



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 221. AUGALŲ SISTEMATIKA IR FIZIOLOGIJA

Laboratorinis darbas

Fotosintezės pigmentų nustatymas

Fotosintezės pigmentai – tai augalų pigmentai, sugebantys sugerti saulės šviesos energiją ir ją panaudoti fotosintezei. Aukštesniųjų augalų fotosintezės pigmentai – chlorofilai ir karotinoidai.

Chlorofilu (gr. chloros – žalias, phyllon – lapas) Z.Peltjė ir Z.Kavantu pavadino žaliajį augalų pigmentą, kai 1818 m. pirmą kartą jį išskyrė iš lapų. Yra keletas chlorofilų: a, b, c₁, c₂, d ir bakterijose esantys chlorofilai. Chlorofilo a (C₅₅H₇₂O₅N₄Mg) turi visi fotosintezėje dalyvaujantys augalai, chlorofilo b (C₅₅H₇₀O₆N₄Mg) turi aukštesnieji augalai ir žaliadumbliai. Nors chlorofilų a ir b cheminė sudėtis yra labai panaši, vis dėlto jie skiriasi spalva, paplitimu ir atliekamomis funkcijomis. Chlorofilas a yra melsvai žalias, chlorofilas b – gelsvai žalias. Itin paplitęs ir svarbesnis yra chlorofilas a. Be jo fotosintezė išvis nevyksta, todėl jo turi visi žalieji augalai. Paplitęs ir chlorofilas b, tačiau visuose augaluose jo yra mažiau nei chlorofilo a. Trims pastarojo molekulėms vidutiniškai tenka viena chlorofilo b molekulė, o kartais tas santykis gali siekti 5:1. Bendras chlorofilų a ir b kiekis yra nedidelis: jų daliai tenka mažiau nei 1% sausosios lapų masės.

Chlorofilų c₁ ir c₂ turi rudadumbliai, titnagdumbliai, gelsvadumbliai ir auksadumbliai. Chlorofilo d yra raudondumbliuose. Bakterijose, kurios atlieka fotoredukciją, yra įvairių bakteriochlorofilų.

Būdinga visų chlorofilų savybė yra ta, kad jie netirpsta vandenyje ir greitai pakinta veikiami šarmų bei rūgščių. Todėl, kad nepakistų chlorofilas, iš augalų jį reikia ekstrahuoti neutraliais organiniais tirpikliais – metanoliu, etanoliu, acetonu.

Augaluose chlorofilai būna susiję su baltymais ir lipidais. Chlorofilus ekstrahuojant, šie ryšiai nutrūksta ir dėl to pakinta kai kurios jų savybės. Augale esantys chlorofilai atsparūs įvairiems aplinkos veiksniams. Jie pradeda irti tik labai stiprioje šviesoje ir tuo pačiu laiku trūkstant vandens. Ekstrahuoti iš augalų chlorofilai pasidaro jautrūs šviesai ir deguoniui ir jų veikiami greitai praranda spalvą – išblunka. Šio reiškinio priežastis yra fotooksidacija. Šį faktą patvirtina tai, jog chlorofilų ekstraktas ilgai neišblunka tamsoje ir aplinkoje be deguonies.

Svarbiausia chlorofilų savybė yra geba sugerti šviesos spindulius. Chlorofilai intensyviai sugeria violetinius ir mėlynuosius ($\lambda=400-470$ nm) bei raudonuosius ($\lambda=620-700$ nm) regimosios šviesos spindulius, o kitų beveik nesugeria. Chlorofilų a ir b sugerties spektrai nesutampa. Skiriasi ir šių chlorofilų šviesos sugerties koeficientai: raudonuosius spindulius intensyviau sugeria chlorofilas a, mėlynuosius – chlorofilas b.

Karotinoidais (lot. carota – morka, gr. eidos – pavidalas) vadinami oranžinės, geltonos ir rudos spalvos pigmentai, kurių randama beveik visuose augaluose ir gyvūnų organizmuose, išskyrus kai kuriuos grybus. Jų dažniausiai būna nedaug. Pavyzdžiui, augalų lapuose karotinoidai vidutiniškai sudaro 0,07 – 0,2 % jų sausosios masės, kai kurių augalų organuose šių pigmentų koncentracija būna didesnė. Daug karotinoidų yra morkų šakniavaisiuose, batato šakniagumbiuose, vaisiuose, žiedų vainiklapiuose, dulkinėse ir žiedadulkėse.

Iš viso dabar žinoma apie 400 įvairių karotinoidų. Atsižvelgiant į cheminę sudėtį, karotinoidai skirstomi į dvi grupes. Vienai grupei priklauso tie, į kurių sudėtį neįeina deguonis, o kitai grupei priskiriami deguonies turintys karotinoidai.

Iš bedeguonių karotinoidų gamtoje itin paplitę likopinas ir karotinas.

Likopinas ($C_{40}H_{56}$) – nesotusis atviros anglies grandinės angliavandenis. Jis yra raudonos spalvos, randamas bakterijose, grybuose, dumbliuose, pomidorų, bruknių uogose, erškėčių, arbūzų vaisiuose.

Karotinu buvo pavadintas oranžinės spalvos pigmentas, 1831 m. išskirtas iš morkų (*Daucus carota*) šakniavaisių. Praėjus beveik šimtui metų, chromatinės analizės metodu buvo nustatyta, kad yra keli karotino izomerai, iš kurių ypač paplitę α , β ir γ . Visų karotinų cheminė sudėtis yra tokia pati kaip ir likopino, bet nuo pastarojo jie skiriasi struktūra.

Biologiškai svarbiausias β -karotinas. Jo molekulėje visos 11 dvigubų jungčių yra konjuguotos, iš jų dvi įeina į β -jonono žiedus, esančius molekulės galuose. Dėl to β -karotino

molekulė yra visiškai simetriška ir optiškai neaktyvi. Bakterijų ląstelėse, grybuose, dumbliuose, žiedadulkėse ir augalų lapuose β -karotino yra daugiau negu kitų izomerų. Skylant β -karotino molekulei pusiau per centrinę dvigubą jungtį, susidaro dvi vitamino A molekulės. Tokia jo hidrolizė vyksta gyvūnų ir žmogaus organizmuose.

Izomerų α ir γ molekulės nesimetriškos, nes α -karotinas viename molekulės gale turi β -jonono žiedą, kitame – α -jonono žiedą; γ - karotinas turi tik vieną β -jonono žiedą, o kitame molekulės gale yra atvira anglies grandinė. Dėl šių priežasčių abu izomerai yra biologiškai ne tokie vertingi, palyginus su β -karotinu, nes, jiems skylant, susidaro tik po vieną vitamino A molekulę.

Visi karotino izomerai lengvai redukuojasi arba oksiduojasi. Kai dvigubų jungčių vietą užima 8 vandenilio atomai, karotinas pasidaro bespalvis. Taip pat lengvai karotinas prisijungia ir atmosferos deguonį.

Karotinoidai, į kurių sudėtį įeina deguonis, vadinami ksantofilais. Svarbiausias ir itin paplitęs ksantofilų grupės pigmentas yra liuteinas ($C_{40}H_{56}O_2$). Augalų lapuose jis sudaro iki 60% bendro ksantofilų kiekio. Kartu su karotinu liuteinas yra neatskiriama chloroplastų sudėtinė dalis. Be to, liuteino randama bakterijose, dumbliuose, požeminiuose augalų organuose, medžių žievėje ir medienoje, vaisiuose, žiedadulkėse.

Augalų lapuose visada aptinkama dar dviejų ksantofilų – violaksantino ($C_{40}H_{56}O_4$) ir neoksantino ($C_{40}H_{56}O_4$). Abu šie pigmentai taip pat yra neatskiriami chlorofilų palydovai, tačiau randami ir tokiuose augalų organuose, kur chlorofilų nebūna.

Augalų lapuose taip pat aptinkama zeaksantino ($C_{40}H_{56}O_2$), kukurūzų grūduose, mandarinų vaisių žievėje – kriptoksantino ($C_{40}H_{56}O$), erškėčių vaisiuose – rubiksantino ($C_{40}H_{56}O$) ir kt.

Karotinoidai ne tik paplitę gamtoje, bet ir atlieka įvairias funkcijas. Karotinoidai svarbūs augalų dauginimuisi. Nustatyta, kad jie skatina žiedadulkių dauginimąsi ir manoma, jog veikia spermatozoidų judrumą. Gali būti, kad karotinoidai reikalingi ir fototropizmui, nes jautriausiai augalai reaguoja į to bangos ilgio (460 nm) šviesos spindulius, kuriuose intensyviausiai absorbuoja β -karotinas.

Viena iš karotinoidų funkcijų – dalyvavimas fotosintezėje. Jie absorbuoja violetinius, mėlynus bei žaliuosius spindulius ir jų energiją perduoda chlorofilams. Didžiausią šios energijos dalį perduoda karotinu (bet ne ksantofilų) molekulės.

Karotiniai taip pat apsaugo chlorofilus nuo fotooksidacijos. Jau seniai buvo pastebėta, kad yra tiesioginis ryšys tarp chlorofilų irimo greičio saulės apšviestame ekstrakto ir karotinoidų kiekio jame. Vėliau analogiški duomenys buvo gauti tiriant bechlorofilus kukurūzų ir saulėgražų mutantus. Pasirodo, šie augalai chlorofilą sintetina, bet visai neturi

karotinoidų apsauginis poveikis aiškinamas šitaip: jie reaguoja su tripletinės būsenos sužadintomis chlorofilų molekulėmis ir neleidžia joms oksiduotis, nes jų sužadinimo energija paverčiama šiluma.

Metodiniai paaiškinimai

Darbas susideda iš dviejų dalių. Pradžioje išskiriami įvairiuose augaluose esantys pigmentai ir paruošiami tirpalai spektriniams matavimams. Antroje dalyje užregistruojamas ir dokumentuojamas tiriamųjų tirpalų optinis tankis, atliekami skaičiavimai.

Chlorofilų a ir b bei karotinoidų nustatymas

Prietaisai ir indai

Spektrofotometras
Analizinės svarstyklės
Traukos spinta
Porcelianinė grūstuvė
Stiklinis filtras
Vakuuminis siurblys
Matavimo kolba
Filtravimo kolba
Praplovimo buteliukai acetoniui
Piltuvėlis
Kamštukai
Silikonis kamštis
Kiuvetės

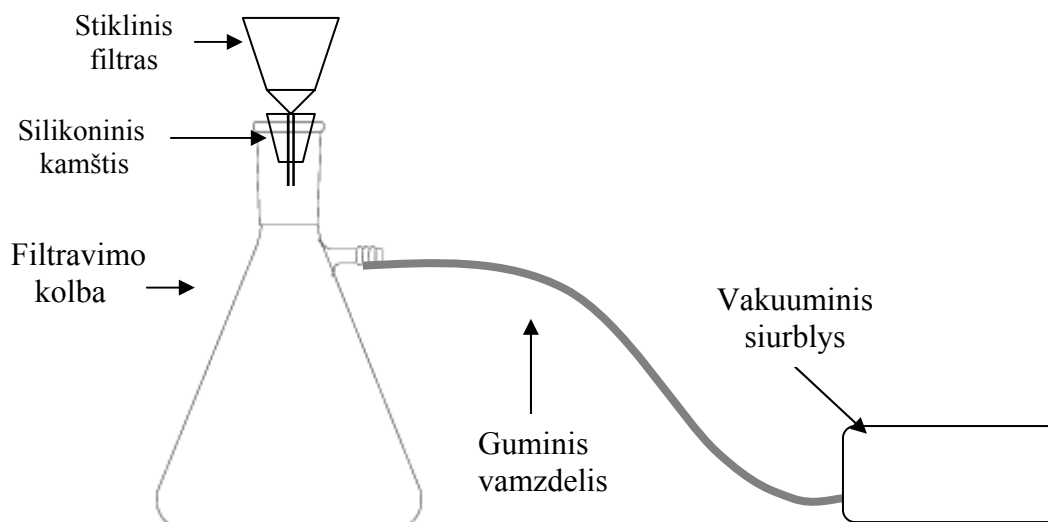
Cheminiai reagentai

CaCO₃
Acetonas

Augalų ekstraktų paruošimas

Ruošiant ekstraktus, augalus studentas pasirenka savo nuožiūra. Žolinių augalų paprastai imami 2-3 užaugę lapai nuo viršūnės, o sumedėjusių – iš ūglio vidurio. Iš nuskintų tyrimams lapų pasveriami maždaug 0,2-0,5 g masės. Lapai smulkiai sukarpomi ir sudedami į porcelianinę grūstuvę, kurioje jie sutrinami. Lapai trinami su nedideliu 100% acetono ir CaCO₃ kiekiu. Į filtravimo kolbą sandariai su silikoniniu kamščiu įstatomas stiklinis filtras, kolba sujungiama su vakuuminiu siurbliu (1 pav.). Tirpalas per stiklinį filtrą filtruojamas vakuuminiu siurbliu į filtravimo kolbą. Grūstuvė perplaunama acetonu, tol kol skystis būna

bespalvis ir pilama į filtrą. Paruoštas ekstraktas supilamas į 50 ml kolbutę ir papildoma acetonu iki brūkšnio. Kolbutė užsandarinama. Jei dar ruošiami kiti pavyzdžiai, paruoštą ekstraktą reikėtų laikyti vėsiai tamsoje.



1 pav. Tirpalo filtravimas

Paruoštų ekstraktų optinio tankio matavimas

Laboratorijoje optinio tankio matavimams yra naudojamas spektrofotometras. Augalų ekstraktų optinis tankis yra matuojamas 1 cm stiklinėse kiuvetėse (plastikines sugadina acetonas) prie tokių bangos ilgių:

440,5 nm – karotinoidai;

662 nm – chlorofilas a (Chl a);

644 nm – chlorofilas b (Chl b).

Duomenų tvarkymas

Žinant ekstrakto optinį tankį prie atitinkamų bangų ilgių, apskaičiuojama pigmentų kiekis. Pigmentų kiekis mg l^{-1} apskaičiuojamas pagal formules:

$$\text{Chl a (mg l}^{-1}\text{)} = 9,784 \cdot D_{662} - 0,990 \cdot D_{644} \quad (1)$$

$$\text{Chl b (mg l}^{-1}\text{)} = 21,426 \cdot D_{644} - 4,650 \cdot D_{662} \quad (2)$$

$$\text{Chl a+b (mg l}^{-1}\text{)} = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644} \quad (3)$$

$$\text{Karotinoidai (mg l}^{-1}\text{)} = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 \cdot (\text{Chl a+b mg l}^{-1}\text{)} \quad (4)$$

kur D – optinis tankis ištraukoje prie atitinkamų bangų ilgių.

Pigmentų kiekis žalioje masėje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$A = \frac{C \cdot V}{P \cdot 100} \quad (5)$$

kur C- pigmentų koncentracija mg l⁻¹; V – pigmentų ištraukos tūris ml; P – augalinės medžiagos svoris g; A – pigmentų kiekis mg g⁻¹ žalios masės.

Klausimai savarankiškam darbui

1. Kokie yra aukštesniųjų augalų fotosintezės pigmentai?
2. Kokie tirpikliai naudojami ekstrahuojant iš augalų chlorofilus ir kodėl?
3. Kuo svarbūs chlorofilai ir karotinoidai?

Literatūros sąrašas

1. A Dictionary of Biology. Third edition. Oxford, New York. Oxford University press. 1996, 553 p.
2. Bluzganas P., Borusas S., Dagys J., Gruzdienė J., Stašauskaitė S., Šlapakauskas V., Vonsavičienė V. Augalų fiziologija. Vilnius: Mokslas, 1990, 420 p.
3. Visuotinė lietuvių enciklopedija. Vilnius: mokslo ir enciklopedijų leidybos institutas. 2001. T 9. 800 p.
4. Visuotinė lietuvių enciklopedija. Vilnius: mokslo ir enciklopedijų leidybos institutas. 2003. T 4. 831 p.
5. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Москва, 1975, 390 с.