



Berenika Pokorska, Jakub Urbański, Joanna Lilpop

Szkola Festiwalu Nauki, ul. Ks. Trojdena 4,
02-109 Warszawa, E-mail: sfn@iimcb.gov.pl

Barwniki fotosyntetyczne

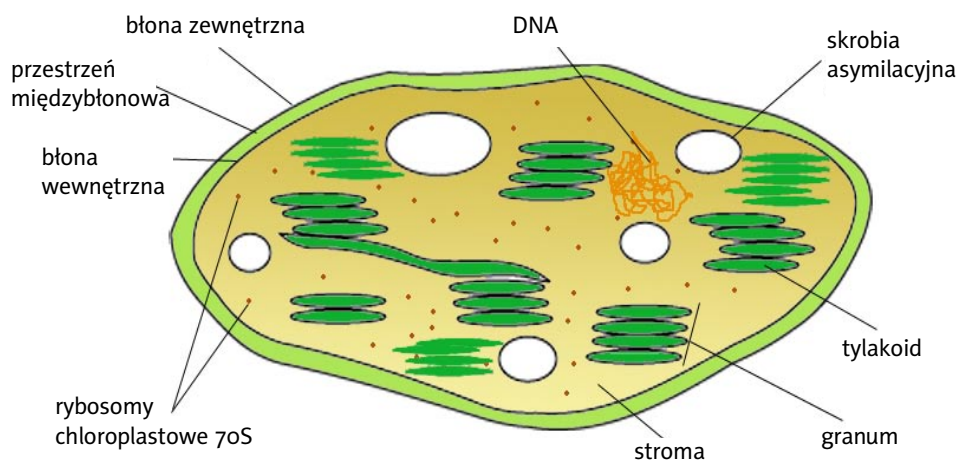
Rozdział chromatograficzny i identyfikacja barwników fotosyntetycznych liści

Wstęp

W trakcie fotosyntezy energia świetlna wylapywana jest przez chlorofile - barwniki które absorbują światło o długości fali poniżej 480 nm i pomiędzy 550 i 700 nm. Światło o długości fali pomiędzy 480 a 550 nm (czyli zielone) nie jest absorbowane przez chlorofile, lecz odbijane, dlatego właśnie liście są zielone. U roślin wyższych występują dwa chlorofile różniące się nieznacznie budową, nazywane *a* i *b*. Chlorofil *a* znajduje się w centrach reakcji fotosystemu pierwszego i drugiego, natomiast chlorofil *b* jest głównym składnikiem kompleksów zbierających energię świetlną. U roślin stosunek ilościowy chlorofilu *a* do *b* wynosi około 3 : 1. Chlorofile zostały odkryte na początku XX wieku przez Richarda Willstättera i jego współpracowników, a w 1915 r. za to odkrycie przyznano im Nagrodę Nobla z chemii.

Oprócz chlorofilu u roślin występują inne barwniki – karotenoidy, również zaangażowane w proces fotosyntezy, które związane są z białkami zbierającymi energię. Do karotenoidów zaliczamy ksantofile (w tym np. luteinę) i karoteny (w tym β -karoten). Karotenoidy absorbują energię świetlną w takim zakresie, w jakim nie mogą robić tego chlorofile, a także chronią chloroplasty przed nadmiarem energii, rozpraszając ją.

Barwniki fotosyntetyczne, zarówno chlorofile jak i karotenoidy, są związkami niepolarnymi, a więc źle rozpuszczają się w wodzie, natomiast bardzo dobrze w rozpuszczalnikach takich, jak aceton, etanol czy chloroform. Dlatego do ekstrakcji barwników z liści w doświadczeniu użyjemy mieszaniny etanol-aceton. Wyizolowane barwniki fotosyntetyczne można rozdzielić metodą chromatografii cienkowarstwowej adsorpcyjnej (TLC – ang. *Thin Layer Chromatography*). Płytki do chromatografii pokryte są tlenkiem krzemu, który może wiązać (adsorbować) różne cząsteczki. Im związek jest bardziej polarny, tym lepiej będzie przywiązany do płytki. Mało polarne związki słabo wiążą się z płytką i „wędrują” wraz z rozpuszczalnikiem, który używany jest do rozdzielu chromatograficznego. Jako rozpuszczalnik stosowany będzie odpowiednio przygotowany, silnie niepolarny, układ benzyna-aceton (10:1), dlatego barwniki fotosyntetyczne, które są najbardziej niepolarne, będą przemieszczać się wraz z rozpuszczalnikiem, a te bardziej polarne będą lepiej „trzymały się” płytki i nie przesuną się znacząco od miejsca, w którym zostały nałożone. Po rozwinięciu chromatogramu będzie możliwa identyfikacja chlorofilu *a* oraz *b* i karotenoidów.



Schemat struktury wewnętrznej chloroplastu. Barwniki fotosyntetyczne znajdują się w błonach tylakoidów wewnątrz chloroplastów

Materiały i sprzęt

Dla ucznia lub zespołu

- Etanol 95% do izolacji barwników, 5 ml
- Aceton, 5 ml
- Benzyna ekstrakcyjna, 30 ml (benzynę jako rozcieńczalnik można kupić w sklepach z farbami)
- Pusta probówka o pojemności 15 ml lub cylinder miarowy
- 1 pusta probówka o pojemności 50 ml
- Sączek z bibuły
- Płytkę do chromatografii cienkowarstwowej TLC
- 2 końcówki kapilarne do nakładania roztworu barwników na płytkę
- Pipetka pasteurowska o pojemności 3 ml
- Kubek plastikowy lub zlewka
- Drewniana bagietka
- Mały stoik z zakrętką
- Liście roślin hodowanych na świetle i w ciemności
- Łażnia wodna z gorącą wodą (np. miska)

Przygotowania wstępne

1. Około 4 tygodnie przed przeprowadzeniem doświadczenia wysiej fasolę. Nasiona najlepiej wysadzić do normalnej ziemi ogrodowej. Wcześniej mogą kiełkować na talerzyku z mokrą ligniną przykryte spodeczkiem lub folią aluminiową, aby nie wyschły. Naczynia z nasionami ustaw na parapecie. Kiedy fasola wykiełkuje siewki wyśadź do doniczek z ziemią. Połowę doniczek z siewkami przenieś do zaciemnionego pomieszczenia (lub np. do szczelnie zamykanej szafki). Trzymane w ciemności (etiolowane) rośliny posłużą jako kontrola negatywna. Pozostałe siewki powinny być hodowane ze swobodnym dostępem światła. Należy pamiętać o podlewaniu roślin co najmniej trzy razy w tygodniu.
2. Bezpośrednio przed zajęciami z izolacji barwników przygotuj mieszaninę do chromatografii benzyna-aceton w proporcji 10:1. Odmierz 30 ml benzyny ekstrakcyjnej i dodaj za pomocą pipetki 3 ml acetonu. Tak przygotowaną mieszaninę rozlej do małych zakręcanych stoików (dla każdego zespołu jeden stoik). Warstwa rozpuszczalników na dnie stoika nie powinna mieć więcej niż 5 mm.
3. Przed rozpoczęciem doświadczenia przygotuj łaźnię wodną: do miski nalej gorącej wody. Woda powinna być cały czas gorąca, może okazać się konieczne dolewanie wrzątku w czasie doświadczenia. Jeśli miska jest duża, może jej użyć kilka zespołów jednocześnie.

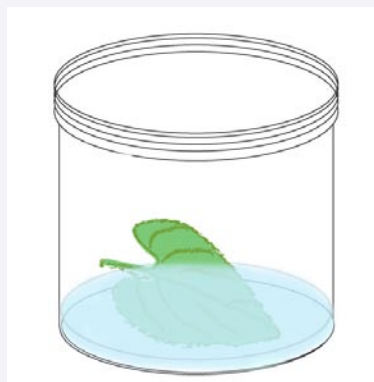
Procedura

1. Przeprowadź ekstrakcję barwników z liści.
 - a. Liść umieść w stoiku.
 - b. Zalej liść cienką warstwą etanolu
 - c. Umieść stoik w gorącej łaźni wodnej. Mieszaj zawartość stoika delikatnie nim kołyszając. Uważaj, aby woda nie dostała się do środka stoika. *UWAGA: Staraj się nie wdychać oparów ze stoika! Praca powinna być prowadzona pod wyciągiem lub w dobrze wentylowanym pomieszczeniu.*
 - d. W ciągu około 15 minut liście powinny się odbarwić, a barwniki fotosyntetyczne przejść do etanolu. Zielonego ekstraktu użyj do dalszej części chromatografii. Odbarwiony liść może posłużyć do doświadczenia wykrywającego skrobię jako substancję zapasową u roślin.

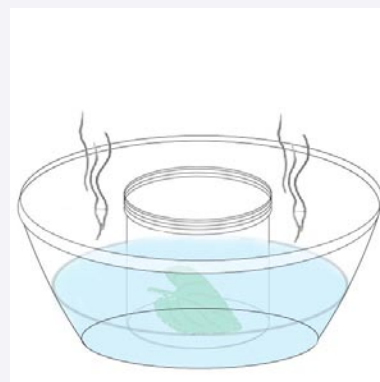
Rys. 1



Rys. 2



Rys. 3



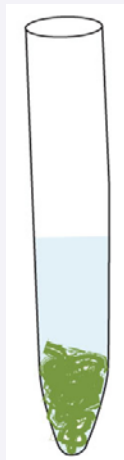
Alternatywnie, ekstrakt barwników z liści można otrzymać bez gotowania w etanolu, lecz ta metoda jest mniej wydajna:

- a. Drobnoposiekaj liście. W przypadku fasoli będą to 4 liście, w przypadku innych roślin potrzeba około 2 – 3 gramów liści. Rozdrobniony materiał umieść w pustej probówce o objętości 15 ml. *UWAGA: Jeżeli w pracowni szkolnej znajduje się moździerz, rozdrobnione liście należy zalać etanolem (5 ml) i utrzeć na jednolitą masę. Do rozdrobnionych liści można dodać szczyptę piasku, aby ułatwić rozcieranie w moździerzu. Jeżeli używałeś moździerza przejdź do punktu c.*
 - b. Używając pipetki pasteurowskiej zalej materiał 5 ml etanolu
 - c. Zakręć probówkę i intensywnie wytrząśnij jej zawartość przez kilka minut. Użyj drewnianej bagietki aby jeszcze lepiej rozdrobnić materiał w probówce. *UWAGA: Aby zwiększyć wydajność ekstrakcji barwników, na tym etapie doświadczenie można przerwać i odstawić probówkę w ciemne i chłodne miejsce na kilka dni.*
 - d. Krążek z bibuły zagnij tak, żeby utworzyć z niej lejek. Ekstrakt barwników przesącz przez sączek. Przesącz powinien mieć intensywnie zieloną barwę.
2. Ekstrakt barwników nakładaj przy pomocy końcówki kapilarnej na

Rys. 4



Rys. 5



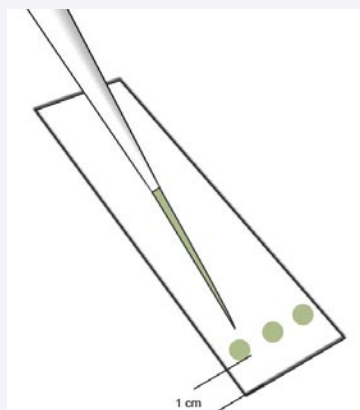
Rys. 6



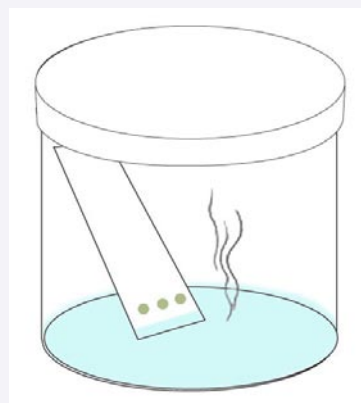
chropowatą stronę płytki do chromatografii, w odległości 1 cm od jej dolnej krawędzi. Uważaj, aby nie pobrudzić i nie uszkodzić złoża, którym pokryta jest płytka, dotykaj palcami tylko krawędzi płytki. Po nałożeniu każdej kropli odczekaj 10 sekund, dopóki kropla nie wyschnie, po czym dokładnie w to samo miejsce nakładaj kolejną kroplę. Nakładaj kolejne objętości kapilary tak, aby tworzący się na płytce ślad miał średnicę nie większą niż 5 mm. Nałóż przynajmniej 7 objętości kapilary. Naniesiony na płytkę materiał powinien mieć intensywnie zielony kolor.

3. Na płytkę możesz nałożyć dołączony do zestawu wzorec barwników jako kontrolę pozytywną.
4. Pozostaw płytkę do wyschnięcia na około 5 minut.
5. Wysuszoną płytkę wstaw pionowo do komory chromatograficznej. Mieszanina rozpuszczalników powinna sięgać poniżej poziomu naniesionych ekstraktów barwników. Zamknij stoik.
6. Prowadź chromatografię do momentu, gdy czoło rozpuszczalnika znajdzie się 1 cm przed górną krawędzią płytki. Następnie płytkę wyjmij i wysusz. Płytki można przechowywać w ciemności przez kilka tygodni.

Rys. 7



Rys. 8



Oczekiwane wyniki

Barwniki z ekstraktu z liści fasoli rozdzielają się na 4 pasma. Najszybciej, niemal z czołem rozpuszczalnika, migrują karotenoidy, następnie ksantofile, ciemnozielony chlorofil *a* i jasnozielony chlorofil *b*.

W ciemnoczerwonych liściach również jest chlorofil, chociaż jego obecność maskowana jest przez dużą ilość antocjanów.

W liściach starzejących się chlorofil jest rozkładany wcześniej niż karotenoidy, dlatego jest go znacznie mniej, niż w roślinach kontrolnych.

W korzeniach, w których nie zachodzą procesy fotosyntezy, a także w liściach roślin etiolowanych obecne są karotenoidy, ale nie ma chlorofilu.

Rozwiązywanie problemów:

Pasma rozdzielonych barwników są niewyraźne i rozmyte:

Płytkę do TLC mogła być niedokładnie wysuszona lub nałożono niewystarczającą ilość materiału. Komora nie była dobrze wysucona oparami rozpuszczalników. Na dnie komory było zbyt dużo rozpuszczalnika.

Barwniki z liści nie rozdzieliły się na 4 pasma, tak jak na rysunku:

Ekstrakcja była zbyt mało wydajna (zbyt słabo rozdrobnione tkanki roślinne), lub preparat był zbyt długo wystawiony na działanie wysokiej temperatury i promieni słonecznych. Spróbuj nałożyć na płytkę ekstrakt barwników otrzymany według procedury opisanej w doświadczeniu „Skrobia jako substancja zapasowa u roślin” (ekstrakcja mieszaniną etanol-aceton na gorąco). Jako rozpuszczalnika do chromatografii możesz użyć samej benzyny, bez acetonu. W tak niepolarnym rozpuszczalniku lepiej rozdzielią się karotenoidy, chlorofile jako bardziej polarne będą gorzej rozdzielone.



Schemat ilustrujący rozdzielone barwniki fotosyntetyczne na płytce TLC

Pytania kontrolne:

- Jaki barwnik odgrywa kluczową rolę w procesie fotosyntezy?
- W jakich komórkach i jakich przedziałach komórkowych zlokalizowane są barwniki fotosyntetyczne?
- Jaką rolę pełnią w roślinach karotenoidy?
- Jakie jest ewolucyjne pochodzenie chloroplastów?
- Jak rozdzielone są faza jasna i faza ciemna fotosyntezy u roślin C₄ i CAM. Z czym związane są te przystosowania?
- Jaki jest ogólny wzór fotosyntezy?

Pomysły na dodatkowe doświadczenia

Ciekawym doświadczeniem jest porównanie jakościowe zawartości barwników fotosyntetycznych z różnych gatunków roślin oraz na przykład roślin w różnym stadium rozwoju - młodych i starzejących się.

Czas wykonania doświadczenia

Wykonanie doświadczenia zabiera około 40 minut.

Bezpieczeństwo i usuwanie odpadów



- Aceton, mieszanina etanol-aceton, benzyna - są łatwopalne. Aceton, mieszanina etanol-aceton i benzyna są trucznymi – w przypadku spożycia należy niezwłocznie skontaktować się z lekarzem. Rozpuszczalniki należy przechowywać w szczelnie zamkniętych naczyniach, osłonięte od światła i źródeł ciepła w temperaturze pokojowej. Przy wszystkich czynnościach należy zachować szczególną ostrożność. W przypadku kontaktu ze skórą zmyć ciepłą wodą z mydłem. Wdychanie oparów rozpuszczalników może być szkodliwe dla zdrowia, doświadczenia należy przeprowadzić w dobrze wentylowanym pomieszczeniu lub pod wyciągiem. Puste pojemniki po rozpuszczalnikach oraz zlewki rozpuszczalników należy wyrzucić do przeznaczonych na tego typu odpady pojemników (na przykład na stacji benzynowej).
- Sączki bibułowe po użyciu można wyrzucić do pojemnika na zwykłe śmieci. Można zastąpić je filtrami do kawy.
- Końcówki kapilarne – końcówek nie powinno się używać więcej niż jeden raz. Zużyte końcówki można wyrzucić do pojemnika na zwykłe śmieci.
- Probówkę z wzorcem barwników fotosyntetycznych należy przechowywać w lodówce, chronić przed światłem.

Dostawcy

Mieszaninę etanol-aceton można zastąpić 70% alkoholem etylowym (może być odpowiednio rozcieńczony spirytus rektyfikowany) z dodatkiem 2-3 % acetonu. Wszystkie te odczynniki dostępne są w sklepach chemicznych lub z farbami.

Benzyna ekstrakcyjna dostępna jest w sklepach z farbami jako rozcieńczalnik oraz w sklepach chemicznych.

Płytki TLC można zakupić w sklepach z wyposażeniem laboratoriów, np. Linegal Chemicals, ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa, tel. 48 22 631-72-81, www.linegal.com.pl.

W Szkole Festiwalu Nauki można kupić zestaw edukacyjny „Tajemnice fotosyntezy” umożliwiający przeprowadzenie niniejszego doświadczenia z 30 osobową klasą.

Podziękowania

Protokół został opracowany w ramach projektu „Science of Modern Biology – Exploratory Resources for Biology Teachers and Students” finansowanego przez UNESCO.

Ilustracje wykonała Anna Lea Chojnacka.

Niniejszy protokół praktyczny został zaadaptowany do projektu Volvox finansowanego z Szóstego Programu Ramowego Unii Europejskiej.

