

8. BARWNIKI FOTOSYNTETYCZNE ROŚLIN

8.1. Ogólne właściwości barwników

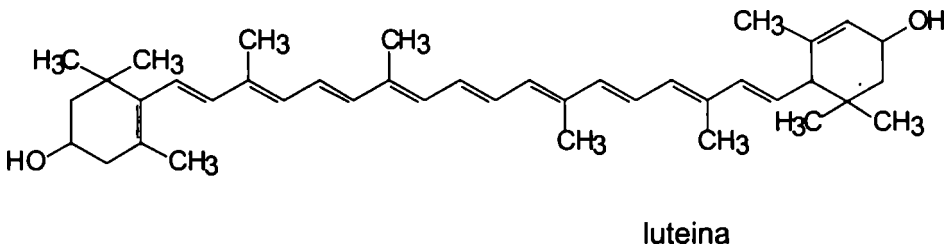
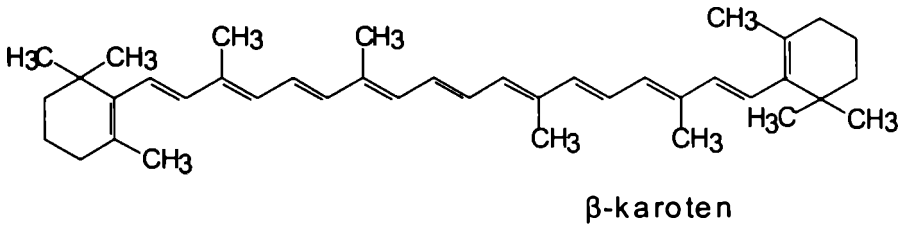
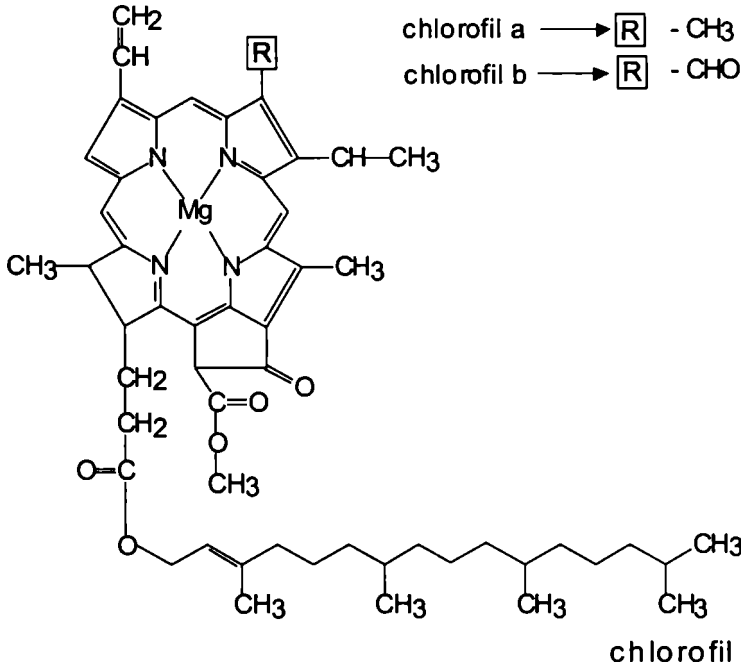
Organizmy fotosyntetyczne zawierają szereg barwników absorbujących promieniowanie widzialne, których wzbudzenie inicjuje reakcje fotochemiczne fotosyntezy. Można wyróżnić trzy grupy barwników występujących w organizmach fotosyntetycznych: chlorofile, karotenoidy oraz fikobiliny (tylko u sinic i krasnorostów). W przeciwieństwie do fikobilin, chlorofile i karotenoidy są nierozpuszczalne w wodzie. Fikobiliny oraz karotenoidy nazywane są barwnikami pomocniczymi, ponieważ ich główną funkcją jest przekazywanie zaabsorbowanego światła na chlorofil.

Barwnik	Maksyma absorpcji w acetonie (nm)
Chlorofil <i>a</i>	430, 662
Chlorofil <i>b</i>	456, 645
β -karoten	453, 479
Luteina	447, 475
Wiolaksantyna	419, 443, 471

Za charakterystyczną, zieloną barwę roślin odpowiedzialne są chlorofile. Stanowią one około 4% suchej masy chloroplastów. Chlorofil *a* ma barwę niebieskozieloną, natomiast chlorofil *b* żółtozieloną i stanowi około 1/3 ilości chlorofilu *a*. Chlorofile wykazują dwa pasma absorpcji w zakresie widzialnym: w zakresie światła niebiesko-fioletowego (pasmo Soreta) i czerwonego (pasmo Q_y). Chlorofile zbudowane są z polarnego, tetrapiolowego pierścienia porfiryнового z centralnie związanym atomem magnezu oraz hydrofobowego, 20-węglowego łańcucha bocznego, fitolu.

Karotenoidy to grupa żółtych lub pomarańczowych barwników roślinnych. Ich barwa w liściach jest maskowana w lecie przez chlorofil. Stają się natomiast dobrze widoczne jesienią, kiedy chlorofil ulega degradacji. Karotenoidy to 40-węglowe pochodne tetraterpenów zbudowane z 8 reszt izoprenoidowych, zawierające układ sprzężonych wiązań podwójnych, zakończony dwoma pierścieniami jononu. Karotenoidy dzielimy na: karoteny (węglowodory np. α - i β -karoten) oraz ksantofile (pochodne tlenowe karotenów, np. luteina czy wioloksantyna). Widmo absorpcji karotenoidów przypada na zakres 400–550 nm. W błonach tylakoidowych barwniki te znajdują się w sąsiedztwie chlorofilu i przekazują zaabsorbowaną energię cząsteczkom chlorofilu *a*. Działają na zasadzie anteny, stąd określa się je czasem mianem barwników antenowych. Barwniki fotosyntetyczne nie są rozmieszczone równomier-

nie w błonach tylakoidów, lecz występują w postaci kompleksów białkowo-barwnikowych o różnym składzie i funkcji.



Dezintegracja błon tylakoidów za pomocą detergentów pozwoliła na wyodrębnienie dwóch głównych typów kompleksów:

- I. kompleksy zawierające centrum reakcji fotosystemu I (PSI) oraz fotosystemu II (PSII)
- II. kompleksy stanowiące układy antenowe.

W skład centrum reakcji obu fotosystemów wchodzi chlorofil *a* oraz β -karoten, natomiast układy antenowe zawierają oba chlorofile oraz ksantofile.

- Budowa i funkcja barwników fotosyntetycznych.
- Chromatografia adsorpcyjna.
- Spektroskopia absorpcyjna.
- Budowa chloroplastów.
- Zasady wszystkich wykonywanych na ćwiczeniach oznaczeń.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

- *Fizjologia roślin*. Kopcewicz J., Lewak S. (red.), PWN, Warszawa 2005.
- *Fotosynteza*. Hall D. O., Rao K. K., Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1999.

8.2. Izolacja barwników

ZASADA:

Barwniki fotosyntetyczne można ekstrahować z tkanki roślinnej za pomocą rozpuszczalników organicznych, takich jak: chloroform, metanol, aceton czy eter dietylowy. Mieszaninę barwników z ekstraktu rozdziela się najczęściej z wykorzystaniem metody chromatografii adsorpcyjnej (chromatografii w układzie ciecz-ciało stałe), w której faza stacjonarna jest fazą stałą, a rozdział substancji zachodzi dzięki zjawiskom adsorpcji. Jako adsorbenty stosuje się substancje nieorganiczne lub organiczne (np. Al_2O_3 , MgO , skrobia, celuloza, sacharoza), które oddziałują swoją powierzchnią z cząsteczkami rozdzielanych związków. Powinowactwo adsorpcyjne rozdzielanych związków do adsorbenta jest uzależnione od ich budowy — głównie od obecności i położenia grup funkcyjnych (polarności). Ponieważ rozpuszczalnik jest także adsorbowany, dla każdej substancji wytwarza się specyficzną równowagę między trzema składnikami układu: adsorbent — badany związek — rozpuszczalnik. Przy przemywaniu rozpuszczalnikiem następuje selektywna desorpcja składników mieszaniny. Jakość rozdziału i szybkość wymywania danego związku będą zależały nie tylko od jego powinowactwa do adsorbenta, ale także od jego rozpuszczalności w solwencie i składu badanej mieszaniny. Efektywność rozdziału można zwiększyć poprzez umiejętne dobranie solwentu do chromatografii.

8.2.1. Ekstrakcja barwników z liści

8.2.1.1. Ekstrakcja barwników do rozdziału chromatograficznego na bibule

WYKONANIE:

Na wadze odważyć około 2 g świeżych liści. Liście utrzeć w moździerzu z piaskiem (lub tłuczonym szkłem). Dodać 10 ml mieszaniny chloroform:metanol 1:2 (o/o). Całość ucierać jeszcze przez około 2 min, następnie odczekać, aż fragmenty tkanki opadną na dno moździerza. Zebrać nadsącz pipetą, przesączyc przez sączek z bibuły do krótkiej probówki szklanej i podzielić na 2 części. Do jednej dodać ostrożnie 20–50 μl stężonego HCl i wymieszać. Oba ekstrakty nanieść na bibułę chromatograficzną.

8.2.1.2. Ekstrakcja barwników do rozdzielu chromatograficznego na kolumnie

WYKONANIE:

Utrzeć w moździerzu około 1 g liści z dodatkiem 10 ml metanolu. Następnie odczekać, aż fragmenty tkanki opadną na dno moździerza. Zebrać nadsącz pipetą, przesączyc przez sączek z bibuły do probówki. Dodać 5 ml benzyny (lub heksanu), 5 ml wody, zatkać szczelnie korkiem i wymieszać kilkakrotnie obracając probówkę dnem do góry (nie wytrzępywać!). Po rozdzieleniu się faz, górną, ciemnozieloną fazę nanieść na kolumnę.

8.3. Rozdział barwników

8.3.1. Rozdział barwników na bibule

WYKONANIE:

Na bibule chromatograficznej o wymiarach 20 × 15 cm narysować ołówkiem linię startu w odległości 1,5 cm od dłuższej krawędzi. Na jedną połowę linii startu nanieść kilkakrotnie pipetą Pasteura ekstrakt otrzymany w punkcie 8.2.1.1. poprzedniego ćwiczenia do uzyskania ciemnozielonego prążka, a na drugą taką samą ilość ekstraktu potraktowanego HCl. Miejsce nakładania ekstraktu suszyć zimnym strumieniem powietrza z suszarki. Bibulę spiąć w walec spinaczami i umieścić w zlewce zawierającej na dnie warstwę około 1 cm mieszaniny o składzie benzyna:aceton 125:15 (o/o). Rozdział prowadzić do momentu osiągnięcia przez czoło rozpuszczalnika górnej krawędzi bibuły. Wyjąć chromatogram ze zlewki i pozostawić pod dygestorium do wysuszenia.

8.3.2. Przygotowanie kolumny i rozdziel barwników na kolumnie chromatograficznej

WYKONANIE:

W statywie zamocować pustą suchą kolumnę chromatograficzną. Do zlewki wsypać skrobię w ilości równej w przybliżeniu objętości kolumny, a następnie wlać benzynę ekstrakcyjną (lub heksan) i mieszać bagietką do uzyskania gęstej, homogennej zawiesiny. Zawiesinę przelać przez lejek do kolumny, aż do ustalenia się górnego poziomu skrobi na wysokości 5–10 cm od górnej krawędzi kolumny. Solwent dolewać do momentu, aż słup przestanie się obniżać. Należy zwrócić uwagę na to, aby nad warstwą adsorbentu (skrobi) znajdował się zawsze słup cieczy.

W celu naniesienia barwników na kolumnę obniżyć poziom benzyny nad skrobią do około 0,5 cm. Pobrać ekstrakt barwników przygotowany w sposób opisany powyżej i wprowadzić go porcjami (po 1 ml) na kolumnę tak, aby nie zaburzyć powierzchni skrobi. Po wnikięciu barwników do absorbenta przemywać kolumnę solwentem, aż do uzyskania rozdzielu barwnych pasm barwników.

8.3.3. Analiza spektralna barwników

WYKONANIE:

Z otrzymanego bibułowego chromatogramu wyciąć pasma odpowiadające poszczególnym barwnikom (β -karoten, chlorofile i luteina), pociąć na kawałki, umieścić w małych zlewkach i wyekstrahować niewielką ilością acetonu. Wykreślić widma absorpcyjne poszczególnych barwników na spektrofotometrze w zakresie 350–715 nm i wyznaczyć maksima absorpcji.

OPRACOWANIE WYNIKÓW (ćw. 8.3.1 i 8.3.2)

Zidentyfikować poszczególne pasma barwników na bibule i kolumnie. Wytłumaczyć kolejność wędrówki barwników na podstawie ich budowy. Określić wpływ kwaśnego środowiska na skład barwnikowy liścia. Porównać uzyskane maksima absorpcji barwników z danymi literaturowymi (patrz tabela) i na podstawie tych porównań ocenić czystość uzyskanych barwników.

ODCZYNNIKI:

Aceton, chloroform, metanol, stężony kwas solny, eter naftowy, benzyna, skrobia.

MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Zielone liście (pszenica, pietruszka, szpinak), mózdzierz, tłuczek, piasek, sączki, bibuła chromatograficzna, kolumna ze spiekem szklanym, probówki i cylindry miarowe z korkiem, zlewki, probówki Eppendorfa, statyw, łapy do statywu, pompka wodna, szpatułki, bagietki, pipety automatyczne, pipety Pasteura, suszarka, kuwety, łaźnia wodna, spinacze biurowe, folia aluminiowa, waga techniczna, wirówka, spektrofotometr.

8.4. Oznaczanie zawartości barwników fotosyntetycznych w liściach

ZASADA:

Chlorofile (Chl) i karotenoidy są związkami o charakterze hydrofobowym. Można je wyekstrahować z tkanki roślinnej rozpuszczalnikami organicznymi np. acetonem. Ilościowe oznaczenie Chl *a* i Chl *b* oraz wszystkich karotenoidów sumarycznie można wykonać na podstawie pomiarów absorbancji acetonowego ekstraktu barwników z liści bez konieczności ich rozdzielania. Chlorofile *a* i *b* absorbują światło w dwóch zakresach: w paśmie światła niebieskiego (pasmo Soreta ~440 nm) i światła czerwonego (pasmo Q_y ~650 nm). Karotenoidy absorbują światło widzialne w zakresie 420–490 nm i ich widmo absorpcji częściowo pokrywa się z pasmem Soreta dla chlorofili.

W przypadku ekstrakcji 100% acetonem, należy dokonać pomiaru absorbancji przy 470, 645 i 662 nm i obliczyć stężenie barwników w $\mu\text{g/ml}$ wg wzorów:

$$C_{\text{Chl } a} = 11,75 \times A_{662} - 2,35 \times A_{645}$$

$$C_{\text{Chl } b} = 18,61 \times A_{645} - 3,96 \times A_{662}$$

$$C_{\text{kar}} = (1000 \times A_{470} - 2,27 \times C_{\text{Chl } a} - 81,4 \times C_{\text{Chl } b})/227$$

WYKONANIE:

Nieuszkodzone, świeże liście pietruszki zważyć (należy odważyć około 1 g liści), drobno posiekać i umieścić w moździerzu. Dodać niewielką ilość CaCO_3 i kilka ml acetonu. Dokładnie utrzeć liście, zebrać pipetą ekstrakt i przesączyć do cylindra miarowego (50 ml). Dodać kolejną porcję acetonu i ponownie ekstrahować barwniki z tkanek w moździerzu, a następnie zebrać ekstrakt. Procedurę ekstrakcji powtarzać do całkowitego odbarwienia materiału w moździerzu. Przepłukać acetonem moździerz, sączek, końcówkę pipety itd.

Uzupełnić ekstrakt acetonem do pełnych 10-tek ml. Pobrać po 1,5 ml ekstraktu do 2 probówek Eppendorfa i odwirować przez 2 min przy 10 000 obr./min. Ekstrakty przelać do kuwety i zmierzyć absorbancję dla $\lambda = 470, 645$ i 662 nm, względem acetonu. W przypadku dużych wartości absorbancji, ekstrakt rozcieńczyć.

Obliczyć zawartość barwników w 1 g świeżej masy liści pietruszki.

ODCZYNNIKI:

Aceton, CaCO_3 .

MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Liście, moździerz, lejek, sączki, cylinder miarowy (50 ml), probówki Eppendorfa, kuwety, spektrofotometr.

8.5. Ochronna rola karotenoidów

ZASADA:

Chlorofile w rozpuszczalnikach organicznych w obecności światła i tlenu ulegają fotooksydacji. Dodanie karotenoidów do tych roztworów powoduje zahamowanie procesu rozkładu chlorofilu. Zmiany stężenia chlorofilu w próbce można oznaczyć na podstawie zmian absorbancji długofalowego pasma absorpcji Chl (Q_y), z maksimum przy 662 nm.

WYKONANIE:

1. Przeprowadzić ekstrakcję barwników z liści pietruszki acetonem.
2. Rozdzielić barwniki metodą chromatografii bibułowej (eluent: benzyna:aceton 125:15 (o/o)).
3. Wyekstrahować z bibuły Chl *a*, oraz β -karoten (acetonem).
Należy przygotować acetonowe roztwory barwników o stężeniach odpowiadających:
 $A_{430} = 1,0 \pm 0,1$ dla Chl *a*
 $A_{450} = 1,0 \pm 0,1$ dla 10-krotnie rozcieńczonego β -karotenu.
4. Przygotować 2 kuwety, zawierające:
I – 2 ml przygotowanego roztworu Chl *a* + 250 μl przygotowanego roztworu β -karotenu
II – 2 ml przygotowanego roztworu Chl *a* + 250 μl acetonu.
5. Wykreślić widmo absorpcji w zakresie 500–715 nm, oznaczyć absorbancję każdej próbki dla $\lambda = 662$ nm. Zaznaczyć pisakiem poziom cieczy w kuwetach, umieścić je w chłodzonym statywie i oświetlać obie próbki przez określony czas (np. 15 min) lampą o dużej mocy (500 W) z odległości 15 cm. Ku-

wet nie należy zatykać przykrywką, aby umożliwić penetrację tlenu z powietrza do roztworu.

6. Po zakończonym naświetlaniu uzupełnić acetonem poziom cieczy w kuwetach i wykreślić ponownie widma absorpcji i oznaczyć absorbancję każdej próbki dla $\lambda = 662 \text{ nm}$.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Obliczyć zmianę stężenia Chl w każdym z roztworów, przyjmując, że współczynnik absorbancji 1% roztworu Chl *a* w acetonie mierzony przy 662 nm w kuwecie 1 cm (A 1%, 1cm) wynosi 840.

Porównać ilość rozłożonego Chl *a* w obu probówkach i wytłumaczyć obserwacje.

ODCZYNNIKI:

Aceton, benzyna.

MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Liście, moździerz, bibuła chromatograficzna, kuwety, spektrofotometr, lampa 500 W.