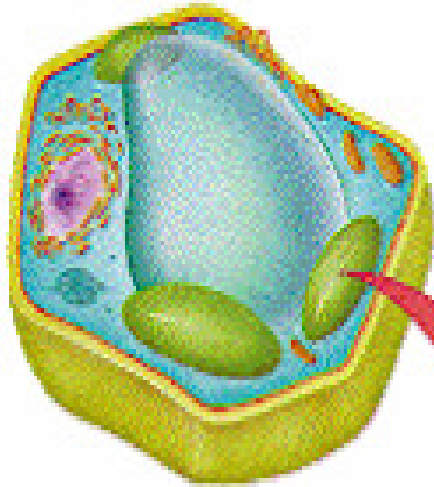
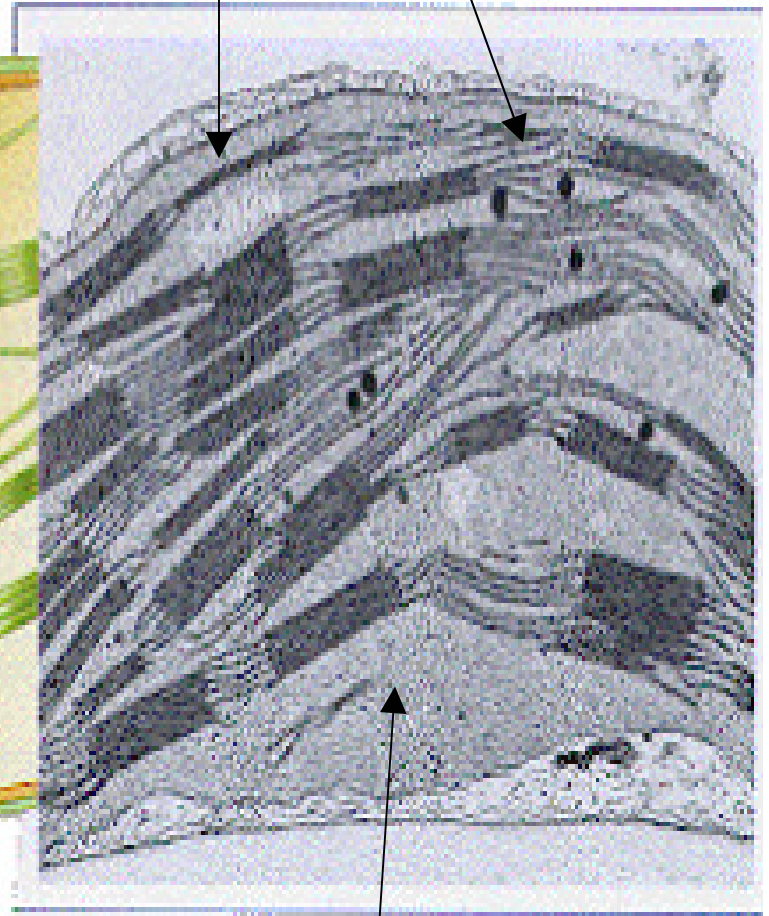
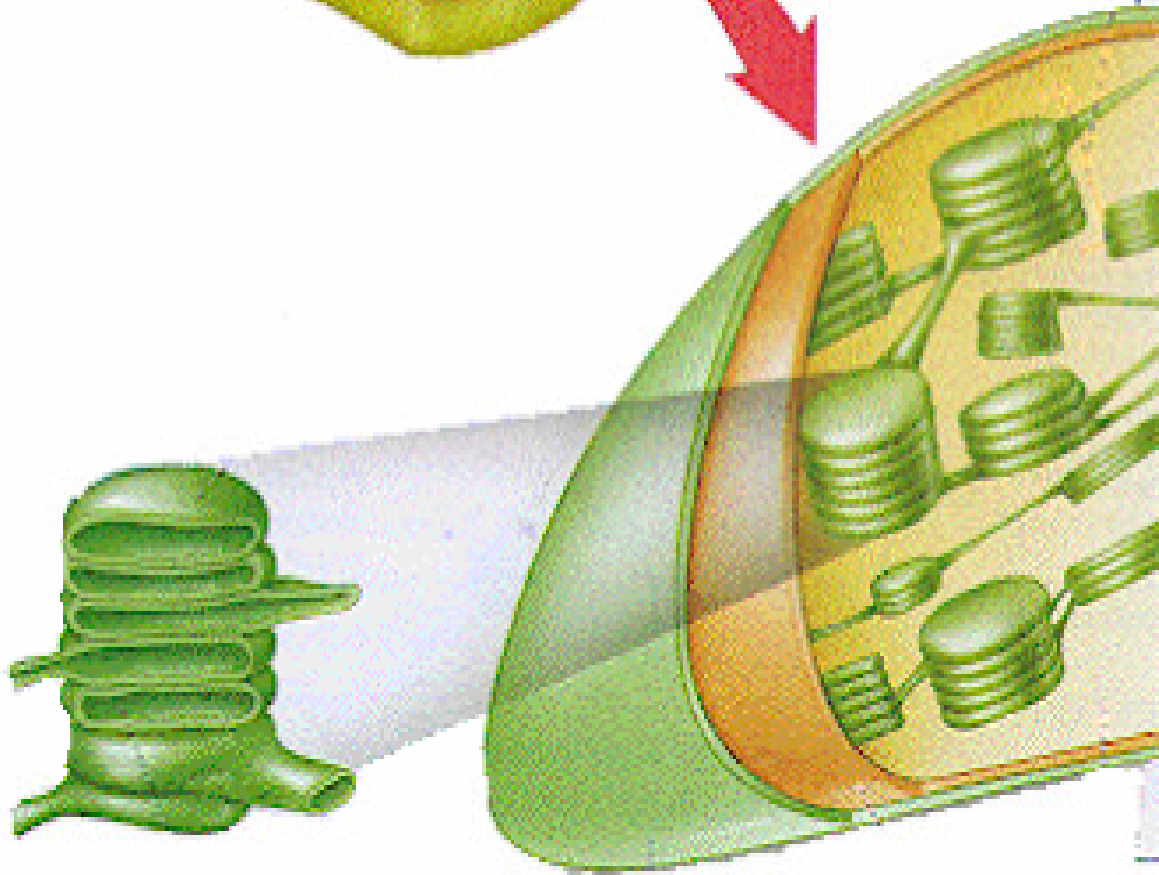


# Fotoszintézis



fotoszintetikus pigmentek  
Fényszakasz - gránum/sztrómalamella



Sötétszakasz - sztróma

# I. Fotoszintetikus pigmentek vizsgálata

A növényeket érő hatások a pigmentösszetétel változását okozhatják

**I. Mintavétel** (inhomogén minta)

**II. Extrakció**

poláris oldószer – a pigment-protein kölcsönhatás megszüntetése

NH<sub>4</sub>OH v. puffer a klorofilok feofitinizációjának elkerülése érdekében

**III. Elválasztás**

-különböző polaritású oldószerek közötti megoszlás

-adszorpciós kromatográfia

vékonyréteg kr.: minőségi elválasztás

oszlop kr.: mennyiségi elválasztás

víz- és szennyeződésmentes oszlop

!gyúlékony és egészségre ártalmas oldószerek (elszívó fülke)!

# I. Fotoszintetikus pigmentek vizsgálata

## Fotoszintetikus pigmentek elválasztása oszlopkromatográfiával (15.)

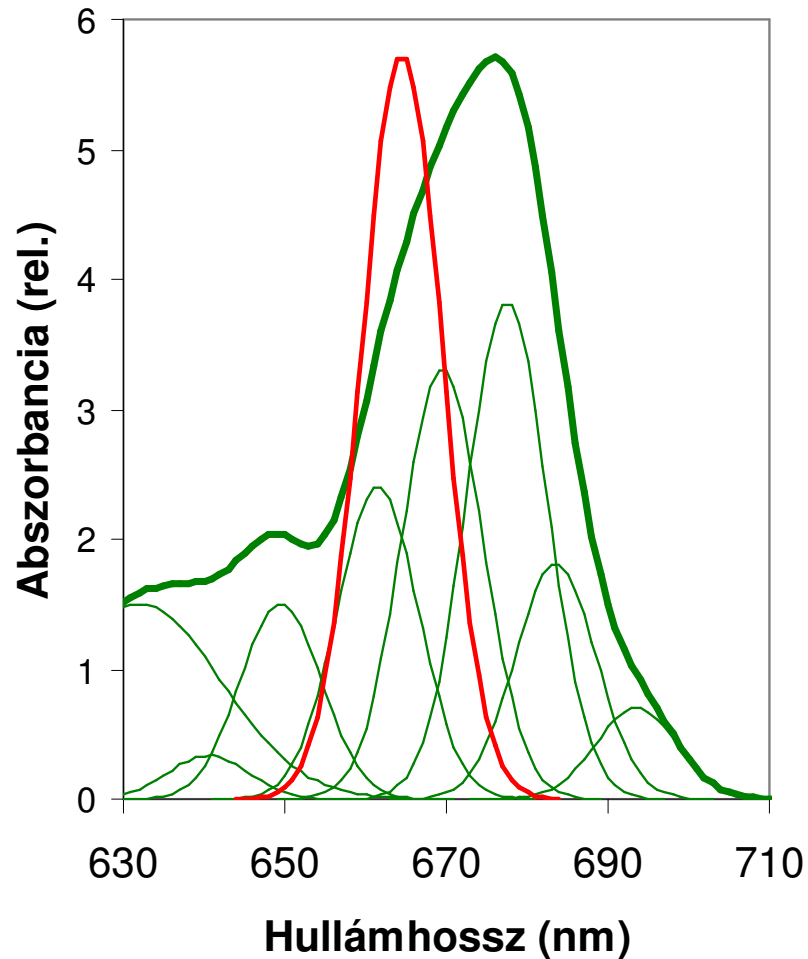
- 1 Oszlop előkészítés
  - cellulózpor felszuszpendálás petroléterben
  - a vattával eltömött oszlop feltöltése a cellulózzal
  - mosás acetonnal, majd petroléterrel (4-5 cm-ig)
- 2 Pigment oldat felvitele
- 3 Elválasztás
  - indítás petroléterrel az első sárga sáv elválásáig
  - folytatás petroléter:aceton 90:10 keverékkel
- 4 Leállítás a sávok elválása után
  - a cellulóz kitolása, szárítása
  - kioldás papírszűrőn acetonnal
- 5 Mérés spektrofotométeren a teljes látható tartományban
- 6 Az elválasztás értékelése a kapott abszorpciós spektrumok standard spektrumokkal való összehasonlítása alapján

**Vékonyréteg kromatográfia** esetén (16.) futtatás petroléter:aceton 80:20 eleggyel, futtatókádban

# I. Fotoszintetikus pigmentek vizsgálata

## IV. Detektálás – azonosítás

- kromatográfiás tulajdonságok alapján:  $R_f$
- spektrális tulajdonságok alapján



- abszorpciós maximumok helyzete (nm)
- egymáshoz viszonyított intenzitása
- félértékszélessége (nm)

## Kloroplasztisz szuszpenzió abszorpciós spektrumának felvétele (20.)

### In vivo pigmentspektrum

pigment-protein kölcsönhatás  
nagy számú spektrális forma

### In vitro pigmentspektrum

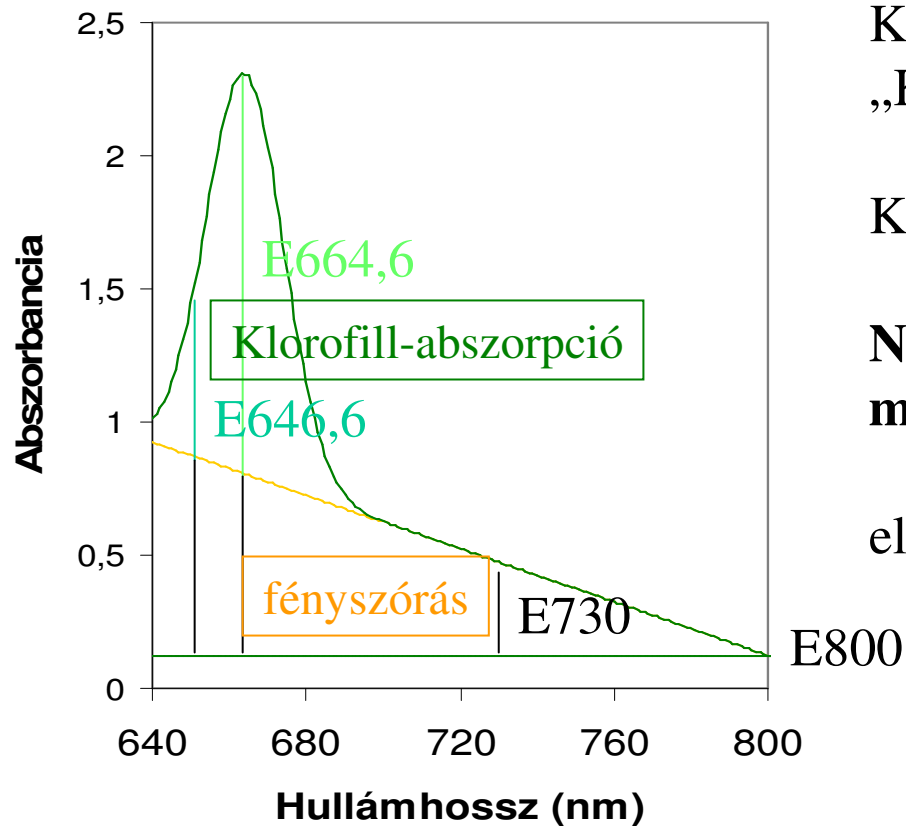
monomerek, dimerek  
csökkent félértékszélesség  
blue-shift

# I. Fotoszintetikus pigmentek vizsgálata

## V. Mennyiségi meghatározás

Lambert-Beer törvény

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$



Kl-a Kl-b pigmentkeverék esetén  
„Két hullámhossz módszer”:

$$Kl-a+b(\text{mg}/\text{dm}^3) = 17,76 \cdot E_{646,6} + 7,34 \cdot E_{664,6}$$

### Növények pigmenttartalmának meghatározása (14.)

- különböző levelek (0,1-0,2 g) teljes eldörzsölése 80%-os acetonban
- centrifugálás
- abszorpciós spektrum felvétele a vörös tartományban
- pigmenttartalom számítása

# I. Fotoszintetikus pigmentek vizsgálata

## A klorofilok abszorpciós spektrumai különböző oldószerekben (19.)

- 1 Kiindulási anyag: 0,5 ml pigment oldat
- 2 Szárazra párolás
- 3 Felvétel különböző oldószerekben
  - dietil-éter klorofill-a monomer
  - aceton Mg-hoz kapcsolódik, a delokalizált e-felhő deformációját okozva
  - etanol monomer
  - metanol monomer, H-híd kötés Mg-mal
  - etanol:víz 60:40 vízmolekulával (H-híd) kapcsolt dimer
  - szén-tetraklorid dimer
  - petroléter oligomer
  - dioxán két klorofill Mg-ja közé épül be, párhuzamos porfirin gyűrűk
- 4 Értékelés
  - az abszorpciós maximumhelyek és a sávok félértékszélessége alapján

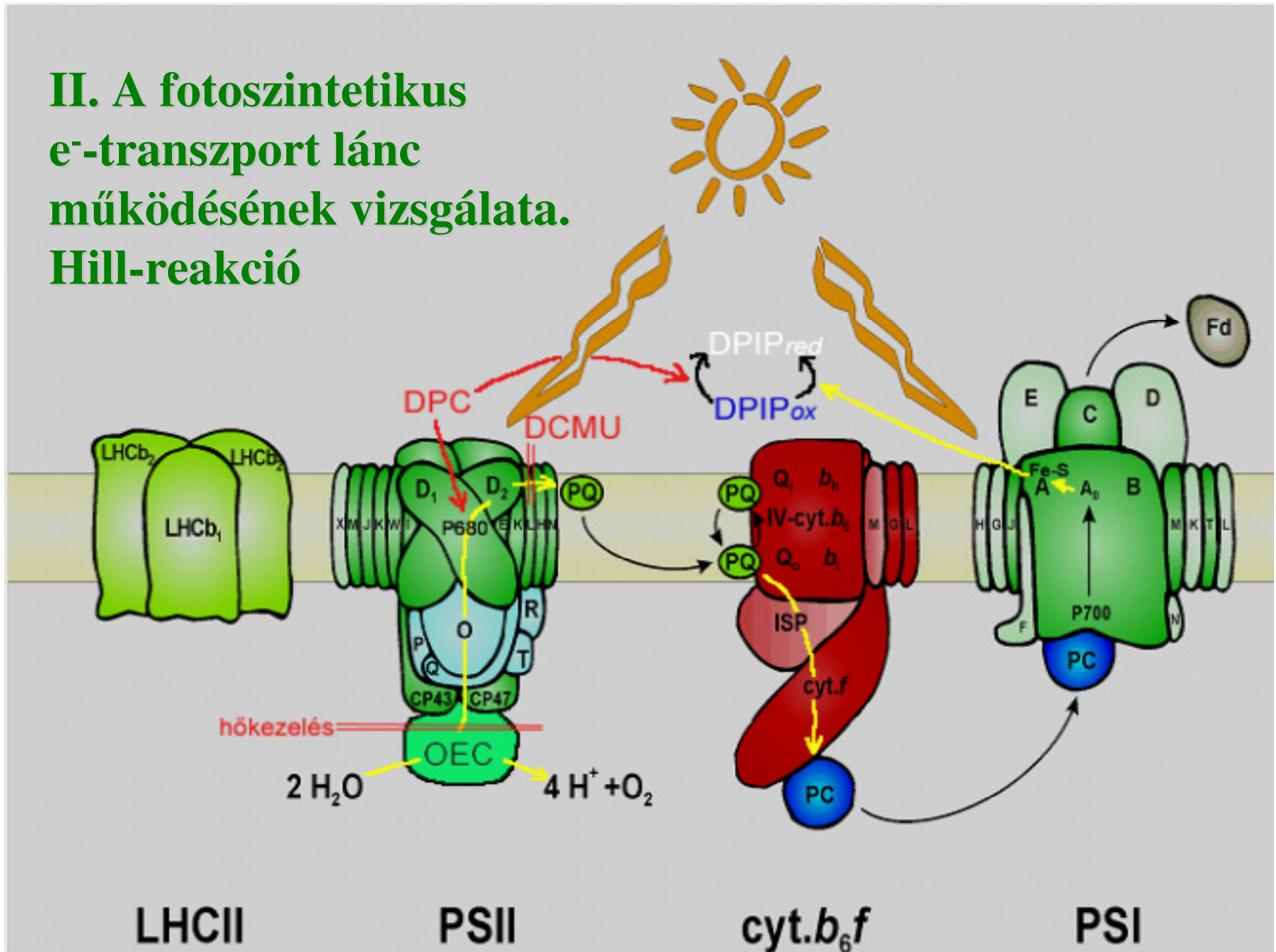
# I. Fotoszintetikus pigmentek vizsgálata

## A klorofilláz enzim aktivitásának vizsgálata

- 1 A levelek alapos eldörzsölése foszfát-puffer:aceton 1:1 elegyében
- 2 Inkubáció szobahőmérsékleten zárt kémcsövekben
- 3 A reakció leállítása az aceton koncentráció 80%-ra emelésével
- 4 Szűrés, centrifugálás
- 5 A klorofillid elválasztása a klorofilltól petroléter/aceton megoszlás alapján
- 6 Az acetonos fázis pigmenttartalmának meghatározása és összevetése a kiindulási pigmenttartalom értékekkel (levél 80% acetonban eldörzsölve)

Különböző (friss és öregített) növények klorofilláz aktivitásának összehasonlítása ill. a klorofilláz enzim aktivitásának függése az aceton koncentrációjától

## II. A fotoszintetikus $e^-$ -transzport lánc működésének vizsgálata. Hill-reakció





## II. A fotoszintetikus e-transzport lánc működésének vizsgálata - Hill-reakció

### 1 Kloroplasztisz izolálás (21.)

-izoláló puffer és eszközök hűtése a plasztiszok károsodásának elkerülése érdekében

-izoláló puffer megfelelő mennyisége a proteázok hígítására

### 2 A plasztiszszuszpenzió klorofill-tartalmának meghatározása

### 3 A fotoszintetikus e-transzport lánc működésének vizsgálata (23.)

-a reakcióelegyek összemérése

-a plasztiszszuszpenzió hozzáadása

-kiindulási  $E_{600}$  érték regisztrálása

-a minta megvilágítása (30 sec) után ismételt leolvasás

-a reakciósebesség számítása a megadott  $\epsilon$  és a számolt KI-koncentráció alapján

### 4 Értékelés

A Hill-reakció fényintenzitás függése

Magas hőmérséklet, DPC hatása

DCMU és egyéb herbicidek hatása

Linkomicin kezelés hatása

