

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.06>

ROZDZIAŁ VI. **BARWNIKI ASYMILACYJNE** **I ICH WŁAŚCIWOŚCI**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Chlorofile są najbardziej rozpowszechnionymi zielonymi barwnikami roślinnymi. Występują w tkankach fotosyntetycznych. Razem z karotenoidami biorą udział w absorpcji energii świetlnej i jej zamianie na energię chemiczną, wykorzystywaną w endoergicznym procesie syntezy związków organicznych z nieorganicznych związków niskocząsteczkowych, takich jak CO_2 i H_2O , według równania:



W budowie chlorofilu można wyróżnić dwie zasadnicze części: „głowę”, będącą pochodną tetrapiolu (chlorofilina), stanowiącą układ porfirynowy, w którego centrum znajduje się atom magnezu, związany koordynacyjnie z atomami azotu pierścieni pirolowych, oraz „ogon”, który jest utworzony przez 20-węglowy alkohol fitol połączony wiązaniem estrowym z magnezoporfiryną. Obecność w chlorofilinie układu wiązań sprzężonych sprawia, że chlorofil jest efektywnym fotoreceptorem, i nadaje mu charakterystyczną zieloną barwę. Silnie hydrofobowy fitol zakotwicza chlorofil w błonach tylakoidów, zapewniając jednocześnie jego odpowiednie ułożenie.

Znanych jest kilka rodzajów chlorofilu, jednak u roślin występuje głównie **chlorofil a** oraz **chlorofil b**. Wszystkie fotosyntetyzujące organizmy zawierają chlorofil a ($\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$) o niebiesko-zielonym zabarwieniu, który absorbuje światło niebiesko-fioletowe o długości fali 430 nm oraz czerwone o długości 662 nm. Chlorofil b wykazujący żółto-zieloną barwę najintensywniej absorbuje światło niebieskie w zakresie 455 nm i czerwone o długości fali 642 nm. Różnica w budowie między chlorofilem a i chlorofilem b polega na obecności grupy metylowej przy drugim pierścieniu pirolowym chlorofiliny w przypadku

chlorofilu *a*, podczas gdy chlorofil *b* zawiera w tym miejscu grupę formylową. Chlorofile są uważane za najmniej trwałe barwniki roślinne. Charakterystyczną zieloną barwę zachowują tylko w żywych, nieuszkodzonych tkankach. Do czynników przyspieszających przemiany chlorofili zalicza się: wysoką temperaturę, kwasowe środowisko oraz tlen i światło. Kierunki przemian i barwa powstających produktów zależą w dużej mierze od pH środowiska.

Drugą grupę barwników asymilacyjnych stanowią **karotenoidy**, będące tetraterpenami zbudowanymi z ośmiu reszt izoprenowych (40 atomów węgla w cząsteczce). W cząsteczkach tych związków znajdują się najczęściej dwa pierścienie jononu połączone łańcuchem węglowodorowym, w którym – podobnie jak w cząsteczce chlorofilu – wiązania między atomami węgla występują w układzie sprzężonym. Karotenoidy absorbują światło w niebiesko-fioletowym zakresie światła widzialnego. Do karotenoidów zalicza się dwie grupy związków: **karoteny** o barwie czerwono-pomarańczowej – nienasycone węglowodory niezawierające atomów tlenu; żółte **ksantofile** – węglowodory charakteryzujące się obecnością atomów tlenu. Obecność atomu (atomów) tlenu w cząsteczkach ksantofili zwiększa ich polarność względem karotenów.

Trzecią grupą barwników asymilacyjnych są **fikobiliny**, występujące u sinic i krasnorostów. W przeciwieństwie do chlorofili i karotenoidów są rozpuszczalne w wodzie.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Doświadczenie I

Rozdział barwników fotosyntetycznych metodą chromatografii cienkowarstwowej (ang. *thin layer chromatography*, TLC)

Cel ćwiczenia

Identyfikacja barwników asymilacyjnych liści.

Zasada metody

Metoda chromatografii cienkowarstwowej polega na rozdzieleniu składników mieszaniny na podstawie różnic w prędkości przemieszczania się poszczególnych składników w danym układzie

rozwijającym. Prędkość ta jest zależna od oddziaływań międzycząsteczkowych między związkami chemicznymi obecnymi w analizowanej próbce a fazą rozdzielczą i eluentem (układ rozwijający). Im związek jest bardziej polarny, tym lepiej będzie adsorbowany przez żel krzemionkowy (stanowi fazę stacjonarną). Mało polarne związki słabo wiążą się z płytką pokrytą żelem krzemionkowym i przemieszczają się wraz z eluentem. Związki bardziej polarne są lepiej wiązane przez płytkę i nie przemieszczają się znacząco od miejsca, w którym zostały nałożone.

Materiał

liście ogórka, pomidora lub fasoli

Odczynniki

chloroform, CaCO_3 , mieszanina benzen–eter naftowy–aceton (10:2,5:1,5; v/v/v), 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, płytka chromatograficzna pokryta żelem krzemionkowym ze znacznikiem fluorescencyjnym (Merck 60 F₂₅₄)

Sprzęt laboratoryjny

moździerz porcelanowy, lejek szklany, sączi z bibuły, próbowniki wirownicze typu Eppendorf, pipety (1–5 cm³), pipety kapilarne, komora chromatograficzna, mikrowirówka, spektrofotometr, kuwety do spektrofotometru, ołówki, linijki, waga laboratoryjna, skalpel

UWAGA: Wszystkie czynności wykonać pod pracującym dygestorium.

I.A. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU Z LIŚCI

Rozdrobnione liście (2 g) rozetrzeć w moździerzu porcelanowym. Dodać 3 cm³ chloroformu oraz niewielką ilość CaCO_3 w celu zneutralizowania kwasów organicznych i ochrony cząsteczek chlorofilu przed usunięciem magnezu z układu porfyrinowego. Homogenat przesączyć przez bibułę filtracyjną do suchej próbowniki typu Eppendorf. Przesącz, będący ekstraktem barwników fotosyntetycznych, użyć do wykonania rozdziału chromatograficznego.

I.B. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

Wykonanie doświadczenia

Na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym zaznaczyć ołówkiem punkty startowe w odległości 2 cm od dolnej krawędzi płytki. Punkty powinny znajdować się w odległości 2 cm od siebie. Za pomocą pipety kapilarnej nanieść kroplami ekstrakt barwników fotosyntetycznych na zaznaczone punkty startowe. Kolejne krople ekstraktu powinny być наносzone (jedna na drugą) dopiero po wyschnięciu poprzedniej kropli. W każdym punkcie startowym powinno znajdować się 12–15 kropli ekstraktu.

Tak przygotowaną płytkę umieścić krawędzią startową do dołu w komorze chromatograficznej zawierającej 100 cm³ mieszaniny rozpuszczalników o składzie: benzen–eter naftowy–aceton (10:2,5:1,5; v/v/v). Płytkę chromatograficzną powinna być zanurzona na kilka milimetrów w eluencie tak, aby uniknąć kontaktu naniesionych substancji z rozpuszczalnikiem. Komorę chromatograficzną szczelnie przykryć wieczkiem, a chromatogram rozwijać przez 15–30 minut. W tym czasie eluent stopniowo przemieszcza się w kierunku górnej krawędzi płytki i dzięki zjawisku kapilarnemu powoduje rozdział substancji. Rozdział chromatograficzny prowadzi do całkowitego rozdzielenia się barwników asymilacyjnych.

Po uzyskaniu wyraźnego rozdziału barwników wyjąć płytkę z komory chromatograficznej, zaznaczyć ołówkiem czoło rozpuszczalnika i pozostawić do wyschnięcia.

Opracowanie wyników

Suchą płytkę obejrzyć w promieniach lampy UV (365 nm), obserwując fluorescencję barwników. Dla każdego barwnika (identyfikacji poszczególnych barwników dokonać na podstawie charakterystycznej dla nich barwy) wyznaczyć współczynnik przesunięcia (ang. *retention factor*, R_f), będący ilorazem odległości przebytej przez substancję rozdzielaną przez odległość przebytą przez czoło eluentu:

$$R_f = \frac{\text{przesunięcie badanej substancji od linii startu}}{\text{przesunięcie czoła eluentu od linii startu}}$$

Po przeprowadzeniu obserwacji i obliczeń wykonać rysunek chromatogramu z zaznaczeniem barwy, nazwy barwnika i współczynnika R_f dla każdej plamy (por. rozdział XXI, rysunek 21.1).

I.C. WYZNACZANIE MAKSYMUM ABSORPCJI ŚWIATŁA DLA BARWNIKÓW FOTOSYNTETYCZNYCH

Wykonanie doświadczenia

Barwniki fotosyntetyczne rozdzielone metodą chromatografii cienkowarstwowej zdrapać z płytki razem ze złożem, po czym odzyskać je przez ekstrakcję 96% C_2H_5OH . Za pomocą skalpela zdrapać żel krzemionkowy z kilku plam tego samego barwnika i przenieść do probówki typu Eppendorf, a następnie dodać $1,5\text{ cm}^3$ C_2H_5OH . Probówkę silnie wytrząsać przez 15 sekund, a następnie 5 minut wirować w mikrowirówce przy działaniu siły odśrodkowej $6000 \times g$. Uzyskany supernatant przenieść do kuwety spektrofotometrycznej, a następnie oznaczyć wartości absorbancji dla poszczególnych barwników w zakresie długości fal 400–700 nm co 10 nm. Oznaczenia wykonać wobec C_2H_5OH stanowiącego próbę odnośnikową.

Opracowanie wyników

Zapisać wyniki pomiarów i narysować widmo absorpcji dla poszczególnych barwników, zaznaczając na osi odciętych (x) długość fali świetlnej [nm], a na osi rzędnych (y) otrzymane wartości absorbancji.

Doświadczenie II

Rozdział barwników metodą Krausa i określenie ich właściwości fizykochemicznych

Cel ćwiczenia

Zbadanie właściwości fizycznych i chemicznych barwników fotosyntetycznych.

Materiał

liście ogórka, pomidora lub fasoli

Odczynniki

96% C_2H_5OH , $CaCO_3$, cykloheksan, 20% HCl, octan miedzi (II), 20% alkoholowy roztwór NaOH, woda destylowana

Sprzęt laboratoryjny

moździerz porcelanowy, sączki z bibuły, lejek szklany, 3 probówki szklane z korkiem i podziałką, 5 probówek szklanych, drewniane uchwyty do probówek, pipety ($1-5\text{ cm}^3$), palnik, lampa UV, waga laboratoryjna

II.A. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU Z LIŚCI

Świeże, rozdrobnione liście (5 g) rozetrzeć w moździerzu porcelanowym. Do homogenizacji dodać niewielką ilość $CaCO_3$ oraz 3 cm^3 96% C_2H_5OH . Po ekstrakcji barwników do alkoholu mieszaninę homogenizacyjną przesączyć przez bibułę filtracyjną do suchej probówki z podziałką. Do tkanek pozostałych w moździerzu dodać następną porcję alkoholu (3 cm^3) i dalej homogenizować. Czynności te powtarzać, aż do uzyskania 10 cm^3 klarownego alkoholowego ekstraktu z liści.

II.B. ROZDZIAŁ BARWNIKÓW METODĄ KRAUSA

Zasada metody

Zawarte w liściach barwniki asymilacyjne różnią się polarnością. Podczas ekstrakcji barwniki niepolarne (chlorofile i karoteny) przemieszczają się z warstwy alkoholowej do warstwy niepolarniej, natomiast barwniki polarne (ksantofile) pozostają w warstwie alkoholowej.

Wykonanie doświadczenia

Do suchej probówki z podziałką przenieść 3 cm^3 ekstraktu alkoholowego, a następnie dodać $4,5\text{ cm}^3$ cykloheksanu i 2–3 krople wody destylowanej w celu zwiększenia polarności frakcji alkoholowej i lepszego rozdzielenia warstw. Zamkniętą korkiem probówkę wytrząsać 0,5 minuty, a następnie wstawić do statywu w celu rozwarstwienia cieczy. Warstwa górna (cykloheksan) zabarwiona na zielono zawiera chlorofile oraz karoteny. Warstwa dolna (alkoholowa) zabarwiona na żółto zawiera ksantofile.

Opracowanie wyników

Przedstawić graficznie wygląd zawartości probówek przed i po ekstrakcji, zaznaczyć warstwy rozpuszczalników i zawarte w nich barwniki. Wyjaśnić obserwowany proces fizyczny.

II.C. BADANIE FIZYKOCHEMICZNYCH WŁAŚCIWOŚCI CHLOROFILU

1. Otrzymywanie feofityny

Zasada metody

W środowisku lekko kwasowym chlorofil traci atom magnezu, w wyniku czego powstaje oliwkowo-brunatna feofityna, natomiast w silnie kwasowym środowisku zostaje odszczepiony łańcuch fitolu i powstaje feoforbid.

Wykonanie doświadczenia

Do 3 cm³ alkoholowego ekstraktu barwników dodawać kroplami 20% HCl. Obserwować zmianę zabarwienia.

Opracowanie wyników

Zanotować obserwacje i podać wnioski z przeprowadzonego doświadczenia.

2. Odbudowa wiązania metaloorganicznego

Zasada metody

Charakterystyczną właściwością chlorofili jest możliwość łatwej wymiany jonów Mg²⁺ na jony innych metali dwuwartościowych. Efektem tych reakcji jest najczęściej zmiana barwy, np. wprowadzenie jonów Fe²⁺ daje pochodne chlorofilu o barwie szarobrunatnej, a wprowadzenie do cząsteczki chlorofilu jonów Cu²⁺ lub Zn²⁺ powoduje zwiększenie stabilności zielonej barwy.

Wykonanie doświadczenia

Do 2 cm³ feofityny otrzymanej w poprzednim zadaniu dodać kilka kryształków octanu miedzi i ostrożnie ogrzewać w płomieniu palnika. Brunatna barwa feofityny zmienia się na zieloną. Powstaje

wówczas porfiryne miedziowa. Kwas octowy jest katalizatorem reakcji. Porównać barwę roztworu otrzymanej porfiryne miedziowej z barwą alkoholowego ekstraktu barwników.

Opracowanie wyników

Zanotować obserwacje i podać wnioski z przeprowadzonego doświadczenia.

3. Zmydlanie chlorofilu

Zasada metody

W środowisku zasadowym następuje hydroliza – tzw. zmydlanie chlorofilu. Pod wpływem NaOH następuje odszczepienie od cząsteczki chlorofilu alkoholu metylowego i fitolu – powstaje szereg różnych chlorofilin. Ponieważ chlorofiliny zawierają w centrum układu porfiryнового atom magnezu, zachowują charakterystyczną dla chlorofilu zieloną barwę, a ich sole potasowe i sodowe są dobrze rozpuszczalne w wodzie.

Wykonanie doświadczenia

Do szklanej probówki z podziałką zawierającej 2 cm³ alkoholowego ekstraktu barwników dodawać kroplami 20% alkoholowy roztwór NaOH i dobrze wymieszać. Do roztworu zawierającego składniki powstałe po zmydleniu chlorofilu dodać 2 cm³ cykloheksanu i dokładnie wymieszać. Górna warstwa (cykloheksan) zabarwiona na żółto zawiera karoteny oraz powstały po zmydleniu fitol. Dolna warstwa (alkoholowa) ma zielone zabarwienie, ponieważ zawiera polarne chlorofiliny.

Opracowanie wyników

Zanotować obserwacje i porównać otrzymany wynik doświadczenia z doświadczeniem dotyczącym rozdziału barwników metodą Krausa.

4. Wytrącanie chlorofilu z roztworu

Zasada metody

Hydrofobowy charakter fitolu umożliwia lokalizację cząstek chlorofilu w lipidowych warstwach błon tylakoidów

i powoduje, że barwnik ten rozpuszcza się tylko w rozpuszczalnikach niepolarnych.

Wykonanie doświadczenia

Do alkoholowego ekstraktu barwników dodawać kroplami H_2O i obserwować wytrącanie się chlorofilu.

Opracowanie wyników

Zanotować obserwacje i podać wnioski z przeprowadzonego doświadczenia.

Doświadczenie III

Fluorescencja barwników

Zasada metody

Światło o określonej długości fali absorbowane przez chlorofil powoduje jego wzbudzenie. Powrotowi wzbudzonej cząsteczki do stanu podstawowego towarzyszy emisja promieniowania, czyli fluorescencja. Światło fluorescencji charakteryzuje się dłuższą falą w porównaniu ze światłem, które fluorescencję wywołało. Cząsteczki chlorofilu po zaabsorbowaniu światła UV (wysoka energia promieniowania) wykazują czerwoną fluorescencję (niska energia promieniowania).

Wykonanie doświadczenia

Alkoholowy ekstrakt z liści (por. II.A) obejrzyć w promieniach światła ultrafioletowego (UV). Obserwuje się czerwoną fluorescencję. Opisać i wyjaśnić zaobserwowane zjawisko. Sprawdzić zdolność do fluorescencji także dla feofityny, porfiryiny miedziowej oraz zmydlonego i wytrąconego z roztworu chlorofilu.

Opracowanie wyników

Zanotować obserwacje dotyczące wszystkich badanych barwników i podać wnioski z przeprowadzonego doświadczenia.

Literatura

Kłyszejko-Stefanowicz L. (red.), *Ćwiczenia z biochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

Kopcewicz J., *Podstawy biologii roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.