

DENEY NO: 5.16

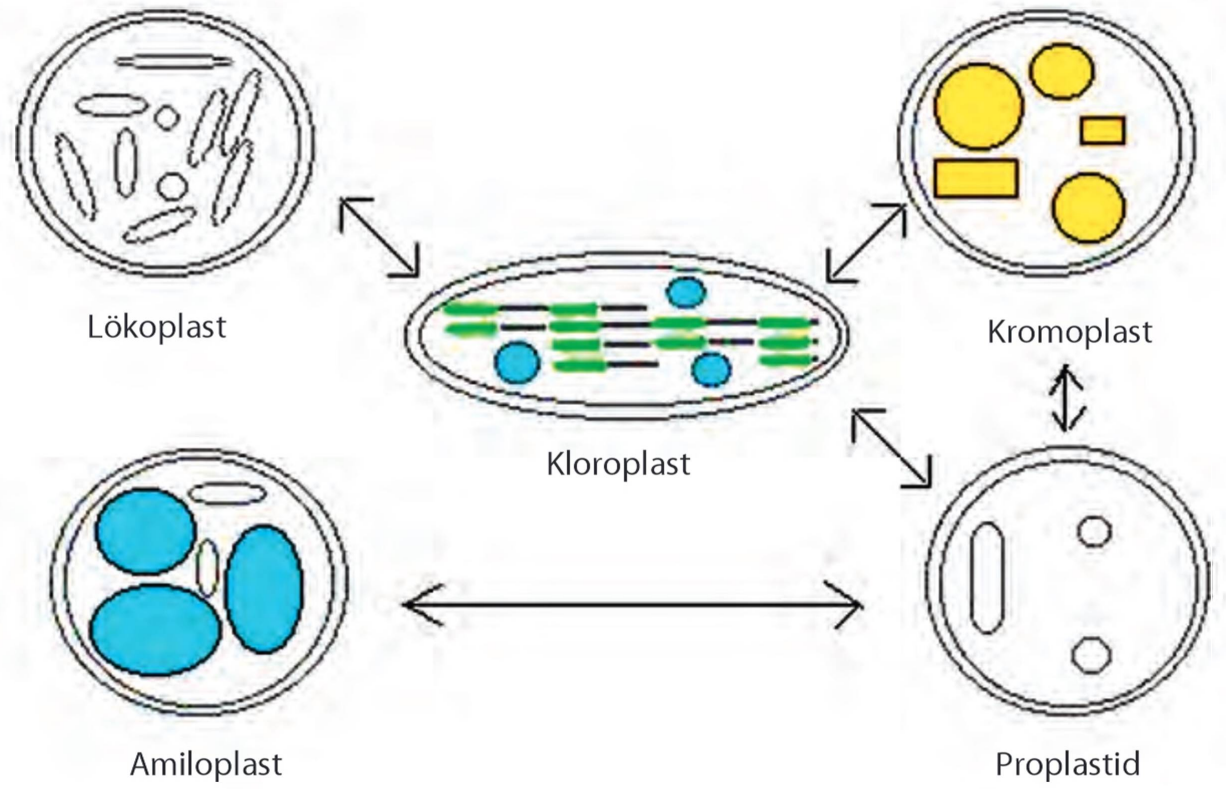
DENEYİN ADI: BİTKİLERDEN KLOROFİL ELDE EDİLMESİ

DENEYİN AMACI: Bitkilerde bulunan fotosentetik pigmentlerin incelenmesi.

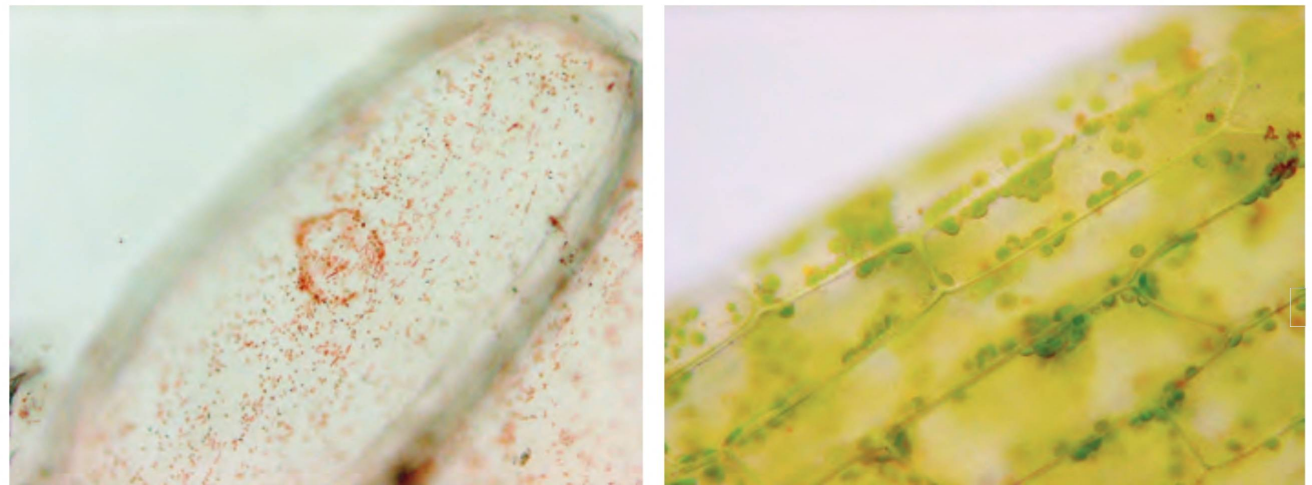
GENEL BİLGİ:

Bir yaprakta yaklaşık 100 adet plastid bulunur. Bitkilerde bulunan plastidler 3 grupta incelenir:

- Kloroplastlar
- Kromoplastlar
- Lökoplastlar



Şekil 5.16.1: Bitkilerde bulunan plastidler (<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e04/04a.htm>)



Şekil.7.16.2: Çeşitli plastidlere örnekler. Domates (A), *Elodea* (B). 250 X.

Plastidler iki kat membranla çevrilidir; bazı proteinlerin sentezi için gerekli DNA'yı taşır. Görevleri: Fotosentez, şeker sentezi, minerallerin asimilasyonu, amino asit, lipid ve hormon sentezidir. Plastidlerin farklılaşmasında hücre tipi, çevre ve genetik faktörler rol oynar. Kloroplast yeşil renklidir ve yaprak gibi fotosentetik organlarda bulunur; şeker sentezi yapar. Klorofil, kloroplastta;

karotenler kromoplastta bulunur. **Lökoplastta ise pigment bulunmaz.** Lökoplastlar proplastidlerden oluşur ve renksizdir. Bitkilerin ışık almayan kısımlarında (kök, yumru vb.) bulunur; nişasta depolar. Bir kısmı ışığa maruz kalınca kromoplast ve kloroplastlara farklılaşır; diğerleri lökoplast olarak kalır. Nişasta taneciklerinin şekil ve büyüklükleri bitkinin türüne göre farklılık gösterir. Amiloplastlar renksizdir, nişasta sentezleyip iri granüller halinde depolar. Patates yumrusu ve otların tohumu gibi nişasta depo organlarında bulunur. Kromoplastlar kırmızı, turuncu ve sarı gibi parlak renklere sahiptir; β -karoten gibi karotenleri konsantre eder. Domates ve kirazda olduğu gibi meyvede; sonbahar yapraklarında, havuç gibi özelleşmiş köklerde ve çiçek petallerinde bulunur. Tozlaşma için hayvanların dikkatini çekmeye ve tohumun dağılmasını sağlar.



Şekil 5.16.3: Bir kayısı ağacında mevsimsel pigment değişiklikleri (Foto: Ş. Erkoç).

Kloroplastlara yeşil rengi veren klorofil molekülü fotosentezde çok önemli bir role sahiptir. Bu molekül ışık enerjisini absorplayıp (soğurup), elektronları diğer moleküllere aktararak kimyasal bağ enerjisine dönüşümü sağlar. Klorofilin 20 kadar çeşidi olup en önemlileri **klorofil a** ve **klorofil b**'dir (fotosentezin başlıca **fotoreseptör molekülleri**). Ayrıca bitkilerde **karotenler** (fotosentezde görevli sarı pigmentler), **ksantofil** (karotenlerin oksijenli türevleri olan pigmentler) ve **likopen** pigmentleri de bulunur. **Feofitin a** ve **feofitin b** ise sırasıyla klorofil a ve b'ye benzer; özelliği yapıya Mg yerine iki H⁺ girmiş olmasıdır. Klorofil ve **aksesuar (yardımcı)** pigmentler, yeşil bitkilerin fotosentetik hücrelerinin kloroplastlarında fotosentetik birimler olarak adlandırılır.

1. Klorofil pigmentleri: Fotosentezde rol alan pigmentler bitkilerin yeşil pigmentleri olan klorofillerdir; Yeşil pigmentler bitkilerin yapraklarındaki mezofil hücreleri içerisinde en fazla bulunur. Klorofiller belli dalgaboyundaki ışık enerjisini absorbe ederek enerjiyi ya fotosentezde kullanılan dalgaboyu başka olan bir enerjiye dönüştürürler ya da fotosentez için gerekli bileşiklere doğrudan aktarırlar.



DİKKAT

- Orijinal deneyde kullanılan benzen tehlikeli ve kanser yapıcı (kanserojen) olmasından dolayı günümüzde onun yerine ekstraksiyon işlemi aseton, heksan, etanol ve diklorometan gibi çözücülerle yapılmaktadır.
- Deney süresince, çözücülerle çalışıldığı için, eldiven ve maske giyiniz.
- Taze yaprak kullanmaya ve özellikle koyu yeşil yaprakları almaya dikkat ediniz.



UYARI

- Deneyin yapılışında değişik alternatifler bulunmaktadır. Temelde deney basamakları aynı olmakla beraber elde edilen klorofil çözeltisinin spektrumunun alınması gibi daha ileri deneylerde kullanılması istenirse "Alternatif materyal" başlığı altındaki malzemeye de ihtiyaç vardır.

2. Karotenoyid pigmentleri: Karotenoyitler bitkilerde bulunan kırmızı, sarı, kahverengi ya da portakal renginde lipid bileşiklerdir. Karotenoyitler yüksek bitkilerin hemen tamamında, pek çok mikroorganizmalarda, fotosentetik bakterilerde, alglerde ve mantarlarda bulunur.

MATERYALLER: Ispanak yaprağı (taze, sapları ayrılmış), ısırgan otu (*Urtica*, kurutulmuş da olabilir), cam güzeli veya pancar yaprağı da olabilir

Tek kullanımlık tıbbî lateks eldiven

Kum (isteğe bağlı)

Havan, soğutulmuş veya mutfak robotu-haznesi soğutulmuş

Kurutma kâğıdı

Tebeşir

Heksan (alternatif olarak aseton, etanol, petrol eteri de kullanılabilir, detaylar deneyin yapılışında verilmiştir)

Etanol

Filtre kâğıdı

Deney tüpü

Petri kabı

Pastör pipeti

ALTERNATİF MATERYALLER (zorunlu değil: Sodyum sülfat (susuz), aseton, ekstraksiyon için etil alkol, petrol eteri, aseton: etil alkol)

DENEYİN YAPILIŞI:

- İlk kademede bitki numunesinin parçalanarak pigmentlerin açığa çıkması sağlanır. Bunun için birkaç yol vardır: Havan içine kum (hücrelerin parçalanmasını kolaylaştırmak için) ve etil alkol veya aseton konulup ısırgan otunun yaprakları 1 dakika kadar ezilir (Şekil 5.16.4); mutfak robotunda çekilir veya önce jilet, makas gibi aletlerle küçük parçalara kesilip sonra havanda ezilir. Bunun sonucunda koyu yeşil renkli bir çözelti elde edilir. Bu çözeltide suda çözünen (polar) ve apolar (polar olmayan) bütün hücre komponentleri vardır çünkü asetonda hemen her şey çözülür. Klorofiller ve karoten, apolar bileşikler olduklarından "benzer benzerde çözünür" prensibine göre su yerine heksanda iyi çözünürler. Alternatif çözücüler diklorometan ve petrol eteridir. İlk kademede çok az miktarda aseton konulması daha verimli ekstraksiyon içindir. Buna **ham klorofil ekstresi** denir (Şekil 5.16.5).



Şekil 5.16.4: Yaprakların ezilmesi.



Şekil 5.16.5: Ham klorofil ekstresi.

- A. Taze ıspanak yaprağı kullanılıyorsa 0.5 g (2-3 yaprak kadar, buna yaklaşık 1 ml aseton yeterlidir), yaprağı havanda asetonun rengi yeşil olana kadar eziniz. Havanı ve havanı 1 ml daha aseton ile yıkayınız. Santrifüj tüpüne koyduğunuz ekstreye 2 ml heksan ve 2 ml distile su ekleyip kuvvetlice çalkalayınız, ara sıra kendinizden uzakta tutarak havalandırınız. Alt tabaka bulanık açık yeşil, pigmentlerin olduğu heksan tabakası ise üstteki parlak ve berrak yeşil tabakadır. Birkaç dakika tabakaların ayrılması için bekleyiniz. Pastör pipeti ile su tabakasını çekip “atık beherine” koyunuz (**DİKKAT:** Pastör pipetinin puarını sıktıktan sonra sulu fazı daldırınız). Tekrar 2 ml distile su ekleyerek heksan tabakasını “yıkayınız”. Yeni su tabakası renksiz olmalıdır, karıştırıp bekleyiniz. Tabakalar ayrılınca alt tabakayı aynı şekilde alıp atık beherine koyunuz. Heksan tabakasında bir miktar da olsa, az su kalacağından, bu tabakayı birkaç ince spatül dolusu susuz sodyum sülfat ekleyerek kurutunuz. Ekstrenizi pastör pipetine pamuk tıkaç yaparak süzünüz. Santrifüj tüpünü 1 ml daha heksan ile yıkayarak aktarma işlemini tamamlayınız. Mutfak robotu kullanılacak ise önce robotta yapraklar çekilir sonra aseton eklenir.
- B. Robotta çekildikten sonra püreden 0.5 g tartılıp deney tüpüne ince spatül yardımı ile aktarılır, 2 ml aseton eklenip, ağzı kapatılır ve kuvvetlice çalkalayarak (arada kapak açılıp havalandırılır) 5 dak. ekstrakte edilir. Sıvı pastör pipeti ile temiz, kuru bir tüpe aktarılır; pigmentler asetonda bulunduğu için, apolar özelliklerinden faydalanılarak bu defa üzerine 2 ml petrol eteri konulup 1 dak. daha kuvvetlice aynı şekilde çalkalanarak pigmentlerin bu tabakaya geçmesi sağlanır. Karışıma 1 ml distile su eklenir, tekrar çalkalanıp tabakaların ayrılması için santrifüj edilir. Suyu kurutmak için susuz sodyum sülfat eklenir.
- C. Ekstraksiyon kademesi sadece etil alkol kullanılarak da yapılabilir ve spektrum çekilmeye hazır hale getirilir.

- D. Püreye aseton eklendikten sonra 2 ml kadar hacim, stok çözelti olarak 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır; üzerine 2 ml heksan eklenip ağzı kapatılır ve kuvvetlice çalkalanır. Bir tarafa içine 10 ml heksan konulmuş bir mezür koyunuz. Heksan ekstraksiyonu yaptığınız santrifüj tüpüne 2 ml distile su ekleyip kalan suda çözünen maddeleri su tabakasına ayırmak için kuvvetlice çalkalayınız ve **ara sıra havalandırınız**. Genellikle karışımın ortasında bulanık tabaka halinde oluşan emülsiyonu bozmak için santrifüjleyiniz; santrifüjden sonra altta kalan su tabakasını pastör pipeti ile dikkatlice alınız. Kurutmak için içine pamuk ile tıkaç yaptığınız pastör pipetinin pamuğunun üzerine 0.5 g susuz sodyum sülfat koyup heksan ekstraktınızı buradan temiz, kuru bir tüpe süzünüz.
- E. Jilet veya makasla küçük parçalara kestiğiniz koyu yeşil ıspanak yapraklarını soğutulmuş havana koyup üzerine soğuk aseton ekleyiniz, yaklaşık 1 dakika havanda eziniz. Havan içeriğini 50 ml'lik erlene koyunuz, ağzını kapatarak kuvvetlice karıştırınız. Buzdolabında 10 dak. bekletiniz, yaprak kalıntıları çöktükten sonra üst tabakayı kâğıt kromatografisi veya TLC yöntemiyle pigmentlerin ayrılması için kullanabilirsiniz.
- Ham klorofil ekstresini isterseniz filtre kâğıdından da süzebilirsiniz.
 - Eğer toksik olduğu için kullanılmayan benzen bu ekstraksiyon işleminde kullanılmış olsaydı; bir süre sonra tüpün üst kısmında benzende çözünen klorofil, alt kısımda ise alkolde kalan karoten ve ksantofil pigmentleri bulunacaktır (Şekil: 7.16.6 ve 7.16.7)



Klorofil + Karoten + Ksantofil

Şekil 5.16.6: Süzülen ekstre.

Klorofil
(benzende çözünmüş, belirli bir süre sonra rengi yeşile dönecektir)

Karoten + Ksantofil

Şekil 5.16.7: Klorofil, karoten ve ksantofil.

Pigmentleri bu şekilde kabaca ayrılabilir. Başlıca grupları daha ayrıntılı görebilmek için kâğıt ve tebeşir kullanılarak maddeler molekül ağırlığı ve adsorpsiyon derecelerine göre ayrılır. Bir petri içine süzölmüş olan berrak klorofil ekstresinden bir miktar koyulur. İçerisine şerit şeklinde kesilerek hazırlanmış kurutma kâğıdı ile tebeşir yerleştirilir. Bir süre sonra kâğıdın ve tebeşirin üst kısımlarında sarı renkli karoten ve ksantofil, alt kısmında ise yeşil renkli kloro-

filin toplandığı görülür. Bu kademeli renk farkı maddelerin molekül ağırlıklarının ve adsorpsiyon derecelerinin farklı olmasından ileri gelir.

Yaprak ekstresine ince tabaka kromatografisi (TLC) veya kâğıt kromatografisi uygulandığında pigmentler aşağıdaki gibi görünür:

Karotenler (1-2 sarı-turuncu leke)

Feofitin A (gri, yoğun)

Feofitin B (gri, yalnız UV altında görülebilir)

Klorofil A (mavi-yeşil, yoğun)

Klorofil B (yeşil, zeytin yeşili)

Ksantofiller (sayısı 3'e varan sarı lekeler)

Violoksantin (sarı)

Lutein (sarı)

Violoksantin ve lutein (ksantofil pigmentleridir ve üst üste çalışabilirler)

SORULAR:

1. Fotosentez hangi ışıkta gerçekleşir?
2. Fotosentez ile floresans olayı arasında nasıl bir ilişki kurulabilir?
3. Pigment molekülleri hangi hücre organellerinde bulunur? Karoten ve ksantofilin fotosentezdeki rolleri nelerdir?
4. Deneye bakarak pigment moleküllerinin ağırlığı hakkında ne söylenebilir?

KAYNAKLAR

Keeton, W. T., Gould, J. L. (2000). Genel Biyoloji, Çeviri: Demirsoy A., Türkan, İ., Palme Yayıncılık, Ankara.

Ocakverdi, H., Kaya, B. (2001). Bitki Fizyolojisi Laboratuvar Kitabı, Palme Yayıncılık, Ankara.

<http://course1.winona.edu/kbates/Bio241/documents/Chromatography06.doc>

http://eprints.lib.okayama-u.ac.jp/352/1/043_0075_0084.pdf

<http://facstaff.bloomu.edu/mpugh/Experiment2.pdf>

<http://homepages.uwp.edu/higgs/Lect1Plant.pdf>

[http://mobilim.bozok.edu.tr/tr/deney/Biyoloji_Deneyleri_\(8\).pdf](http://mobilim.bozok.edu.tr/tr/deney/Biyoloji_Deneyleri_(8).pdf)

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e04/04a.htm>

http://www.columbia.edu/itc/chemistry/c2507/2005%20Manual/carotene_intro.pdf

<http://www.epa.gov/glnpo/lmmb/methods/methd150.pdf>

http://www.files.chem.vt.edu/RVGS/ACT/lab/Experiments/Exp_14-TLC.html

<http://www.philasim.org/newmanual/exp22.pdf>