**Oznaczanie zawartości chlorofilu metodą wg Arnon (1949) z modyfikacjami**

Opracowała dr Urszula Karsuska

## Wstęp

Zielona barwa organizmów fotosyntetyzujących jest związana z obecnością cząsteczek chlorofilu w chloroplastach. Rośliny syntetyzują kilka rodzajów chlorofilu, przy czym do najbardziej rozpowszechnionych w przyrodzie zalicza się *chlorofil a* i *chlorofil b*. Chlorofile są barwnikami asymilacyjnymi o charakterze hydrofobowym. Związki te składają się z pochodnej porfiryny (feoporfiryny), której cztery pierścienie pirolowe połączone są z atomem Mg. W cząsteczce porfiryny występują naprzemiennie wiązania pojedyncze i podwójne, które tworzą układ rezonansowy. Wiązania sprzężone powodują, że chlorofile są efektywnymi fotoreceptorami, których charakterystyczną cechą jest bardzo silna absorpcja w zakresie światła widzialnego wyrażona poprzez wysokie molowe współczynniki absorpcji. W związku z tym zawartość chlorofilu w tkankach roślinnych można oznaczać **metodą spektrofotometryczną**. Zielony kolor cząsteczek chlorofilu jest związany z wysoką zdolnością do pochłaniania czerwonej i niebieskiej części spektrum światła, a niską zielonej części spektrum światła.

**Charakter hydrofobowy** cząsteczek chlorofilu jest związany z obecnością fitolu ($C_{20}H_{39}OH$), który łączy się estrowo z feoporfiryną. Zatem chlorofile dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych takich jak aceton, alkohol czy benzen. Wysoka zawartość chlorofilu w roślinie warunkuje wydajniejszy proces fotosyntezy.

Cząsteczki chlorofilu są dosyć nietrwałe, a ich rozpad wynikający z ekstrakcji przyspiesza działanie światła i tlenu. Należy zatem pamiętać aby podczas ekstrakcji minimalnie narażać badane próby na działanie światła. Ponadto czynnikiem wpływającym negatywnie na uzyskane wyniki pomiaru zawartości chlorofilu jest zmiana pH (zakwaszanie) ekstraktu, która może nastąpić w wyniku homogenizacji tkanki. W tym celu trzeba stosować związki neutralizujące działanie kwasów.

## Cel

Celem ćwiczenia jest porównanie zawartości chlorofilu *a* i chlorofilu *b* w różnych tkankach roślinnych oraz porównanie stosunku chlorofilu *a* do chlorofilu *b* w badanych próbach.

***Sprzęt:*** moździerze, probówki wirnikowe, pipety laboratoryjne z wymiennymi końcówkami, wirówka, kuwety spektrofotometryczne, spektrofotometr.

***Potrzebne odczynniki***: 96 % alkohol etylowy, węglan wapnia ($CaCO_3$).

***Materiał roślinny*** (0,2 g świeżej masy): liście lub inne organy różnych gatunków roślin np. cienioznośnych i światłolubnych lub zielonych i pstrolistnych.

***Wykonanie:***

- Zamrożone lub świeże próbki liści lub ogonków liściowych dokładnie rozetrzeć w moździerzu, do którego uprzednio wlano 3 $cm^3$ alkoholu etylowego, dodano szczyptę piasku (ułatwia rozcieranie tkanki) i szczyptę $CaCO_3$ (zobojętnia kwasy zapobiega reakcji chlorofilu z kwasami organicznymi, uwolnionymi z wakuoli komórek przy rozcieraniu tkanek). Zachować opis próbki.

- Homogenat przelać ilościowo do odpowiednio oznakowanych probówek wirnikowych. Moździerz i tłuczek przepłukać kolejnymi 2 $cm^3$ alkoholu i zlać do tych samych probówek wirnikowych. Do momentu wirowania probówki z roztworem alkoholowym chlorofilu powinny być zakorkowane i znajdować się w ciemnym miejscu.

- Próby wirować w temperaturze pokojowej 9 000 rpm 10 min. Po tym czasie nadsącz przenieść ilościowo do nowych, oznakowanych probówek wirnikowych.

- Oznaczyć zawartość chlorofilu za pomocą spektrofotometru, po rozcieńczeniu nadsączu. Do kuwet spektrofotometrycznych wlać 1,5 $cm^3$ alkoholu etylowego i 0,5 $cm^3$ badanej próby, dokładnie wymieszać. Do kuwety z próbą zerową wlać 2 $cm^3$ etanolu. Wartość absorbancji odczytywać przy odpowiednich długościach fal: 645 nm, 649 nm, 654 nm i 665 nm. Aparat zerować przy każdej zmianie długości fali na rozpuszczalniku. Zapisać wyniki odczytów i wykonać obliczenia.

***Obliczenia:***

Obliczyć zawartość chlorofilu *a* i *b* korzystając ze wzorów:

Chlorofil *a* = [(13,7×A665) - (5,76×A649) ] × [V:(1000 × W)] × 4 [mg Cl*a* $g^{-1}$ świeżej masy]

Chlorofil *b* = [(25,8×A645) - (7,6×A665) ] × [V:(1000 × W)] × 4 [mg Cl*b* $g^{-1}$ świeżej masy]

Chlorofil (*a* + *b*) =(6,1×A665 + 20,04xA649) × [V:(1000 × W)] × 4 [mg Cl*a*+*b* $g^{-1}$ świeżej masy]

lub

Chl (*a* + *b*) = (25,1 x A654) × [V: (1000 × W)] × 4 [mgCl *a*+*b* $g^{-1}$ świeżej masy]

gdzie:

A 645 lub 649 lub 654 lub 665 - wartość absorbancji mierzona przy danej długości fali

V – całkowita objętość ekstraktu ($cm^3$).

W – masa próbki (g).

Obliczyć stosunek chlorofili *a*/*b*.

Wzory pochodzą z klasycznej techniki Arnon'a, która została opisana w publikacji:

Arnon DI, 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24:1-15.

- Uzyskane wyniki zapisać w formie tabeli, przeanalizować i zinterpretować.
- Uporządkować stanowisko pracy.