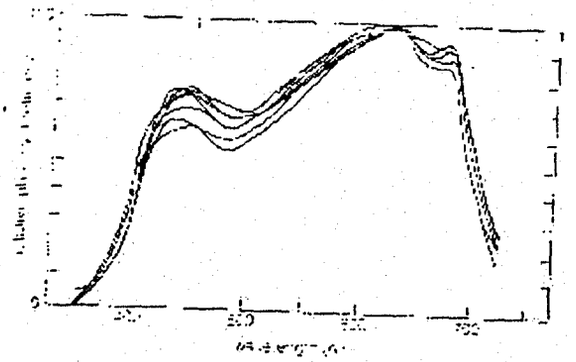


รูปที่ 8 (a) ไดอะแกรมแสดงระดับพลังงานของคลอโรฟิลล์

(b) absorption spectrum และ fluorescence spectrum ของคลอโรฟิลล์

c) (Taiz and Zieger, 1991)

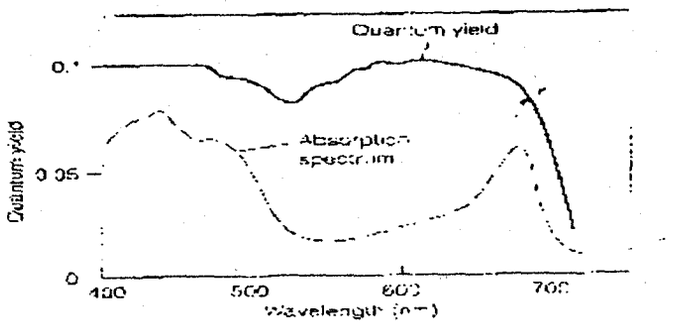
ในการทดลองให้แสงช่วงคลื่นเดี่ยวแก่ใบพืชแล้ววัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง แล้วนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นแสงกับอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง เรียกกราฟนี้ว่า action spectrum ของการสังเคราะห์ด้วยแสง (รูปที่ 9) จะเห็นว่าช่วงแสงสีน้ำเงินและสีแดงเป็นแสงซึ่งถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงมากที่สุด แสงช่วงคลื่นสีแดงถูกดูดโดยคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ส่วนแสงสีน้ำเงินถูกดูดโดยคลอโรฟิลล์ และ คาโรทีนอยด์ สิ่งที่น่าสังเกตคือ ช่วงแสงสีเขียวและสีเหลืองระหว่าง 500 ถึง 600 นาโนเมตร นั้นถูกดูดโดยคลอโรฟิลล์และคาโรทีนอยด์น้อยมาก แต่มีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์ด้วยแสงในอัตราที่สูงพอสมควร ทั้งนี้เป็นเพราะภายในใบพืช แสงสีเขียวและเหลืองถูกสะท้อนกลับไปมาหลาย ๆ ครั้งระหว่างเซลล์มีโซฟิลล์จำนวนมากมายในใบ ทำให้แสงดังกล่าวถูกดูดไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง ถึงแม้คลอโรฟิลล์และคาโรทีนอยด์จะดูดแสงสีเขียวและเหลืองได้น้อยมาก เมื่อเทียบกับแสงสีแดงและสีน้ำเงิน แต่เมื่อรวมผลที่เกิดขึ้นจากการสะท้อนกลับไปกลับมาหลาย ๆ ครั้ง ทำให้แสงสีเหลืองและเขียวเกือบครึ่งหนึ่งของปริมาณที่ตกกระทบบนผิวใบ ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้สภาพที่รงควัตถุอยู่ภายในคลอโรพลาสต์ ทำให้รงควัตถุดูดแสงช่วงคลื่นที่ยาวกว่าเมื่อรงควัตถุละลายอยู่ในตัวทำละลาย ดังนั้นคาโรทีนอยด์ที่อยู่ในใบพืชจึงดูดแสงสีเขียวได้มากกว่าคาโรทีนอยด์ที่ละลายในตัวทำละลาย



รูปที่ 9 action spectrum ของการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชเมื่อได้รับแสงความยาวคลื่นต่าง ๆ (Salisbury and Ross, 1992)

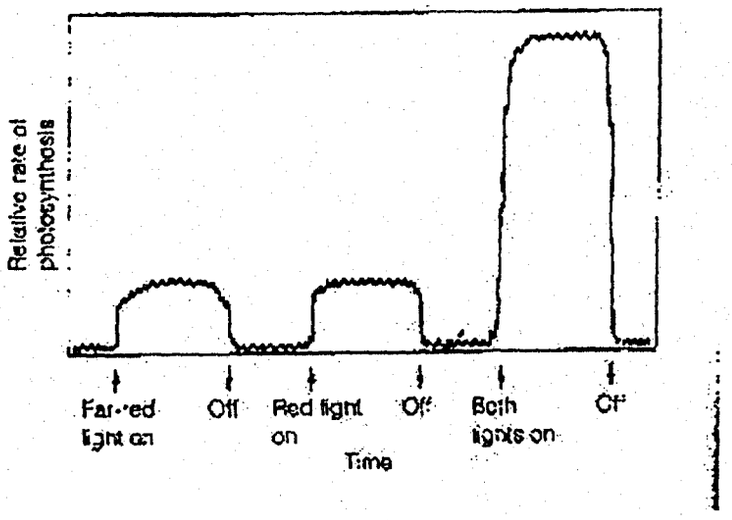
การค้นพบระบบแสง 2 ระบบ ในพืชและสาหร่ายสีเขียว

ในช่วงปี ค.ศ. 1954 Emerson และ Lewis ศึกษาการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียว Chlorella โดยให้แสงช่วงคลื่นเดี่ยวแก่สาหร่าย แล้ววัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยวัดการผลิตก๊าซออกซิเจน แล้วสร้างกราฟ action spectrum แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นแสงกับค่า quentum yield (รูปที่ 10) (O_2 ที่สาหร่ายผลิตขึ้นต่อแสง 1 แควนตัม) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการนำพลังงานแควนตัมไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง พบว่าแสงสีน้ำเงินและแสงสีแดงซึ่งคลอโรฟิลล์ดูดได้ดี ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพเท่า ๆ กัน ส่วนประสิทธิภาพที่ต่ำลงในช่วงความยาวคลื่นใกล้เคียง 500 นาโนเมตรนั้น เนื่องมาจากเป็นช่วงคลื่นที่ถูกดูดโดยรงควัตถุเสริมคาโรทีนอยด์ สิ่งที่สร้างความสงสัยให้แก่ Emerson มากที่สุด คือแสงสีแดงที่มีความยาวคลื่นมากกว่า 680 นาโนเมตร ถูกนำไปใช้ด้วยประสิทธิภาพที่ต่ำมาก แสดงว่ามีคลอโรฟิลล์เออยู่กลุ่มหนึ่ง ซึ่งดูดแสงช่วงคลื่นยาวกว่า 680 นาโนเมตร แล้วไม่สามารถนำพลังงานไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพเต็มที่ Emerson เรียกสิ่งที่เขาพบว่า **Red Drop Effect**



รูปที่ 10 กราฟแสดงประสิทธิภาพของสังเคราะห์ด้วยแสงเมื่อสาหร่าย Chlorella ได้รับแสงช่วงคลื่นต่าง ๆ ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงอย่างมากเมื่อได้รับแสงช่วงคลื่นยาวกว่า 680 nm (Taiz and Zieger, 1991)

ต่อมา Emerson และคณะพบว่าถ้าให้แสงสีแดงที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 680 นาโนเมตร เช่น 650 นาโนเมตร (ซึ่งคลอโรฟิลล์บีดูดได้ดีที่สุด) พร้อม ๆ กับให้แสงสีแดงช่วงคลื่นยาวกว่า 680 นาโนเมตร (far-red light) ปรากฏว่าค่า quantum yield จะมีค่ามากกว่าค่า quantum yield รวมเมื่อให้แสงช่วงคลื่นสั้น (650 นาโนเมตร) และเมื่องให้แสง far-red (ยาวกว่า 680 นาโนเมตร) แยกกัน Emerson เรียกปรากฏการณ์ที่แสงช่วงคลื่นสั้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของแสงช่วงคลื่นยาวกว่า 680 นาโนเมตรว่า **Enhancement Effect**



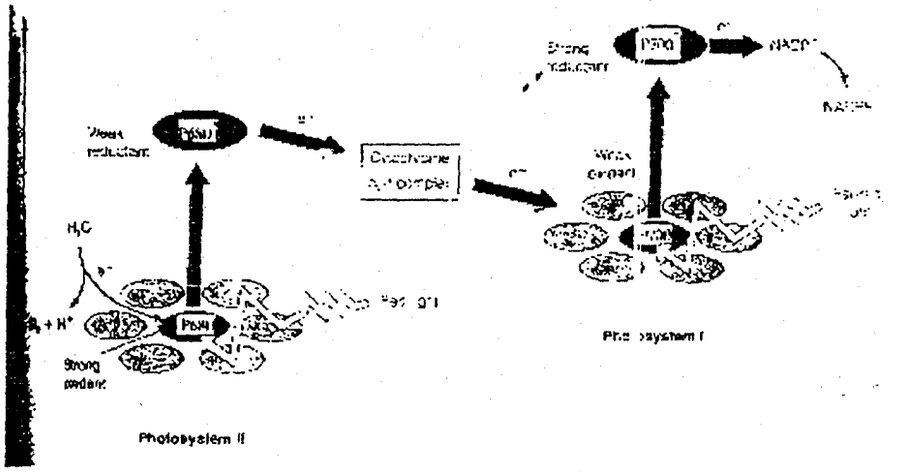
รูปที่ 11 ผลการทดลองแสง Emerson Enhancement Effect (Taiz and Zieger, 1991)

หลังจากค้นพบ Enhancement Effect ในสาหร่ายสีเขียว Chlorella แล้ว Emerson และคณะได้ทำการทดลองทำนองเดียวกันในสาหร่ายชนิดอื่น ๆ เช่น Anacystis (สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว) และ Porphyridium (สาหร่ายสีแดง) ได้ข้อสรุปว่า ประสิทธิภาพการนำพลังงานแสงไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง (quantum yield) จะต่ำในช่วงแสงที่มีความคลื่นยาวกว่า 680 นาโนเมตร (red drop effect) แต่ประสิทธิภาพดังกล่าวสามารถทำให้เพิ่มขึ้นได้ (Enhancement Effect) ถ้าให้แสงช่วงคลื่นที่ถูกดูดได้ดีโดยรงควัตถุเสริมสำคัญของสาหร่ายชนิดนั้น (รูปที่ 2) เช่น ในสาหร่ายสีเขียว Chlorella action spectrum ของ Enhancement Effect จะมีลักษณะเหมือน absorption spectrum ของรงควัตถุเสริมคลอโรฟิลล์บี ส่วนสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวและสาหร่ายสีแดง แสงที่ทำให้เกิด Enhancement Effect คือ แสงที่ถูกดูดโดยรงควัตถุเสริมของสาหร่ายนั้น ๆ คือ ไฟโคไซยานิน และไฟโคอีริทรินตามลำดับ จากผลการทดลองเหล่านี้ Emerson และคณะจึงตั้งสมมติฐานว่าการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชและสาหร่าย ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ผลิตก๊าซออกซิเจนนั้น ประกอบด้วยปฏิกิริยาที่ใช้แสง 2 ชนิด หรือ 2 ระบบ ซึ่งทั้ง 2 ระบบ มีคลอโรฟิลล์เอเป็นองค์ประกอบ โดยระบบหนึ่งมีคลอโรฟิลล์เอเป็นรงควัตถุหลักในการดูดแสงช่วงคลื่นยาวกว่า และมีรงควัตถุเสริมเพียงเล็กน้อย ส่วนอีก

ระบบหนึ่งมีรงควัตถุเสริมเป็นหลักในการดูดแสงช่วงคลื่นสั้นกว่า 680 นาโนเมตร ระบบแสงแต่ละระบบจะทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพโดยตัวของมันเอง ระบบแสง 2 ระบบนี้จะต้องทำงานเสริมกัน คือได้รับแสงที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่า และยาวกว่า 680 นาโนเมตร และมีรงควัตถุ เสริมเพียงเล็กน้อย ส่วนอีกระบบหนึ่งมี รงควัตถุเสริมเป็นหลักในการในการดูดแสงช่วงคลื่นสั้นกว่า 680 นาโนเมตร ระบบแสงแต่ละระบบจะทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพโดยตัวของมันเอง ระบบแสงสองระบบต้องทำงานเสริมกัน คือต้องได้รับแสงที่ความยาวคลื่นสั้นกว่า และยาวกว่า 680 นาโนเมตร พร้อมๆกัน จึงนำพลังงานไปใช้ในการสังเคราะห์แสงได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ระบบแสงที่มีคลอโรฟิลล์เอ เป็นรงควัตถุหลักในการดูดแสง คือ ระบบแสง 2 (Photosystem II) และ ระบบแสง 1 (Photosystem I)

แผนผัง "Z" ของการสังเคราะห์ด้วยแสง (Z-Scheme of Photosynthesis)

จากสมมุติฐานระบบแสง 2 ระบบ พบว่าระบบแสง 2 ระบบ ทำงานต่อเนื่องโดยมีตัวพา อิเลคตรอน จำพวกไซโตโครมเป็นตัวเชื่อม ในปี ค.ศ. 1960 Robin hill ได้เสนอแผนผัง การถ่ายทอดอิเลคตรอน แบบ "Z" scheme หรือ Hill and Bendall Scheme โดยกล่าวว่า การถ่ายทอดอิเลคตรอนในการสังเคราะห์ด้วยแสง เป็นการถ่ายทอดอิเลคตรอนจาก H_2O ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความสามารถเป็นตัวรีดิวซ์ที่ต่ำ ไปยัง $NADP^+$ ซึ่งเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี จึงเป็นการถ่ายทอดอิเลคตรอนที่ต้องใช้พลังงานแสงเป็นตัวผลักดัน แต่เนื่องจากค่ารีดอกซ์ของ H_2O กับ $NADP^+$ มีค่าหางกันมากถึง 1.14 โวลท์ อิเลคตรอนจึงถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูง 2 ครั้ง โดยครั้งแรกถูกกระตุ้นโดยพลังงานซึ่งถูกดูดโดยระบบแสง 2 และครั้งที่สองโดยระบบแสง 1 ดังนั้นการถ่ายทอดอิเลคตรอนจาก H_2O 1 โมเลกุล (2 อิเลคตรอน) จึงต้องใช้แสง 4 โฟตอน หรือ ต้องใช้แสง 8 โฟตอน ต่อ H_2O 2 โมเลกุล (4 อิเลคตรอน) เพื่อการผลิต O_2 1 โมเลกุล NADPH 2 โมเลกุล ดังสมการ :



รูปที่ 12 แผนผังการถ่ายทอดอิเลคตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง Z-Scheme (Taiz and Zieger, 1991)

ระบบแสง (Photosystem)

ระบบแสง 2 – (รูปที่ 13 (a) เป็นโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15 นาโนเมตร ประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ

1. PS II core complex ซึ่งประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 6 เส้น ฝังตัวอยู่ตลอดความหนาของไทลาคอยด์เมมเบรนโพลีเปปไทด์ 2 เส้นใน 6 เส้นมีขนาด 33 kD (โปรตีน D1) และ 31 kD (โปรตีน D2) เป็นที่เกาะของศูนย์กลางปฏิกิริยา (P680) และ pheophytin ซึ่งเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวแรกจาก P 680 นอกจากนี้ยังมีตำแหน่งให้สารประกอบควิโนน Q_A และ Q_B มาเกาะ PS II core complex ยังมีคลอโรฟิลล์ประมาณ 40 โมเลกุลและเบต้า-แคโรทีนจำนวนหนึ่งเกาะอยู่

2. PS II light-harvesting complex (LHC II) ซึ่งประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ขนาด 28, 25 และ 23 kD จำนวนทั้งหมดมากกว่า 20 สายล้อมรอบ PS II core complex โพลีเปปไทด์เหล่านี้เป็นที่ยึดเกาะของคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ประมาณ 250 โมเลกุล (คลอโรฟิลล์เอ :คลอโรฟิลล์บี ประมาณ 1 : 1) และซานโทฟิลล์อีกจำนวนหนึ่ง รงควัตถุเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นระบบรับคลื่น (antenna system) ทำหน้าที่ดูดแสงแล้วส่งผ่านพลังงานไปยัง P680

นอกจาก PS II core complex และ LHC II ยังมีโพลีเปปไทด์อีก 3 ชนิดซึ่งมีขนาด 33, 23 และ 17 kD ซึ่งรวมเรียกว่า **water oxidizing complex หรือ oxygen evolving complex (OEC)** ซึ่งเกาะอยู่กับไทลาคอยด์เมมเบรนทางด้านที่สัมผัสกับช่องลูเมนโดยอยู่ใกล้ชิดกับ PS II core complex มาก โปรตีนเหล่านี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการแตกตัวของ H_2O เพื่อให้อิเลคตรอนแก่ P680

หน้าที่ของระบบแสง 2 คือการใช้พลังงานแสง เพื่อรีดิวซ์พลาสโตควิโนน (plastoquinone, PQ) ให้อยู่ในรูป PQH_2 โดยใช้อิเลคตรอนจาก H_2O ซึ่งอาจเขียนในรูปปฏิกิริยารวมของระบบแสง 2 ได้ดังนี้

$$2H_2O + 2PQ + 4H^+ \xrightarrow{\text{4 photons}} O_2 + 4H^+ + 2\,PQH2$$

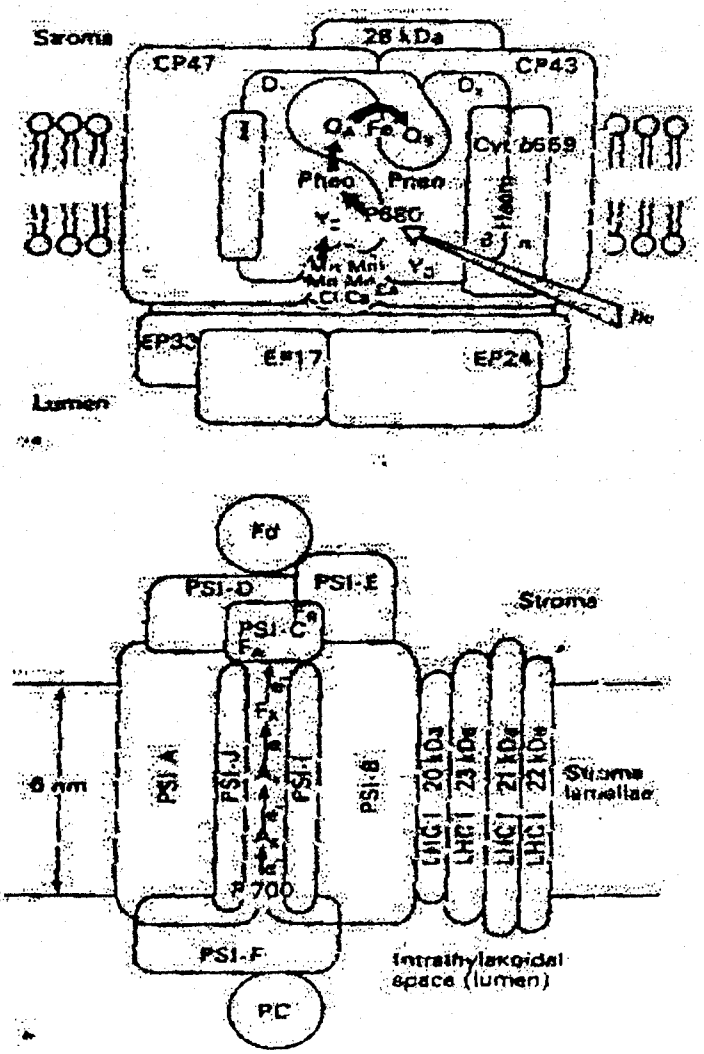
ระบบแสง 1 – ประกอบด้วย **PS I core complex** และ **PS I light-harvesting complex (LHC I)** ในทำนองเดียวกับระบบแสง 2 PS I core complex ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 11 เส้น ที่มีขนาดต่าง ๆ ตั้งแต่ 1.5 ถึง 82 kD โพลีเปปไทด์ขนาดใหญ่ที่สุดคือ 82 kD มีอยู่ด้วยกัน 2 เส้น เรียกชื่อว่า PSI-A หรือ Ia และ PSI-B หรือ Ib ซึ่งอยู่ชิดกันมาก เป็นที่เกาะของศูนย์กลางปฏิกิริยา **(P700)** (รูปที่ 13 b) นอกจากนี้ยังมีตัวพาอิเลคตรอนซึ่งรับอิเลคตรอนต่อจาก P700 คือ A_0 A_1 และ F_xในปัจจุบันเชื่อว่า A_0 เป็นโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เอ A_1 เป็นสารประกอบควิโนนชนิดหนึ่ง เรียกว่า ฟิลโลควิโนน (phylloquinone) F_x เป็นโปรตีนซึ่งมี Fe และ S เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ PS I core complex ยังมีคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี ประมาณ 100 โมเลกุล (ในสัดส่วนคลอโรฟิลล์เอ : คลอโรฟิลล์บี ประมาณ 4:1) รงควัตถุเหล่านี้ทำหน้าที่ดูดพลังงานจากแสงแล้วส่งผ่านไปยัง P700

ระบบแสง 1 ทำหน้าที่รับอิเลคตรอนจากพลาสโรไซยานิน (plastocyanin, PC) (ซึ่งรับอิเลคตรอนมาจากระบบแสง 2) แล้วส่งต่อให้กับเฟอร์รีดอกซินเพื่อริดิวซ์ Fe^{3+} ในอะตอมของเฟอร์รีดอกซินให้เป็น Fe^{3+} อาจเขียนปฏิกิริยารวมที่เกิดขึ้นที่ระบบแสง 1 ได้ดังนี้ :

$$4\,PC\,(Cu^{+}) + 4\,Fd\,(Fe^{3+}) \xrightarrow{4\ photons} $$

เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin, Fd) เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่เกาะอยู่กับไทลาคอยด์เมมเบรนอย่างหลวม ๆ ทางด้านที่สัมผัสกับสะโตรมา เมื่อรับอิเลคตรอนมาจาก PS I แล้ว เฟอร์รีดอกซินส่งอิเลคตรอนต่อให้กับ $NADP^{+}$ โดยการคะตะไลซ์ของเอนไซม์ Ferredoxin $NADP^{+}$ reductase ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการถ่ายทอดอิเลคตรอนดังนี้ :

$$4\,Fd\,(Fe^{2+}) + NADP^{+} + 2H^{+} \longrightarrow 4\,Fd(Fe^{3+}) + 2NADPH$$



รูปที่ 13 ไดอะแกรมแสดงองค์ประกอบของระบบแสง 2 (a) และระบบแสง (b) (Hall and Rao, 1995)

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ การสังเคราะห์แสง เปรียบเทียบกันระหว่างใบของพืชที่มีสีเขียว กับพืชใบสีเหลือง

วัสดุอุปกรณ์

1. ต้น พิกุล ที่มีใบสีเขียว 10 ต้น 3 ซ้ำ (30ใบ) และใบสีเหลือง 10 ต้น 3 ซ้ำ (30ใบ)
2. เครื่องวัดค่า Chlorophyll Fluorescence (FIM 1500)
3. Leaf Clip

สถานที่ทดลอง

บริเวณด้านหลังของอาคารเครื่องมือ 3(F3)

วิธีการทดลอง

1. ใช้ leaf clip หนีบไว้ ที่ใบ ของต้นพิกุล ระวังอย่าให้ให้โดนเส้นกลางใบ โดยให้แผ่นโลหะปิดส่วนของใบไว้ไม่ให้ถูกแสงหนีบทิ้งไว้ประมาณ 30นาที
2. เมื่อครบ 30 นาทีนำเครื่องวัดค่า Chlorophyll Fluorescence มาทำการวัดเพื่อหาค่า Chlorophyll Fluorescence (เครื่อง FIM 1500)
3. การวัดโดยการนำหัววัดมาครอบที่ leaf clipแล้วเลื่อนแผ่นโลหะออก และกดปุ่มปลอยแสงวัด ข้อมูลจะปรากฏที่หน้าจอเครื่อง แล้วบันทึกผลการทดลอง
4. ค่าที่ได้จากเครื่องได้แก่ F_0, F_V, F_M และ F_V/F_M สำหรับค่า F_V หาได้จากสมการ $F_V = F_M - F_0$

เมื่อ

F_0 เป็นค่าเริ่มต้น โดยใช้หลักการที่ว่า เมื่อเริ่มมีการถ่ายทอดอิเลคตรอน หลังจากมีการกระตุ้นอิเลคตรอนขึ้นสู่สภาวะ Excited state และเริ่มมีการปลดปล่อยคลื่นแสง Fluorescence ออกมาเครื่องจะวัดเป็นค่า F_0

FM เป็นค่าสูงสุดที่เครื่องตรวจสอบคลื่น Fluorescence ได้ หมายถึงเป็นจุดที่ สารประกอบควิโนนประเภท QA มีการปลดปล่อยอิเล็คตรอนสูงสุด (Fully reduced)

Fo : Effect by thermal damage (Heat damage increases Fo)
Fo can also be use to measure chlorophyll content

Fv : Lowered by heat, freezing and photoinhibition

Fm : Decrease by high but not injurious temperature

Fm/Fo : Lowered by water potential/ drought condition shows before wilting. Relationship to sap flow

การรวบรวมข้อมูล

วัดค่า Chlorophyll Fluorescence จากใบของพืชที่มีสีเขียวกับพืชที่มีใบสีเหลืองด้วยเครื่อง Chlorophyll Fluorescence (FIM 1500) โดยค่าที่ได้จากเครื่องได้แก่ F_o, F_v, F_M และ F_v / F_M สำหรับค่า F_v หาได้จากสมการ $F_v = F_M - F_o$

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS v.13 for window และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการวัดค่า Chlorophyll Fluorescence จากใบของพืชที่มีสีเขียวกับพืชที่มีใบสีเหลือง

เอกสารอ้างอิง

Hall, D.O. and Rao, K.K. 1994. Photosynthesis. 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Mohr, H. and Schopfer, P. 1995. Plant physiology. Springer-Verlag, Berlin.

Slisbury, F.B. and Ross, C.W. 1992. Plant physiology. Belmont, Calif: Wadsworth Pub. USA.

Taiz, L. and Zeiger, E. 1991. Plant physiology. Benjamin/ Cummings Pub. Califonia. USA.