

Лабораторна робота № 10

ЕКСТРАКЦІЯ ПЛАСТИДНИХ ПІГМЕНТІВ

Фототрофна функція – це сукупність процесів поглинання, перетворення та використання в багатьох ендергонічних реакціях світлових квантів, у яких відбувається первинне становлення пластичних та енергетичних ресурсів життя на нашій планеті.

Особливістю рослинної клітини є наявність у ній хлоропластів, у яких утворюється органічна речовина із CO_2 і H_2O за рахунок енергії Сонця.

Фотосинтез – це окисно-відновний процес. За участю хлорофілу й енергії сонячних квантів вода фотоокиснюється, в результаті чого виділяються кисень та водень, останній і відновлює вуглекислий газ до рівня вуглеводів. Ці реакції відбуваються відповідно в світлову та темнову фази фотосинтезу.

У тилакоїдах хлоропласта відбуваються світлові реакції фотосинтезу: уловлювання квантів світла пігментами – хлорофілом, каротиноїдами, фікобілінами, фотоокиснення води, транспортування електронів за участю електронно-транспортного ланцюга з утворенням відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату ($\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$) і макроергічних сполук аденозинтрифосфату (АТФ).

Певна частина синтезованих у світлових реакціях $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ і АТФ у подальшому використовується в процесі синтезу органічних сполук із вуглекислого газу та води. Ці реакції відбуваються у стромі хлоропласта і їх називають темновими реакціями фотосинтезу, бо кванти світла в них безпосередньо не беруть участі. Стромою називають внутрішній вміст хлоропластів, де локалізовані ферменти, які фіксують та відновлюють вуглекислий газ до вуглеводів.

Засвоєння вуглекислого газу в хлоропласті, тобто асиміляція його вуглецю до складу органічних сполук, відбувається в складному циклі реакцій Кальвіна–Бенсона–Бассема. Найголовнішим ферментом темного циклу є рибулозобісфосфат-карбоксилаза (оксигеназа) – РУБІСКО, яка забезпечує приєднання вуглекислоти до п'ятивуглецевої сполуки – вуглеводу рибулозобісфосфату. Утворений унаслідок такої реакції короткоіснуючий шестивуглецевий продукт розпадається з формуванням двох тривуглецевих молекул фосфогліцеринової кислоти (ФГК). Відновлення молекули ФГК до фосфогліцеринового альдегіду і є власне відновлювальною реакцією на шляху перетворення вуглекислого газу в молекулу вуглеводу.

Наступні складні перетворення сполук у циклі Кальвіна–Бенсона–Бассема забезпечують регенерацію молекул рибулозобісфосфату для приєднання нової молекули CO_2 , а також зумовлюють утворення стабільного продукту фотосинтезу – шестивуглецевого вуглеводу – глюкози.

Усі фотосинтезуючі організми містять пігменти, які запускають фотофізичні та фотохімічні реакції фотосинтезу. Найважливіші з них хлорофіли та каротиноїди, тому розділ «Фотосинтез» розпочинається з практичних занять, що розкривають хімічні та фізичні властивості фотосинтезуючих пігментів.

Пігменти локалізовані в тилакоїдах хлоропластів, де пов'язані з мембранними білками і ліпідами. Для екстракції пігментів з рослинного матеріалу використовують полярні розчинники – етиловий спирт або ацетон, які денатурують білки і руйнують пігментліпопротеїновий комплекс.

Для характеристики фотосинтетичного апарату рослинних організмів використовують такі параметри, як кількісний вміст окремих пігментів, їх співвідношення і фракційний склад, міцність зв'язку хлорофілів із білком, фотохімічну активність, залежність вмісту пігментів від умов освітлення, живлення, етапів онтогенезу тощо. Досліджують також хімічне перетворення хлорофілів у хлорофілід і феофітин. Важливою характеристикою фотосинтезуючих пігментів є спектри поглинання світлової енергії та флуоресценції, активність ферменту хлорофілази, яка бере участь у біосинтезі хлорофілів.

Різні види пігментів розпізнають за допомогою їхніх спектральних характеристик. Наприклад, спектри поглинання у різних груп хлорофілів залежать від характеру бічних груп пірольних кілець порфіринового ядра молекули і типу органічного розчинника. Потім виконують роботи, в яких визначають активність функціонування різних ферментів, інтенсивність фотосинтезу за накопиченням органічних сполук у тканинах і зміною концентрації вуглекислого газу або кисню в навколишньому середовищі (газометричні методи) на одиницю фотосинтезуючої поверхні за одиницю часу.

Пігменти з фотосинтезуючих тканин рослини екстрагують полярними розчинниками (етиловим спиртом, ацетоном), які руйнують їхній зв'язок із мембранами хлоропластів і тим самим забезпечують повне екстрагування пігментів. Під час розтирання матеріалу з неполярними розчинниками, які не здатні денатурувати білки, в екстракт переходить незначна кількість

пігментів. Розтертий матеріал у спирті залишається зеленим і тоді, коли в ньому спостерігається висока активність ферменту хлорофілази, яка відщеплює спирт *фітол* від хлорофілу. Тоді утворюється *хлорофілід* зеленого кольору з такими самими спектральними характеристиками, що і хлорофіли, але з гідрофільними властивостями. Тому хлорофілід не розчиняється в полярних розчинниках, а осад на фільтрі після екстракції фотосинтетичних пігментів залишається зеленим.

Для отримання витяжки пігментів можна використовувати як сирий, так і сухий матеріал. В останньому випадку висушені листки попередньо обробляють гарячою водою, щоб спростити процедуру вилучення пігментів з них.

Мета роботи. Отримати екстракт пластидних пігментів із рослин різних систематичних груп, проаналізувати повноту екстракції пігментів використовуючи воду, полярні та неполярні розчинники.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки пеларгонії, проростки гороху, кукурудзи, пшениці; ацетон, етиловий спирт, петролейний ефір або гексан, карбонат кальцію; порцелянові ступки, скляні пластинки для подрібнення матеріалу, скляні палички, фільтри Шотта N 3 або N 4, колби Бунзена, центрифужні та мірні пробірки, ножиці, свердла, вакуумні насоси, ваги з різноважками.

Хід роботи.

1. Листки різних рослин подрібнити ножицями або скальпелем.
2. Подрібнену наважку (0,2; 0,5 г) розтерти у ступці, додаючи на кінчику скальпеля CaCO_3 для нейтралізації кислот клітинного соку.
3. Зволожити матеріал незначною кількістю розчинника, розтерти до гомогенної маси і кількісно перенести на фільтр Шотта, змиваючи багаторазово ступку невеликими порціями ацетону (варіант перший), спирту (варіант другий), петролейного ефіру (варіант третій) і водою (варіант четвертий).
4. Фільтр Шотта вставити в пробірку, що міститься в колбі Бунзена, яку з'єднати із насосом.
5. Розчини відфільтрувати, змиваючи стінки фільтра невеликими порціями розчинника доти, поки відфільтрована рідина настане безбарвною.
6. Об'єм розчину довести відповідними розчинниками до 10 мл.
7. Вміст у пробірці збовтати. Порівняти забарвлення розчинів візуально.
8. Визначити екстинцію отриманих екстрактів на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 660 нм.

Примітка. У контрольну кювету наливають розчинник, а вішну – досліджуваний розчин.

9. Результати спостережень записати до таблиці 1.

Таблиця 1.

Ефективність використання різних органічних розчинників для екстракції
пластидних пігментів

Рослина	Варіант досліду, використаний екстрагент	Оптична густина розчину, ум. од.
	Ацетон	
	Спирт	
	Петролейний ефір	
	Вода	

10. За величиною екстинції розчинів зробити висновок про розчинність пластидних пігментів у різних розчинниках. Пояснити одержані дані, враховуючи стан пігментів у хлоропластах їх хімічну природу.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому вода не екстрагує пігменти хлоропластів?
2. Чим можна пояснити наявність каламуті в водно-ацетонових розчинах пластидних пігментів?
3. Чим можна пояснити той факт, що після промивання 80 %-им ацетоном або 96 %-им етиловим спиртом осад із листків персика і борщівника залишається зеленим?
4. Які пігменти залишаються в осаді у разі використання таких розчинників як петролейний ефір або гексан?
5. Що входить до складу екстрактів пігментного комплексу різних рослин?
6. Як змінюється колір пігментних екстрактів за дії світла, що проходить крізь розчин або відбивається від нього?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

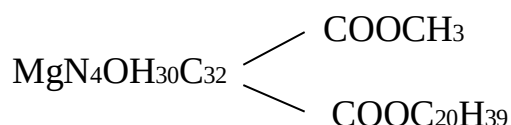
ВИЯВЛЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ХЛОРОФІЛУ

Весь пігментний комплекс зосереджений в спеціалізованих органелах клітини — хлоропластах. Пігменти — це сполуки, що вибірково поглинають світло у видимій частині спектра.

Пластидні пігменти поділяють на три класи: хлорофіли, фікобіліни та каротиноїди.

Хлорофіли обумовлюють зелений колір рослин. Основний пігмент, що забезпечує проходження процесу фотосинтезу — хлорофіл а ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$). Поглинаючи сонячну енергію, він здійснює трансформацію, забезпечує утворення органічних сполук і виділення молекулярного кисню (яким ми дихаємо). В фотосинтезуючому рослинному організмі є пігменти допоміжні: хлорофіл b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$), каротиноїди.

Хлорофіли — складні ефіри дикарбонової хлорофілінової кислоти з двома спиртами: метилового спирту та фітолу:



Хроматографічно хлорофіли було розділено на: хлорофіл а ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) та хлорофіл b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$).

Гідрофільні властивості хлорофілів пов'язані з їхнім азотовмісним порфі-риновим ядром. Завдяки вуглецевому ланцюгу — "довгому хвосту" фітолу, що приєднується до порфіринової частини молекули, хлорофіли набувають гідрофобних властивостей, добре розчиняються в ацетоні, спирті, бензині та нерозчинні у воді.

Хлорофіли та каротиноїди складають постійний набір пігментів хлоропластів в листках вищих рослин. Оскільки вони є найважливішими компонентами фотосинтетичного апарата, їх досліджують насамперед як пігменти фотосинтезу.

Реакція Крауса оснований на різній розчинності пігментів в одному і тому ж розчиннику — спирті (бензині). Завдяки цьому методу можна розділити пластид-ні пігменти, тобто розділити хлорофіли та каротиноїди із загального екстракту.

Мета роботи: дослідити розподіл пігментів за методом Крауса, навчитися робити спиртову витяжку суміші пластидних пігментів з фотосинтезуючих тканин дослідних об'єктів, прослідкувати реакцію омилення хлорофілу.

Прилади та матеріали: 96 % етиловий спирт, бензин (ефір, бензол, ацетон), NaOH (KOH), вода, крейда — $CaCO_3$, кварцевий пісок (подрібнене скло), фільтрувальний папір (вата), скляні палички, лійки, мірні циліндри, пробірки, піпетки, зелені листки дослідних об'єктів.

Хід роботи

1. Отримання спиртової екстракції пластидних пігментів з листків

Для цього наважку (1-2 г) листків дослідних рослин розтерти в ступці до однорідної маси. Додати в ступку на кінчику скальпеля крейди (для нейтралізації кислот клітинного соку) і подрібнене скло або кварцевий пісок. Добре розтерти. В ступку до гомогенної маси влити невелику кількість етилового спирту. Перемішати скляною паличкою та профільтрувати. Отриманий розчин (0,5 частини пробірки) суміші пластидних пігментів листків повинен мати концентрований зелений колір.

2. Розподіл пігментів (за методом Крауса). Одержання хлорофілінів.

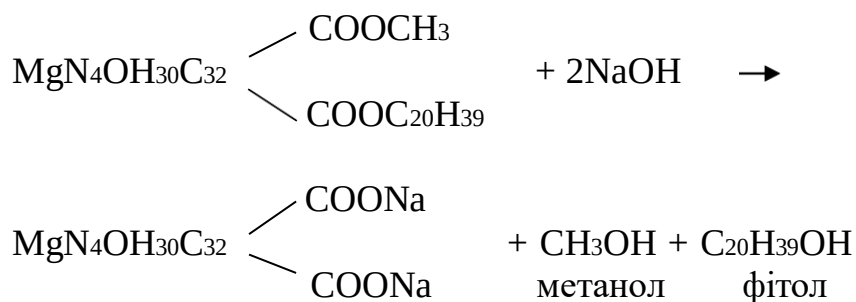
В отриманій спиртовій екстракції пластидних пігментів з листків дослідних рослин містяться пігменти, за участю яких проходить процес фотосинтезу: хлорофіл, що має довгий вуглеводний "хвіст" та каротиноїди. Пігменти розподіляють за Краусом завдяки їхній різній розчинності у спирті (бензині, бензолі, ацетоні).

При додаванні лугу до розчину хлорофілу відбувається реакція омилення хлорофілу: відщеплюються спирти фітол і метанол, а двоосновна кислота хлорофілу утворює сіль: Солі хлорофілів мають зелений колір, але на відміну від хлорофілу не розчинні у бензині.

З отриманої спиртової екстракції пластидних пігментів листків дослідних рослин відібрати в пробірку 3 мл і додати 5 мл бензину та 2-3 краплини води. Пробірку щільно закрити пробкою і збовтати. Протягом 5-10хв. відбудеться розділення пігментів: у верхньому зеленому (бензиновому) шарі міститься розчинений хлорофіл, а нижньому жовтому (спиртовому) – ксантофіл. Зробити висновки. Пробірки замалювати.

3. Реакція омилення хлорофілу.

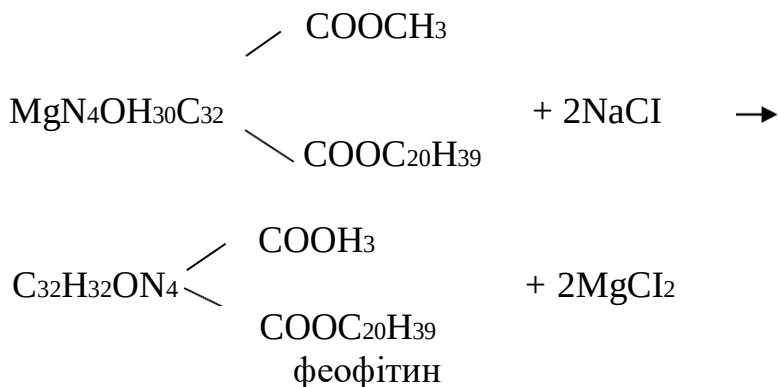
Після розділення, в пробірку додати 10-15 крапель 20% розчину лугу (KOH або NaOH). Добре перемішати. Протягом 5-10 хвилин шари зеленого та жовтого забарвлення поміняються місцями, внаслідок утворення солі хлорофілінової кислоти (реакція омилення хлорофілу).



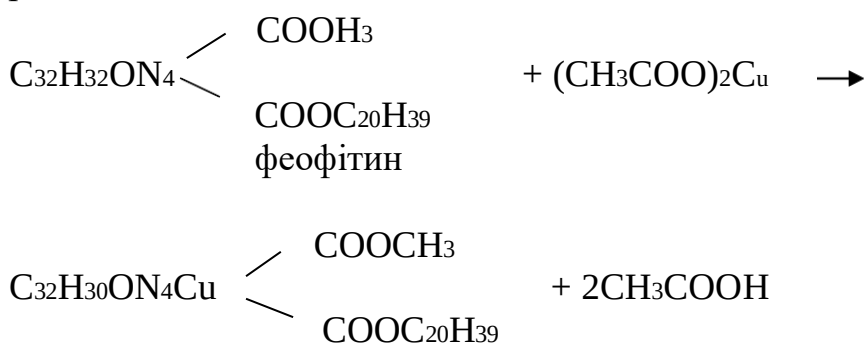
Каротин знаходиться у верхньому (жовтому) шарі, а солі хлорофілінової кислоти, як і хлорофіл, мають зелений колір, але гідрофільні властивості, тому переходять у нижній водно-спиртовий шар. Пробірки зарисувати.

4. Одержання феофітину та зворотне заміщення водню атомом металу

До 2-3 мл спиртового екстракту пластидних пігментів з листків дослідних рослин помістити у дві пробірки (одна з яких — контрольна). В першу пробірку додати 2-3 краплини 20% розчину соляної кислоти. Зелене забарвлення змінюється на буре в результаті утворення феофітину.



В контрольну пробірку додати 2-3 краплини води. Забарвлення залишається без змін. В першу пробірку, де утворився феофітин (буре забарвлення), на кінчику скальпеля внести декілька кристалів ацетату міді (ацетату цинку). Буре забарвлення поступово змінюється на зелене за рахунок відновлення металоорганічного зв'язку, що відбувається за такою реакцією:



Пробірку зарисувати.

Контрольні запитання.

1. Яка роль належить пластидним пігментам у процесі фотосинтезу?
2. Які гідрофільні та гідрофобні властивості має хлорофіл?
3. На чому базується метод Крауса?
4. Чим хлорофілінова кислота відрізняється від її солі?
5. Поясніть реакцію омилення хлорофілу лугом.

6. Як можна виявити каротин і ксантофіл?
7. Під дією яких факторів утворюється феофітин?