

Separation av plastidfärg- ämnen

Hos fotoautotrofer fångas energin i ljuset upp av speciella pigment-proteinkomplex. De pigment som framförallt absorberar ljuskvanta till fotosyntesen är klorofyllerna. Dessutom finns ytterligare pigment som är röda och gula – antocyaner, karotenoider och xantofyller. Deras funktion kan vara att locka pollinatörer och att hjälpa klorofyll att fånga in ljus, men de kan också skydda växten mot för mycket ljus. De flesta pigment kan man enkelt separera med hjälp av papperskromatografi.

Kromatografi kan användas för att separera olika organiska ämnen. Metoden utnyttjar att ämnen lösta i ett lösningsmedel (rörlig fas) kommer att vandra olika snabbt i en lämplig fast fas. De lösta ämnenas struktur är mer eller mindre lika den fasta eller den rörliga fasen. Ett ämne som mer liknar den rörliga fasen kommer att vandra snabbare än ett ämne som mer liknar den fasta fasen.

Avsikten med laborationen är att separera, isolera och identifiera de viktigaste plastidpigmenten hos några olika fotoautotrofer och jämföra pigmentsammansättningen.

Säkerhet

Aceton och petroleumeter är mycket brandfarliga och det får därför inte finnas någon öppen låga i närheten när man arbetar med dessa ämnen. Undvik inandning och hudkontakt. Ångorna kan göra att man blir dåsig och omtöcknad. De verkar också uttorkande på huden. Blandningen av petroleumeter och aceton kan återvinnas eller återanvändas. Petroleumeter får inte hällas ut i vasken. Små mängder överbliven aceton kan spolas ned i avloppet med stora mängder vatten.

Material

- Organismer enligt nedan
- Kromatografipapper
- Stort provrör
- Stavmixer eller mortel
- Natriumvätekarbonat
- Aceton
- Petroleumeter



Gör så här

1. Arbeta två och två. Varje grupp analyserar pigmentsammansättningen hos något av följande:

- a. Blågröna bakterier
- b. Grönalg
- c. Brunalg
- d. Rödalga
- e. Bandtång (fanerogam, marin)
- f. Gräs (fanerogam, monokotyledon)
- g. Jordgubbsblad (fanerogam, dikotyledon)
- h. Mossa (kryptogam)

2. Klipp till en bit kromatografipapper så att det passar i ett stort provrör. Papperet ska vara så stort som möjligt men ändå kunna hänga fritt i röret utan att gå emot botten och kanter. Gör en upphängningsanordning, exempelvis med hjälp av gem. Papperet kommer att fungera som fast fas.

3. Väg upp 2-3 g gröna blad eller 5-7 g alger och klipp dem i smådelar. Homogenisera bitarna med stavmixer eller mortel tillsammans med en knivsudd natriumvätekarbonat och 10 ml aceton tills de är finmalda. Dekanterar av lösningen i ett centrifugrör och centrifugera på högsta hastighet ca 3 min. Efter centrifugeringen ska supernatanten (vätskan) vara helt klar. För över supernatanten till ett nytt rör.

4. Applicera extraktet med hjälp av en kapillär ungefär 2 cm från nedre kanten på kromatografipapperet. Gör det i flera omgångar och låt papperet torka mellan varven.

5. Håll en skvätt av det lösningsmedel som används som rörlig fas, i det här fallet en blandning av aceton och petroleumeter i proportionerna 15:85, i provröret. Ställ provröret stadigt i ett dragskåp.

6. Sänk ner papperet med pigmentranden i röret. Lösningen ska nå papperets nedre kant, men inte randen med pigment. Nu kommer pigmenten att börja vandra på papperet. Efter 15-30 minuter brukar tydliga fält med färger synas, och då kan papperet lyftas upp och läggas på tork.

7. Rita av pappersremsan och märk ut vilka färger de olika fälten har. Ringa in de olika fälten med blyerts. Titta i UV-ljus på remsan, och notera vilka fält som eventuellt fluorescerar.

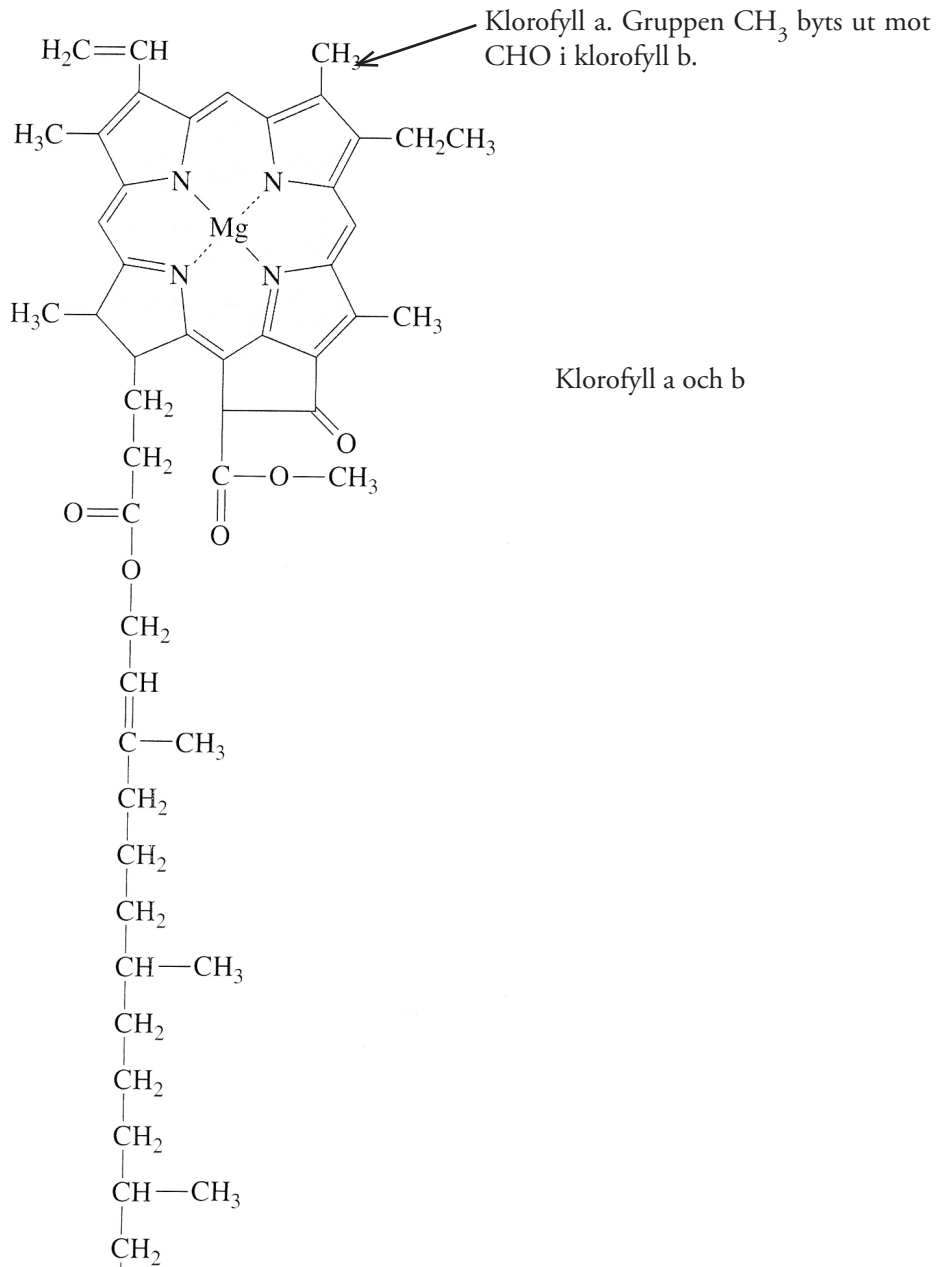
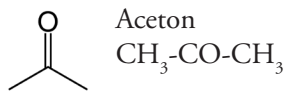
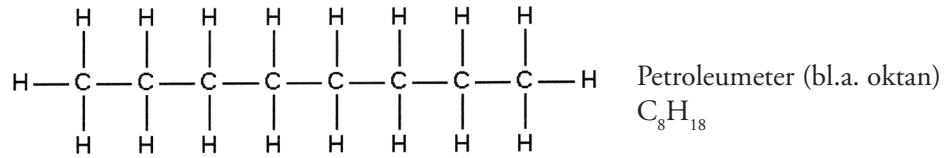
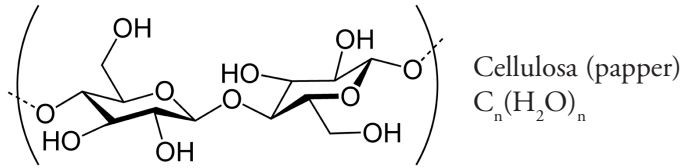
8. Klipp ut pappersbitar med de olika pigmentfälten, håll reda på vad som är vad. Klipp pappersbitarna i smala remsor och lägg dem i separata provrör. Extrahera ut pigmenten ur pappersbitarna igen genom att skaka dem i ca 3 ml aceton.

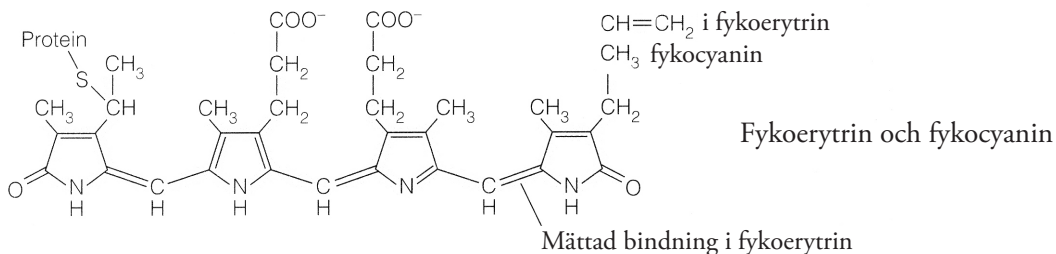
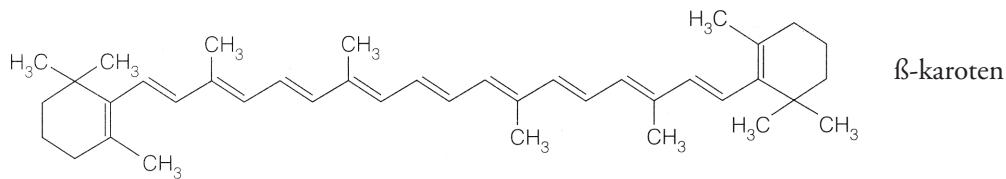
9. Ta med samtliga provrör (även ursprungslösningen med blandade pigment) till spektrofotometern. Scanna absorbansen mellan våglängderna 400-700 nm. Markera vid vilken våglängd absorbansstopparna finns för de olika pigmenten. Skriv ut absorbansspektran för pigmenten och rita av dem på overheadplast.

10. Försök med ledning av bifogade strukturformler och spektra avgöra vilka pigment ni hittat. Jämför resultaten med era kurskamrater. Kan man dra några slutsatser angående släktskap mellan gröna landväxter, olika algrupper och bakterier?

Strukturformler för:

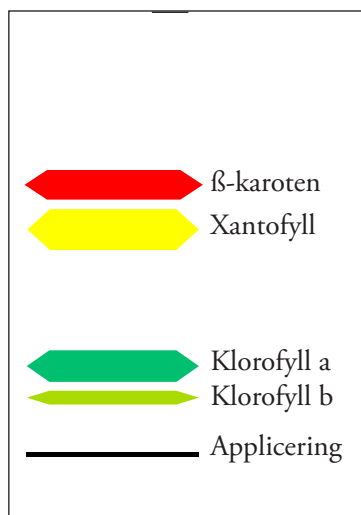
Cellulosa (papper), lösningsmedel och några plastidfärgämnen





Fotosyntetiska pigment i olika växtgrupper						
	Klorofyller		Fykobiliner		Karotenoider	
	Klorofyll a	Klorofyll b	Fykoerytrin	Fykocyanin	Karoten	Xantofyller
Blågröna bakterier	+	-	+	+++	+	+
Grönalger	+	+	-	-	+	+
Brunalger	+	-	-	-	+	+
Rödalger	+	-	+++	+	+	+
Fröväxter Ormbunkar Fräkenväxter Lummväxter Mossor	+	+	-	-	+	+

Så här kan kromatogrammet se ut:

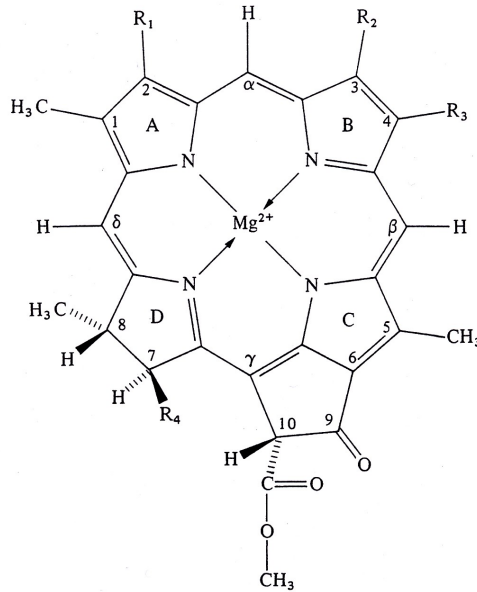


Referenser till absorbtionsspektra

Spektra som visar absorbtionsen för de olika pigmenten finns i ett flertal läroböcker i växtfysiologi och biokemi, t.ex:

Mathews, C.K m.fl. Biochemistry. Benjamin/Cummings. 1997

Absorbtionsspektra går även att hitta på webben.



Textual No.	Chlorophyll Species	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Loss of C-7 & C-8 hydrogens giving a 7,8 double bond
I	a	-CH = CH ₂	-CH ₃	-CH ₂ CH ₃	X (see below)	No
II	b	-CH = CH ₂	-CHO	-CH ₂ CH ₃	X	No
III	c ₁	-CH = CH ₂	-CH ₃	-CH ₂ CH ₃	-CH = CH.COOH	Yes
IV	c ₂	-CH = CH ₂	-CH ₃	-CH = CH ₂	-CH = CH.COOH	Yes
V	d	-CHO	-CH ₃	-CH ₂ CH ₃	X	No

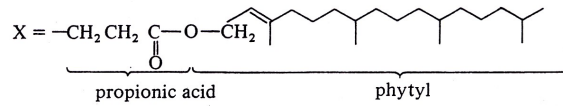
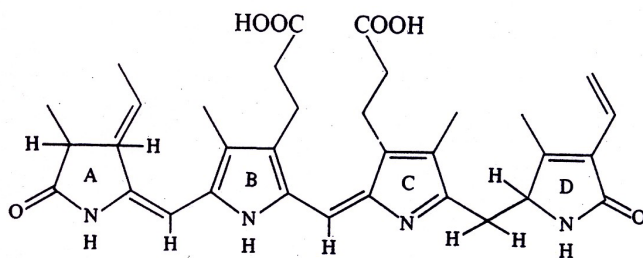


Fig. 5.4. Structure of plant chlorophylls. (The arrangement of double bonds in the macrocyclic ring of chlorophyll is not fixed. Resonance of the conjugated double-bond system makes it possible to write down a number of mesomeric structures, one of which is shown above. The positions of the two co-ordinate bonds (→) and the two covalent bonds between the Mg²⁺ and pyrrole nitrogens, whilst being appropriate to the mesomer shown, are also not fixed for the same reason. The two positive charges on the Mg²⁺ are balanced by two negative charges which are shared amongst the four pyrrole nitrogens; thus chlorophyll is electrically neutral.)

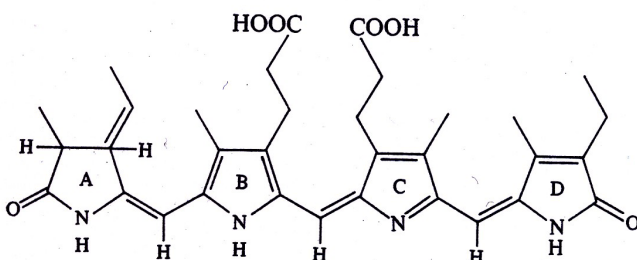
Textual No

XVII



Phycoerythrobilin

XVIII



Phycocyanobilin

XIX

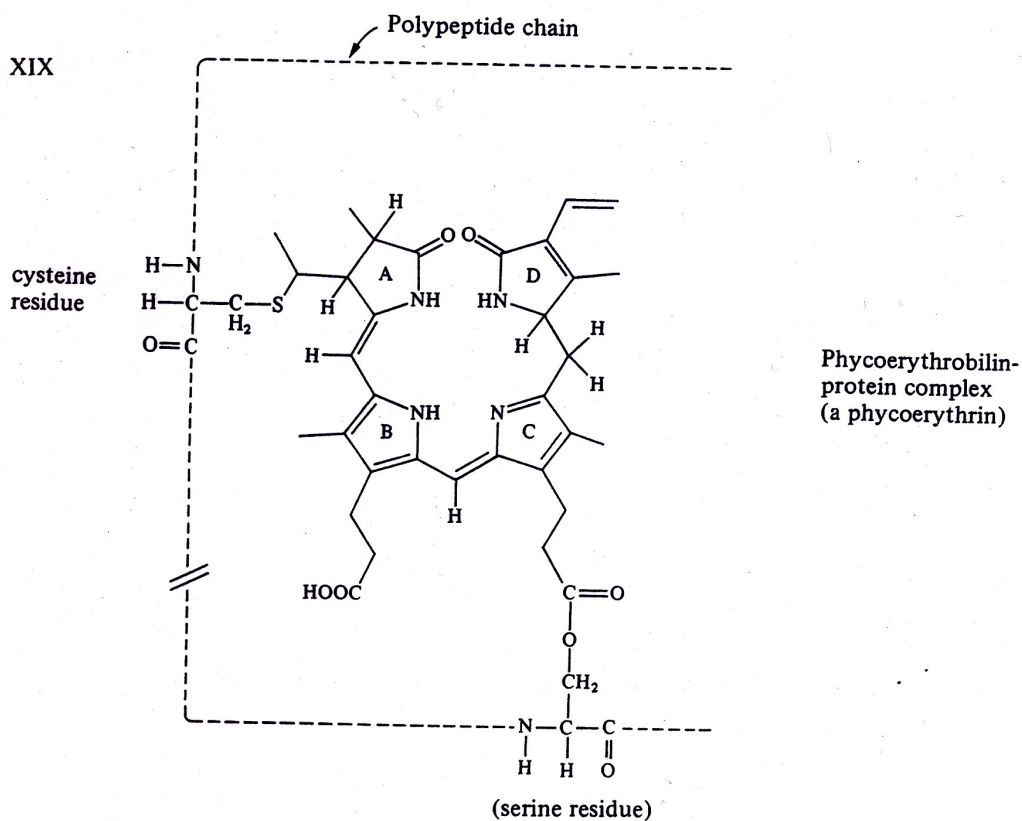


Fig. 5.6. Structures of phycobilins.

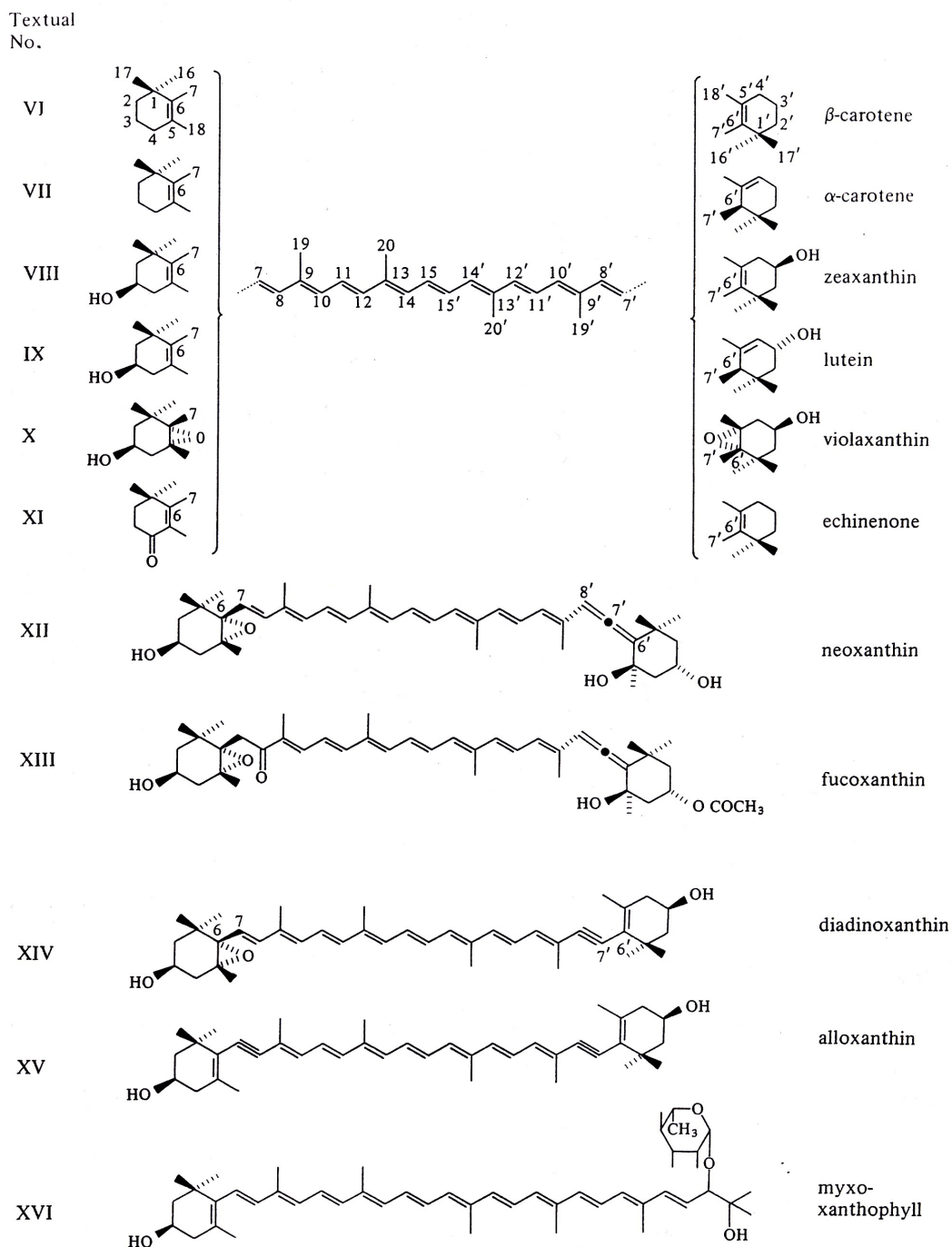


Fig. 5.5. Structures of some of the main plant carotenoids (see Table 5.1). Carotenoids VI–XI have the same central segment; Cs 7 and 7' are bonded to Cs 6 and 6' of the left-hand and right-hand rings respectively, at the same level in the figure.

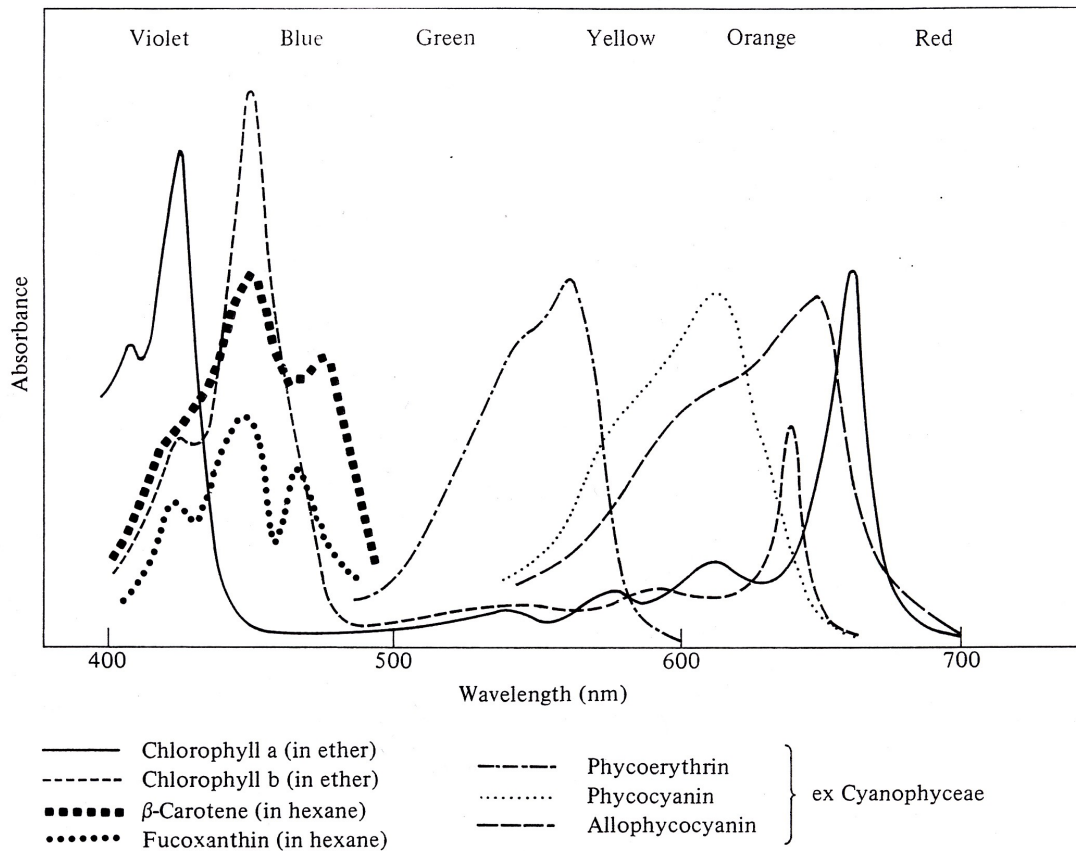


Fig. 5.7. Absorption spectra of selected members of the three groups of photosynthetic pigments, the chlorophylls, the carotenoids and the phycobilins.

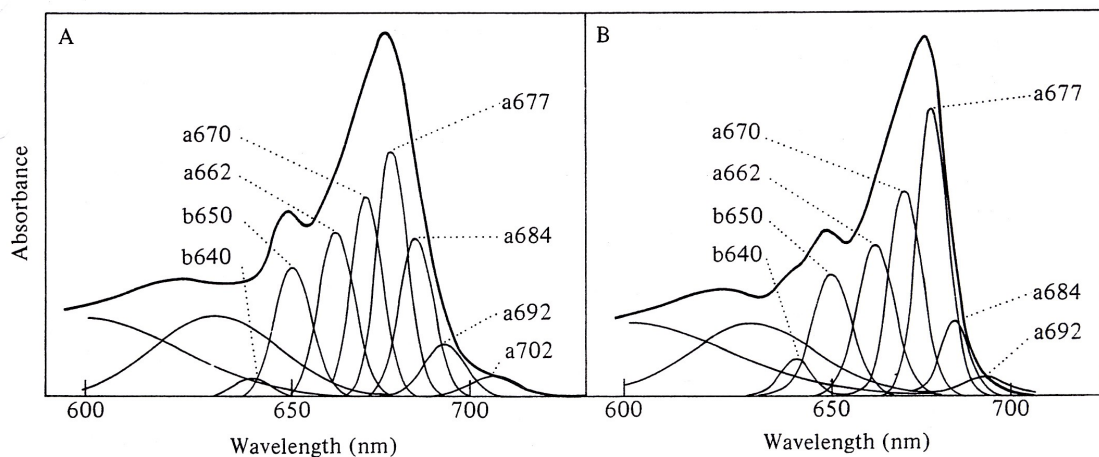


Fig. 5.8. Curve analyses of the red peak in the absorption spectra, taken at -196°C , of fragments of stroma lamellae (spectrum A) which constitute a chloroplast fraction enriched in PS I and of fragments of grana lamellae (spectrum B) which constitute a chloroplast fraction enriched in PS II (adapted from French, Brown and Lawrence, 1972).

Table 5.1. Distribution of the major photosynthetic pigments in the plant kingdom

Organism	Chlorophylls					Phycobiliproteins		Carotenoids		
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i> ₁	<i>c</i> ₂	<i>d</i>	Phycoerythrin	Phycocyanin	Carotenes	Xanthophylls	
Higher plants, pteridophytes and bryophytes	+	+	-	-	-	-	-	β -carotene α -carotene	lutein violaxanthin neoxanthin	
Algae	Chlorophyceae (green)	+	+	-	-	-	-	β -carotene	lutein violaxanthin neoxanthin	
	Euglenophyceae	+	+	-	-	-	-	β -carotene	neoxanthin diadinoxanthin	
	Phaeophyceae (brown)	+	-	+	+	-	-	β -carotene	fucoxanthin violaxanthin	
	Chrysophyceae (yellow-brown)	+	-	+	+	-	-	β -carotene	fucoxanthin	
	Xanthophyceae (yellow-green)	+	-	-	-	-	-	β -carotene	neoxanthin diadinoxanthin	
	Bacillariophyceae (diatoms)	+	-	+	+	-	-	β -carotene	neoxanthin diadinoxanthin fucoxanthin	
	Cryptophyceae	+	-	-	+	-	+	+	α -carotene β -carotene	alloxanthin
	Rhodophyceae (red)	+	-	-	-	+	+++	+	α -carotene β -carotene	lutein zeaxanthin
	Cyanophyceae ^(a) (blue-green)	+	-	-	-	-	+	+++ ^(c)	β -carotene	echinenone myxoxanthophyll zeaxanthin
Prochlorophyta ^(b) (genus: Prochloron)	+	+	-	-	-	-	-	β -carotene	zeaxanthin	

+ and - = presence and absence respectively.

^(a) The taxonomic position of the blue-green algae is at present in a state of flux: some authors believe that they should be classed as bacteria because they are prokaryotic and therefore refer to them as cyanobacteria; other authors believe that they should remain within the algal classification because their mechanism of photosynthesis is more plant-like than bacteria-like (they produce oxygen and have two photosystems). Being prokaryotes they do not have chloroplasts.

^(b) Prochloron constitutes the only known genus within the new algal division Prochlorophyta. It is symbiotically associated with colonies of didemnid ascidians and lives in warm marine habitats. It is prokaryotic but its photosynthetic mechanism is plant-like in that it evolves oxygen and has two photosystems which are built into the membranes of paired thylakoids.

^(c) Allophycocyanin is also present in small quantities.