

ROMUALD CZERPAK, BAZYLI CZECZUGA

WYSTĘPOWANIE, BIOSYNTeza I ROLA BIOLOGICZNA KAROTENOIDÓW U GLONÓW

Glony są to rośliny fotosyntetyzujące przeważnie mikroskopijnej wielkości lub większe w postaci plechy żyjące głównie w wodach słodkich i słonych, rzadziej w miejscach bardzo wilgotnych na skałach, drzewach lub glebie. Są to rośliny o bardzo wysokiej produktywności fotosyntetycznej, gdyż wytwarzają przeciętnie około 70% ogólnej materii organicznej i tlenu na kuli ziemskiej [71].

Chemiczny skład glonów dotychczas nie jest dobrze poznany z powodu ogromnego zróżnicowania taksonomicznego i zmienności w zależności od warunków środowiska. W organicznej substancji glonów dominują białka w ilości 20—45%, węglowodany 30—79% i tłuszczoce 1—30% suchej masy [71]. W oparciu o chemiczną analizę glonów wykazano, że są one bogatym źródłem różnorodnych aminokwasów, soli mineralnych i witamin w szczególności karotenoidów będących prowitaminą witaminy A.

Duża zasobność glonów zwłaszcza sinic, zielenic, brunatnic i krasnorostów w białka, węglowodany oraz barwniki karotenoidowe zadecydowała o możliwościach wykorzystania ich na szeroką skalę w najbliższej przyszłości dla celów żywnościowych, paszowych i leczniczych.

Karotenoidy stanowią jedną z najbardziej rozpowszechnionych grup barwników naturalnych występujących w świecie roślinnym i zwierzęcym o zabarwieniu od żółtego do czerwonego, a nawet czerwono-fioletowego. Występują one przede wszystkim w tłuszczach w postaci wolnej, estrowej z kwasami tłuszczowymi, glikozydowej z pentozami lub kompleksowej z białkami [41]. Dlatego też nazywane są często pigmentami lipochromowymi [72]. Spełniają one bardzo różnorodne funkcje fizjologiczne.

Glony wśród nich szczególnie złotowiciowce, zielenice, okrzemki i eugleniny są najbardziej zasobne w karotenoidy [18, 71, 72, 100, 105]. Według danych literaturowych [2, 33, 63, 83, 85, 89, 100, 105] ogólna zawartość karotenoidów w suchej masie może maksymalnie wynosić u euglenin 0,44%, okrzemek 0,58%, zielenic 0,64% i złotowiciowców 1,67%, zaś u roślin naczyniowych zaledwie 0,25%.

Występowanie karotenoidów w poszczególnych grupach taksonomicznych

a nawet pojedynczych gatunków glonów, charakteryzuje się dość dużą zmiennością ilościową a także jakościową [18, 22, 24, 72, 85, 100, 105]. Spowodowane to może być wieloma czynnikami głównie o podłożu genetycznym, osobniczym i środowiskowym (światło, temperatura, składniki mineralne) [26, 89]. Mimo to w poszczególnych grupach taksonomicznych glonów występują charakterystyczne barwniki karotenoidowe i chlorofilowe, a ponadto niektóre z nich wyraźnie ilościowo dominują nad pozostałymi [16, 22, 24, 72, 100, 105].

Spośród dotychczas zidentyfikowanych barwników karotenoidowych dominują: β -karoten u sinic [108, 121]; astaksantyna, anteraksantyna i β -karoten u euglenin [18, 83]; perydyna, diatoksantyna i β -karoten u tobołków [9, 87]; diadinoksantyna i β -karoten u złotowiciowców [2, 12, 66]; β -karoten i wiolaksantyna u różnowiciowców [86, 117]; fukoksantyna i β -karoten u okrzemek [63]; β -karoten i luteina u zielenic [51, 80, 84]; fukoksantyna i wiolaksantyna u brunatnic [22, 24, 68]; anteraksantyna, β -karoten i zeaksantyna u krasnorostów [1, 24] oraz β -karoten i neoksantyna u ramienic [105].

W sumie u glonów wykryto przeszło 60 karotenoidów. Miejscem ich lokalizacji w obrębie komórki glonu są struktury granularne i lamelarne chromatoforów fotosyntezujących, w których znajdują się również barwniki chlorofilowe [85, 100, 105].

W oparciu o dostępną literaturę sporządzono tabelę I, która zawiera szczegółowy wykaz karotenoidów dotychczas zidentyfikowanych w poszczególnych grupach systematycznych glonów. Natomiast w tabeli II podano bardziej znanych autorów, którzy zajmowali się identyfikacją karotenoidów zawartych u glonów.

Karotenoidy są to barwniki o budowie alifatycznej lub alicyklicznej składające się najczęściej z ośmiu jednostek izoprenowych połączonych w ten sposób, że dwie grupy metylowe najbliżej centrum cząsteczki są w pozycji 1 i 6, zaś pozostałe grupy metylowe znajdują się w pozycjach 1 i 5. Stanowią one podgrupę barwników polienowych zawierających w cząsteczce przeważnie czterdzieści atomów węgla [41, 72]. Karotenoidy są zasadniczo tetraterpenami mającymi szereg skoniugowanych wiązań podwójnych, a nawet potrójnych tworzących układ chromoforowy o dużej liczbie izomerów geometrycznych cis — trans [44, 59].

Ogólnie karotenoidy można podzielić na dwie zasadnicze grupy: węglowodorowe zwane karotenami o wzorze sumarycznym $C_{40}H_{56}$ i ich pochodne tlenowe zwane ksantofilami o wzorze sumarycznym $C_{40}H_{56}O_{1-8}$. Najbardziej rozpowszechnione w przyrodzie α , β i γ -karoteny zbudowane są z jednego lub dwóch pierścieni α bądź β -jonowych [69]. Ksantofile zawierają grupy funkcyjne (podstawniki): hydroksy, metoksy, epoksy, karboksy, keto i aldehydo, które najbardziej decydują o ich różnych właściwościach fizykochemicznych [59, 69, 70]. Naturalne ksantofile występujące u glonów są przeważnie pochodnymi α i β rzadziej γ -karotenu [44]. Wszystkie naturalne karotenoidy mogą być uważane za pochodne likopenu [115].

Według Weedona [116] biorąc pod uwagę strukturę i właściwości fizykochemiczne karotenoidy występujące w przyrodzie można podzielić na osiem grup: — karoteny zwane hydrolikopenami,

Występowanie barwników karotenoidowych u glonów

| Nazwa karotenoidu wg Foppen'a F. H. [39] | Taksonomia ogólna glonów | | | | | | | | | |
|--|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|---|---|--|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| | Sinice (<i>Cyanophyta</i>) | Eugleniny (<i>Euglenophyta</i>) | Tobolki (<i>Pyrophyta</i>) | Złotowiciowce (<i>Chrysophyceae</i>) | Różnowiciowce (<i>Xanthophyceae</i>) | Okrzemki (<i>Bacillariophyceae</i>) | Zielonice (<i>Chlorophyta</i>) | Brunatnice (<i>Phaeophyta</i>) | Krasnorosty (<i>Rhodophyta</i>) | Ramienice (<i>Charales</i>) |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| KAROTENY | | | | | | | | | | |
| α-karoten | + | + | + | + | + | ? | + | ? | + | ? |
| β-karoten | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| γ-karoten | — | + | — | — | + | — | + | — | — | — |
| ε-karoten | ? | + | ? | — | ? | + | — | — | — | — |
| ζ-karoten | — | ? | — | + | ? | — | + | — | — | ? |
| likopen | — | — | — | — | + | — | ? | — | — | + |
| β-zeakaroten | — | — | + | — | — | — | — | + | — | — |
| KSANTOFIL | | | | | | | | | | |
| aleuriaksantyna | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| alloksantyna | — | — | + | + | — | — | — | — | — | — |
| afanizofil | + | — | — | — | — | — | ? | — | — | — |
| anteraksantyna | — | + | — | — | + | — | + | — | + | — |
| astacen | — | + | — | — | — | — | + | — | — | — |
| astaksantyna | — | + | — | — | — | — | + | — | — | — |
| auroksantyna | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — |
| diadinoksantyna | — | + | + | + | — | + | — | — | — | — |
| diatoksantyna | — | — | + | + | — | + | — | — | — | — |
| dinoksantyna | — | + | + | + | + | — | — | — | — | — |
| echinenon | + | + | — | — | — | — | + | — | — | — |
| euglenanon | ? | + | — | — | — | — | — | — | — | — |
| flawacyna | + | — | — | — | + | — | — | — | — | — |
| flawoksantyna | — | + | — | — | + | — | ? | — | — | — |
| fukoksantyna | — | — | + | + | — | + | — | + | ? | — |
| fukoksantol a | — | — | — | — | — | — | — | + | — | — |
| fukoksantol b | — | — | — | — | — | — | — | + | — | — |
| 3'-hydroksyechinenon | + | + | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 4-hydroksy-α-karoten | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — |
| 2-hydroksy-β-karoten | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — |
| 2-hydroksy-ε-karoten | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — |
| izozeaksantyna | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — |
| kaloksantyna | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| kantaksantyna | + | — | — | — | — | — | + | — | — | — |
| krokoksantyna | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — |
| kryptoksantyna | + | + | — | — | — | — | + | — | + | — |
| α-kryptoksantyna | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — |
| loroksantyna | — | — | — | + | + | — | — | — | — | — |
| luteina | + | + | + | — | + | ? | + | ? | + | + |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| tuteinomonooepoksyd | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — |
| luteoksantyna | — | — | — | — | + | — | + | — | — | — |
| myksoksantofil | + | ? | — | — | — | — | — | — | — | — |
| monadoksantyna | — | — | + | + | — | — | — | — | — | — |
| mutatoksantyna | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — |
| neochrom | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — |
| neodiadinoksantyna | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — |
| neodinoksantyna | — | — | + | ? | — | + | — | — | — | — |
| neofukoksantyna a | — | — | + | + | — | + | — | + | — | — |
| neofukoksantyna b | — | — | + | + | — | + | — | + | — | — |
| neoksantyna | — | + | — | — | + | — | + | + | + | + |
| neoperydyna | — | — | + | + | — | — | — | — | — | — |
| nostoksantyna | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| oscilaksantyna | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| perydyna | — | — | + | + | — | — | — | — | — | — |
| pyrroksantyna | — | — | + | + | — | — | — | — | — | — |
| rodoksantyna | — | — | — | — | — | — | + | + | + | — |
| sarcinaksantyna | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — |
| syfonaksantyna | — | — | — | + | — | — | + | — | — | — |
| syfoneina | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — |
| taraksantyna | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — |
| trolliksantyna | — | + | — | + | + | — | + | — | — | — |
| 2,3,3'-trójhydroksy- β -karoten | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| wiolaksantyna | — | + | — | — | + | — | + | + | — | + |
| zeaksantyna | + | + | — | — | + | — | + | — | + | + |
| zeinoksantyna | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — |

- z podstawnikami przy atomach węgla C-2, C-3 lub C-4,
- z podstawnikiem przy atomie węgla C-1,
- allenowe,
- acetylenowe,
- z jednym lub dwoma 5-członowymi pierścieniami,
- aromatyczne,
- acykliczne.

Strukturę niektórych najbardziej charakterystycznych spośród wyżej wymienionych grup karotenoidów przedstawiają schematy 1—8 zawarte w ryc. 1.

Tworzenie się karotenoidów w organizmach roślinnych związane jest z udziałem kwasu mewalonowego, który jest wspólnym prekursorem wszystkich izoprenoidów. Pierwszym ogniwem w biosyntezie kwasu mewalonowego (MVA) jest acetylo-CoA. Najpierw w wyniku reakcji kondensacji z dwóch cząsteczek acetylo-CoA powstaje acetoacetylo CoA, z którego po dołączeniu trzeciej cząsteczki acetylo-CoA tworzy się β -hydroksy- β -metyloglutarylo-CoA. Następnie w reakcji nieodwracalnej z NAD H₂ ulega on redukcji do kwasu mewalonowego [43, 45].

TABELA II

Autorzy, którzy zajmowali się identyfikacją karotenoidów u glonów

| Jednostki taksonomiczne | Pozycje literaturowe |
|--|--|
| Sinice (<i>Cyanophyta</i>) | 8, 56, 57, 58, 71, 72, 73, 101, 104, 105, 107, 108, 113, 122. |
| Eugleniny (<i>Euglenophyta</i>) | 18, 48, 49, 50, 71, 72, 73, 83, 98, 103, 105, 111, 112. |
| Tobolki (<i>Pyrrophyta</i>) | 9, 12, 71, 72, 87, 105, 108, 120. |
| Złotowiciowce (<i>Chrysophyceae</i>) | 2, 3, 4, 63, 64, 65, 66, 67, 71, 72, 86, 87, 105, 106. |
| Różnowiciowce (<i>Xanthophyceae</i>) | 9, 10, 52, 63, 71, 72, 93, 94, 95, 105, 106, 110, 117. |
| Okrzemki (<i>Bacillariophyceae</i>) | 63, 64, 65, 171, 72, 73, 105, 106. |
| Zielenice (<i>Chlorophyta</i>) | 3, 5, 8, 11, 16, 22, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 51, 52, 53, 55, 60, 61, 62, 63, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 84, 88, 90, 92, 97, 102, 105, 109, 114, 117, 124. |
| Brunatnice (<i>Phaeophyta</i>) | 22, 24, 68, 71, 72, 73, 105, 106, 118, 119. |
| Krasnorosty (<i>Rhodophyta</i>) | 1, 3, 24, 71, 72, 73, 105. |
| Ramienice (<i>Charales</i>) | 41, 71, 72, 105, 119. |

Oprócz wyżej opisanego szlaku biosyntetycznego kwas mewalonowy może także tworzyć się z przemian katabolicznych leucyny [47]. Przy udziale dwóch cząsteczek ATP zostaje on przekształcony w pirofosforan mewalonolu. Z kolei w wyniku dekarboksylacji i dehydratacji powstaje pirofosforan izopentenylu o trzech grupach metylenowych, uważany za „biologiczną jednostkę izoprenową”.

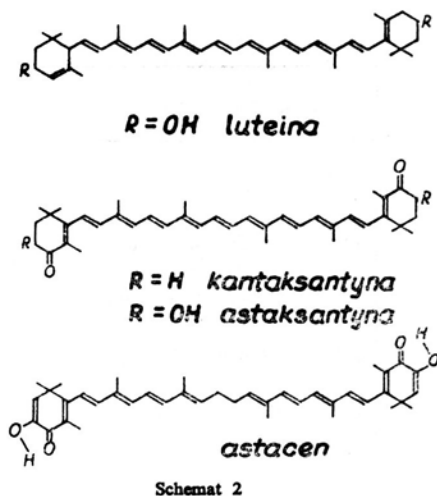
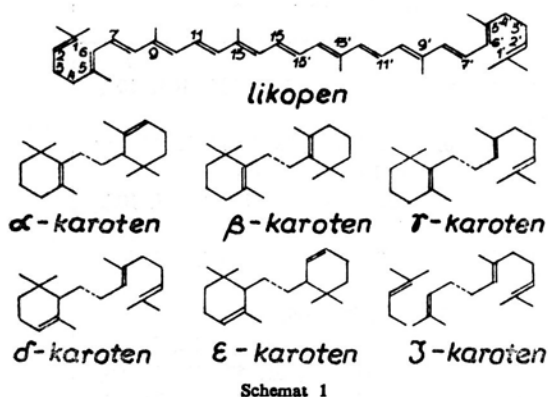
Atomy węgla tych grup są włączane do szkieletu karotenoidowego, natomiast niektóre z ich atomów wodoru ulegają stereospecyficznej eliminacji na różnych etapach biosyntezy. Zostało to potwierdzone przy zastosowaniu jako prekursorów podwójnie znakowanych węglem ^{14}C i wodorem ^3H stereoizomerów kwasu mewalonowego [46, 73].

Pod wpływem swoistej izomerazy z pirofosforanu izopentenylu tworzy się pirofosforan α , α -dwumetyloallilu. Związek ten kondensując z pirofosforanem izopentenylu przekształca się w pirofosforan geranylu, z którego po przyłączeniu jednej cząsteczki pirofosforanu izopentenylu powstaje pirofosforan farnezyli. Dołączenie do tego związku jeszcze jednej cząsteczki pirofosforanu izopentenylu daje pirofosforan geranylogeranylu. Jest to cząsteczka dwudziestowęglowa charakterystyczna dla dwuterpenów, z której w wyniku dimeryzacji powstaje acykliczny układ czteroterpenowy charakterystyczny dla karotenoidów [45, 47].

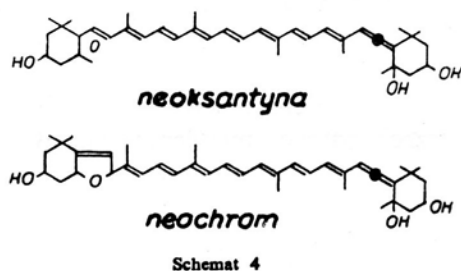
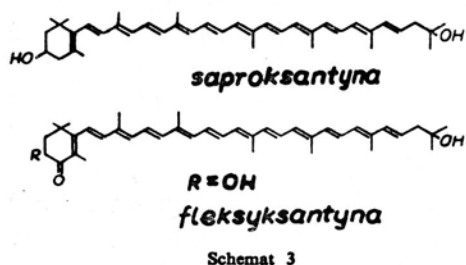
Tworzenie się cyklicznych karotenów może odbywać się z czterdziestowęglowych acyklicznych prekursorów neurosporenu lub likopenu [46].

Przebieg biosyntezy poszczególnych prekursorów karotenów i ich przemian prowadzących do powstania α i β -karotenu przedstawia schemat 1 w ryc. 2.

Natomiast sam mechanizm cyklizacji z wprowadzonym izotopem wodoru ^3H do układów α i β -jonowych przedstawia schemat 2 w ryc. 2.



Schemat 1. Karoteny (hydrolikopeny)
Schemat 2. Karotenoidy z podstawnikami przy C-2, C-3 lub C-4



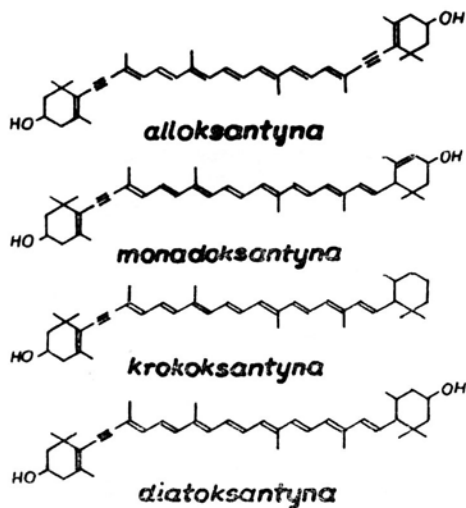
Schemat 3. Karotenoidy z podstawnikami przy C-1
Schemat 4. Karotenoidy allenowe

Ryc. 1. Cz. I

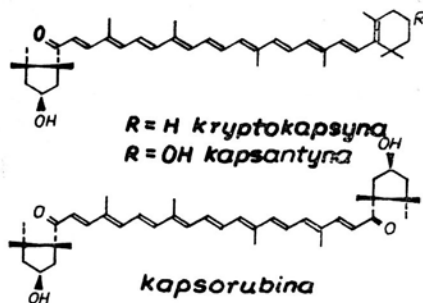
Mechanizm zamykania pierścieni α i β -jononowych w acyklicznych prekursorach jest najpierw inicjowany atakiem protonu przy atomie węgla C-2. W ten sposób wytworzony nietrwały jon karbonyowy może utracić proton przy atomie węgla C-6 i stać się stabilnym układem β -jononu, lub przy atomie węgla C-4 i stać się wtedy trwałym układem α -jononu [118, 119].

Biosynteza karotenoidów i mechanizmy jej regulacji zachodzą u roślin fotosyntetyzujących w chloroplastach, a u glonów w poospolicie zwanych chromatoforach [118, 124].

Karotenoidy w obrębie samych glonów ulegają różnokierunkowym przemianom prowadzącym głównie do wytworzenia tlenowych pochodnych zwyczajowo



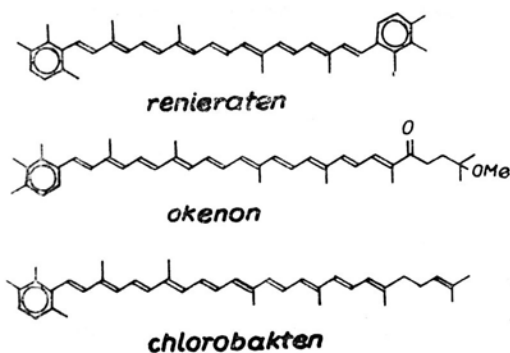
Schemat 5



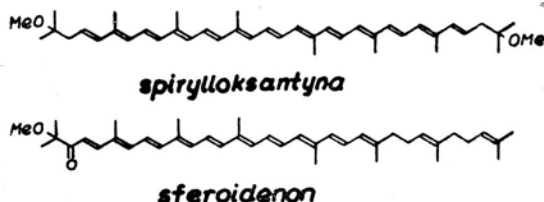
Schemat 6

Schemat 5. Karotenoidy acetylenowe

Schemat 6. Karotenoidy z pięciocłonowym pierścieniem



Schemat 7



Schemat 8

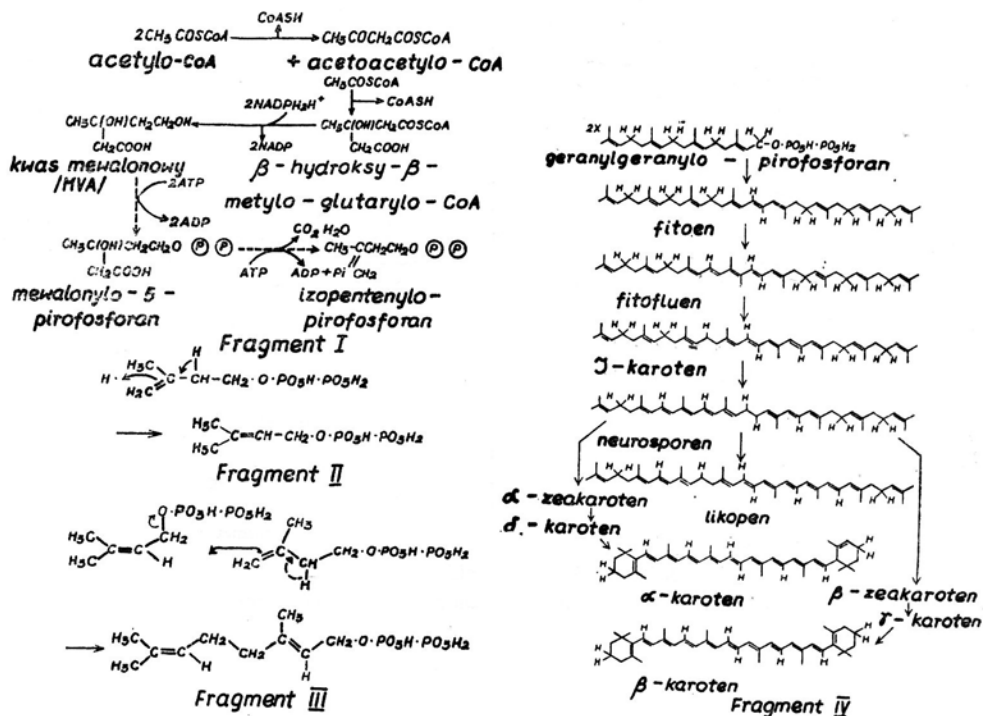
Schemat 7. Karotenoidy aromatyczne

Schemat 8. Karotenoidy acykliczne

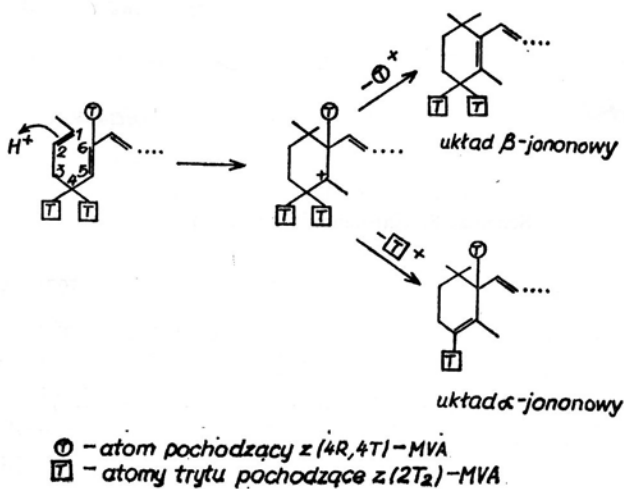
Ryc. 1. Cz. II

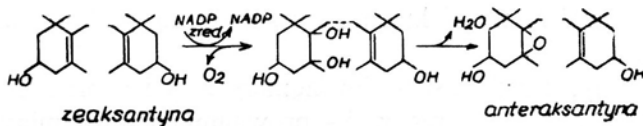
Ryc. 1. Struktura niektórych charakterystycznych karotenoidów (wg Foppena 1971 i Weedona 1967) nazywanych ksantofilami. Procesy utleniania karotenów do różnorodnych form ksantofili zachodzą w chromatoforach, a także mitochondriach, w obecności enzymów oksigenaz i prowadzą do wytworzenia grup funkcyjnych hydroksy, keto i epoksy [98, 103, 123]. Ksantofile mogą ulegać procesom uwodornienia przy udziale enzymów z grupy reduktaz [122]. Istotny wpływ na przebieg procesów oksydacyjno-redukcyjnych jakim podlegają karotenoidy wywiera światło, tlen, temperatura i obecność biokatalizatorów typu oksydo-reduktaz [103, 109].

Biosynteza najbardziej utlenionych epoksydowych form karotenoidów (np. antraksantyny, fukoksoksantyny, wioloksoksantyny) jest prawdopodobnie procesem odwracalnym i zachodzi z udziałem cząsteczkowego tlenu i wody oraz wodoru zwią-



Schemat 1. Biosynteza karotenów (wg Goodwina 1968)

Schemat 2. Mechanizm cyklizacji do układów α - i β -jononowych (wg Williamsa i in. 1967 i Wolka — 1973)



Schemat 3. Przemiana zeaksantyny do anteraksantyny (wg Wolka 1973 i Yamamoto i in. 1965)

Ryc. 2. Cz. II

Ryc. 2. Fragmenty biosyntezy niektórych typów karotenoidów

zanego z przenośnikiem NADP [10, 84, 124]. Przypuszcza się, że równolegle ze starzeniem się roślin wzrasta ilość ksantofili, a zwłaszcza ich form epoksydowych [79, 125].

Przemiana zeaksantyny do anteraksantyny przedstawiona na schemacie 3 w ryc. 2 jest jednym z fragmentów skomplikowanych przemian oksydo-redukcyjnych jakim podlegają karotenoidy u roślin w okresie ich życia i rozwoju.

U glonów większość występujących ksantofili stanowią pochodne β -karotenu, zaś w mniejszości są to pochodne α i γ -karotenu [100].

W dotychczasowych badaniach u glonów stwierdzono karotenoidy z następujących grup: karoteny i ksantofile z podstawnikami najczęściej przy C-3 i C-4 rzadziej przy C-2 oraz formy acetylenowe [69, 87, 116].

Natomiast u innych roślin szczególnie bakterii, u glonów żyjących w symbiozie z gąbkami i grzybami wykazano obecność karotenoidów z podstawnikami przy C-1, z 5-członowym pierścieniem oraz formy allenowe, aromatyczne i acykliczne [13, 14, 16, 17, 21, 25, 27, 44, 105, 116]. Formy te tworzą się z prekursorów karotenowych w wyniku reakcji oksydacji, hydrogenacji, hydratacji, metylacji, epoksydacji, a nawet przegrupowania pinakolinowego [43, 44, 46, 47, 59, 116, 122].

Na podstawie współczesnych badań wiadomo, że rola karotenoidów w organizmach roślinnych jest bardzo różnorodna i nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona. Do podstawowych funkcji tych barwników jest ich współdziałanie w fotosyntezie, zwłaszcza u niektórych glonów żyjących w głębszych warstwach wody [44, 73, 85, 103, 121].

Ogrywiają one ważną rolę w fototaksji i fototropizmach, szczególnie glonów zdolnych do samodzielnego poruszania się [18, 41, 59].

Przypisuje się im udział w tworzeniu oraz ochronie struktury lamelli chloroplastów oraz absorpcji i przenoszeniu na chlorofil energii świetlnej [21, 26, 59, 122].

Karotenoidy chronią między innymi wewnątrz komórki przed ujemnymi skutkami fotooksydacji [59].

Spełniają także istotną rolę w przemianach oksydoredukcyjnych związanych z przenoszeniem tlenu, wodoru i elektronów [59, 105].

Oprócz tego karotenoidy u glonów ogrywiają ważną rolę w reprodukcji, zwłaszcza w procesie zapłodnienia gamet obdarzonych ruchem [59, 72].

Sugeruje się również, że niektóre karotenoidy są prekursorami hormonów roślinnych [122].

Ponadto karoteny, przede wszystkim izomery α , β i γ oraz ksantofile ubogie w tlen są u zwierząt, głównie kręgowców prowitaminami witaminy A [28].

Podstawową czynnością laboratoryjną w analizie barwników karotenoidowych jest ich właściwe wyodrębnienie z materiału roślinnego. Przed ekstrakcją konieczne jest uprzednie zniszczenie struktury komórkowej badanego materiału przez macerację [15, 19, 20, 28].

Do ekstrakcji karotenoidów stosuje się rozpuszczalniki organiczne przeważnie aceton, eter naftowy, benzen, benzynę, heksan, chloroform, dwusiarczek węgla, metanol i etanol pojedynczo lub ich mieszaniny [28, 72].

W celu otrzymania połączeń karotenoidów wolnych od tłuszczów, białek i węglowodanów uzyskany ekstrakt barwników poddaje się hydrolizie stosując najczęściej 60% wodno-alkoholowy roztwór KOH, najlepiej w temperaturze pokojowej i atmosferze azotu [91, 97]. Po uzyskaniu czystego ekstraktu karotenoidów należy go osuszyć bezwodnym Na_2SO_4 [106].

Rozdział barwników znajdujących się w ekstrakcie można przeprowadzić metodami chromatografii absorpcyjnej kolumnowej, cienkwarstwowej i bibułowej [28, 39, 44].

W chromatografii kolumnowej jako adsorbenty stosuje się najczęściej aktywowany tlenek glinu, tlenek magnezu, tlenek wapnia, węglan wapnia i celit [68, 100, 103]. Natomiast w chromatografii cienkwarstwowej do pokrywania płytek używa się przeważnie aktywowany żel krzemionkowy najlepiej zmieszany z gipsem, tlenek i węglan magnezu oraz tlenek glinu [39, 96, 98, 100, 102].

W przypadku chromatografii bibułowej paskowej bądź krążkowej zaleca się najbardziej bibułę Schleicher — Schüll nr 6 i Whatman nr 1—4 [54, 63, 100, 106].

Do rozwijania i eluowania barwników na w. w. adsorbentach służą te same rozpuszczalniki organiczne co przy ekstrakcji, które mogą być zmieszane ze sobą w odpowiedniej proporcji zależnie od chemicznego charakteru rozdzielanych karotenoidów i stosowanych adsorbentów [39].

Ostatnio w analizie karotenoidów podjęto próby zastosowania chromatografii gazowej [39, 59, 69].

Po dokonaniu rozdziału, identyfikacji barwników w poszczególnych pasmach bądź frakcjach dokonuje się przede wszystkim oznaczając maksima absorpcji w świetle widzialnym lub podczerwieni, które są charakterystyczne dla poszczególnych związków, a nawet ich izomerów w odpowiednich rozpuszczalnikach organicznych [28, 39, 59, 69, 74]. Mając dostateczną ilość wykrystalizowanego barwnika można oznaczyć jego temperaturę topnienia [24].

Przy chromatogramach bibułowych i cienkwarstwowych można wyliczyć wartości R_f , które są charakterystyczne dla poszczególnych barwników przy określonych adsorbentach i rozwijających układach rozpuszczalników [63, 68, 72, 98, 105, 106].

Ponadto w celu ustalenia charakteru grup funkcyjnych w badanych barwnikach należy oznaczyć ich współczynniki podziału w mieszaninie dwóch rozpu-

szczalników polarnego i niepolarnego np.: 95% metanolu w heksanie [39, 100,

W najnowszych badaniach dotyczących identyfikacji karotenoidów stosuje się spektrometrię masową oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądowego (NMR), co pozwala na precyzyjne określenie struktury fizyko-chemicznej badanego związku [39, 59, 69, 115, 116].

LITERATURA

- [1] Aihara M. S., Yamamoto H. Y. 1968. *Phytochemistry*, 7, 497—499.
- [2] Allen M. B. 1969. *Ann. Rev. Microbiol.* 23, 29—46.
- [3] Allen M. B., Fries L., Goodwin T. W., Thomas D. H. 1974. *J. Gen. Microbiol.* 34, 259—265.
- [4] Allen M. B., Goodwin T. W., Phagpolngarn S. 1960. *J. Gen. Microbiol.*, 23, 93—99.
- [5] Bolliger H. R., König A., Schwieter U. 1964. *Chimia*, 18, 122—136.
- [6] Buchecker R., Arpin N., Jensen S. L. 1976. *Phytochemistry*, 15, 1013—1015.
- [7] Buchecker R., Jensen S. L., Borch G., Sigelman H. W. 1976. *Phytochemistry*, 15, 1015—1018.
- [8] Bunt J. S. 1964. *Nature* 203, 1261—1263.
- [9] Chapman D. J. 1966. *Phytochemistry*, 5, 1331—1333.
- [10] Chapman D. J., Haxo F. T. 1966. *J. Phycol.*, 2, 89—91.
- [11] Claes H. 1954. *Zeitsch. Naturforsch.* 96, 322—328.
- [12] Czerpak R. 1969. *Wiad. Chem.* 23, 364—365.
- [13] Czeczuga B. 1971. *Mar. Biol.*, 10, 254—257.
- [14] Czeczuga B. 1971. *Rev. Intern. Oceanogr. Medicale*, 24, 151—152.
- [15] Czeczuga B. 1972. *Planta (Berl.)*, 103, 87—90.
- [16] Czeczuga B. 1974. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 22, 91—94.
- [17] Czeczuga B. 1974. *Wiad. Botaniczne*, 18, 85—89.
- [18] Czeczuga B. 1974. *Comp. Biochem. Physiol.*, 48 B, 349—354.
- [19] Czeczuga B. 1974. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 43, 499—504.
- [20] Czeczuga B. 1974. *Marcellia (Lond.)*, 38, 223—225.
- [21] Czeczuga B. 1975. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 23, 181—184.
- [22] Czeczuga B. 1975. *Nova Hedwigia*, 26, 157—163.
- [23] Czeczuga B. 1975. *Rep. VIII Inter. Congr. Plant Procetion, Moskva*, 2, 45—50.
- [24] Czeczuga B. 1976. *Nova Hedwigia*, 27, 223—230.
- [25] Czeczuga B. 1976. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 24, 469—471.
- [26] Czeczuga B. 1977. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 25 (in press).
- [27] Czeczuga B., Czerpak R. 1974. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 22, 527—530.
- [28] Czeczuga B., Czerpak R. 1976. *Acta Hydrobiol.*, 18, 1—21.
- [29] Czygan F. Ch. 1964. *Experientia*, 20, 573—577.
- [30] Czygan F. Ch. 1966. *Zeitsch. Naturforsch.*, 21 b, 197—205.
- [31] Czygan F. Ch. 1966. *Zeitsch. Naturforsch.*, 21 b, 801—806.
- [32] Czygan F. Ch. 1968. *Arch. Mikrobiol.*, 61, 81—102.
- [33] Czygan F. Ch. 1968. *Arch. Mikrobiol.*, 62, 209—236.
- [34] Czygan F. Ch., Kessler E. 1967. *Zeitsch. Naturforsch.*, 22, 1085—1091.
- [35] Dersch C. 1960. *Flora (Jena)*, 149, 566—578.
- [36] DiAccadia F. D., Griбанowski-Sassu O., Romagnoli A., Tuttobello L. 1966. *Nature (Lond.)*, 208, 1342—1348.
- [37] DiAccadia F. D., Griбанowski-Sassu O., Romagnoli A., Tuttobello L. 1966. *Biochem. J.* 101, 735—744.

- [38] Drop M. R. 1955. *Nature (Lond.)*, 175, 42—47.
- [39] Foppen F. H. 1971. *Chromatogr. Rev.*, 14, 133—298.
- [40] Goodwin T. W. 1954. *Experientia*, 10, 213—215.
- [41] Goodwin T. W. 1955. Carotenoids in „Handbook of Plant Analysis” (ed. Paech K., Tracey M. V.), 3, pp. 272.
- [42] Goodwin T. W. 1957. *J. Gen. Microbiol.*, 17, 467—471.
- [43] Goodwin T. W. 1959. *Advan. Enzymol.*, 21, 295—298.
- [44] Goodwin T. W. 1965. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Acad. Press, London—N. Y., pp. 583.
- [45] Goodwin T. W. 1967. *Stud. Biophys.*, 5, 1—13.
- [46] Goodwin T. W. 1968. *J. Sci. Industr. Res.*, 27, 103—105.
- [47] Goodwin T. W. 1971. *Biochem. J.*, 123, 293—299.
- [48] Goodwin T. W., Gross J. A. 1958. *J. Protozool.*, 5, 290—295.
- [49] Goodwin T. W., Jamikorn M. 1954. *J. Protozool.*, 1, 216—219.
- [50] Green J. 1963. *Comp. Biochem. Physiol.*, 9, 313—317.
- [51] Hager A. 1967. *Planta (Berl.)*, 74, 148—172.
- [52] Hager A., Meyer-Bertenrath T. 1976. *Planta (Berl.)*, 76, 149—168.
- [53] Hager A., Stransky H. 1970. *Arch. Mikrobiol.*, 72, 68—97.
- [54] Hallegraeff G. M. 1976. *Internat. Rev. Ges. Hydrobiol.*, 61, 149—168.
- [55] Herring P. J. 1968. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24, 187—203.
- [56] Hertzberg S., Jensen S. L. 1966. *Phytochemistry* 5, 557—564.
- [57] Hertzberg S., Jensen S. L. 1966. *Phytochemistry* 5, 565—572.
- [58] Homma N., Nakayama T., Sato Y. 1973. *Bull. Nigata Prefec.*, 10, 135—139.
- [59] Isler O., Gutmann H., Solms U. 1971. Carotenoids, Eds. Birkhauser, Basel, pp. 932.
- [60] Iwata I., Nakata H., Sakurai Y. 1961. *Agr. Biol. Chem.*, 25, 377—382.
- [61] Iwata I., Sakurai Y. 1963. *Agr. Biol. Chem.*, 27, 253—258.
- [62] Iwata I., Sakurai Y. 1963. *Agr. Biol. Chem.*, 27, 259—263.
- [63] Jeffrey S. W. 1961. *Biochem. J.*, 80, 336—342.
- [64] Jeffrey S. W. 1968. *Biochem. Biophys. Acta*, 162, 271—285.
- [65] Jeffrey S. W. 1968. *Limnol. Oceanograph.*, 13, 350—355.
- [66] Jeffrey S. W. 1974. *Mar. Biol.*, 26, 101—107.
- [67] Jeffrey S. W., Haxo F. T. 1968. *Biol. Bull.*, 135, 149—165.
- [68] Jensen A. 1966. „Carotenoids of Norwegian brown seaweeds and of seaweed meals”, *Norweg. Inst. Scaw. Res. N. T. H., Trondheim, Norway*, pp. 138.
- [69] Jensen S. L. 1967. *Pure Appl. Chem.*, 14, 227—244.
- [70] Jensen S. L. 1969. *Pure Appl. Chem.*, 20, 421—448.
- [71] Kadłubowska J. Z. 1975. *Zarys Algologii*, PWN, Warszawa, s. 503.
- [72] Karrer P., Jucker E. 1948. Carotenoide, Zurich Verlag Birkhausen, Basel, pp. 388.
- [73] Katayama T. 1964. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 30, 436—441.
- [74] Ke B., Imsgard F., Kjoson H., Jensen S. L. 1970. *Biochem. Biophys. Acta* 210, 139—152.
- [75] Kessler E., Czygan F. Ch. 1965. *Berich. Deut. Bot. Ges.* 78, 342—347.
- [76] Kessler E., Czygan F. Ch. 1967. *Arch. Mikrobiol.*, 55, 320—326.
- [77] Kjoson K., Arpin N., Jensen S. L. 1972. *Acta Chem. Scand.*, 26, 3053—3067.
- [78] Kleinig H. 1966. *Berich. Deut. Bot. Ges.*, 79, 126—129.
- [79] Kleinig H. 1967. *Zeitsch. Naturforsch.*, 22b, 977—986.
- [80] Kleinig H., Egger K. 1967. *Phytochemistry*, 6, 611—619.
- [81] Kleinig H., Egger K. 1967. *Phytochemistry*, 6, 1681—1686.
- [82] Krinsky N. I. 1964. *Biochim. Biophys. Acta*, 88, 487—491.
- [83] Krinsky N. I., Goldsmith T. H. 1960. *Arch. Biochem. Biophys.*, 91, 271—279.
- [84] Krinsky N. I., Levine R. P. 1964. *Plant Physiol.*, 39, 680—687.
- [85] Langner W. L., Wiechmann H. 1963. *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria* (ed. Jap. Soc. Plant Physiol.), Tokyo pp. 7—26.

- [86] Loeblich A. R., Smith V. E. 1968. *Lipids*, 3, 5—13.
- [87] Mallams A. K., Waight E. S., Weedon B. C. L. 1967. *Chem. Commun.*, 16, 301—302.
- [88] Myers J. 1940. *Plant Physiol.*, 15, 575—588.
- [89] Nakayama T. O. M. 1962. Carotenoids, in „*Physiology and Biochemistry of Algae*” (ed. Lewin R. A.) Acad. Press N. Y. — London pp. 929.
- [90] Perdue H. S., Smith I. D. 1962. *Proc. Texas Nutr. Conf.*, pp. 77—84.
- [91] Rai H., Lee G. F. 1964. *Anal. Chem.*, 36, 2208—2217.
- [92] Richter G. 1958. *Planta (Berl.)*, 52, 259—263.
- [93] Ricketts T. R. 1967. *Phytochemistry*, 6, 19—24.
- [94] Ricketts T. R. 1967. *Phytochemistry*, 6, 669—676.
- [95] Ricketts T. R. 1967. *Phytochemistry*, 6, 1375—1386.
- [96] Riley J. P., Wilson T. R. S. 1967. *J. Mar. Ass. U. K.*, 47, 351—359.
- [97] Sager R., Zalokar M. 1958. *Nature (Lond.)*, 182, 98—100.
- [98] Schimmer B. P., Krinsky N. I. 1966. *Biochemistry*, 5, 1814—1817.
- [99] Seliskar C. J. 1966. *Anal. Biochem.*, 17, 174—179.
- [100] Šestak Z., Baslerowa M. 1963. *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria* (ed. Jap. Soc. Plant Physiol.) Tokyo.
- [101] Smallidge R. L., Quackenbush F. W. 1973. *Phytochemistry*, 12, 2481—2482.
- [102] Sherma J., Zweig G. J. 1967. *J. Chromatogr.*, 31, 589—593.
- [103] Steele W. J., Gurin S. 1960. *J. Biol. Chem.*, 235, 2778—2785.
- [104] Stetsenko N. M., Komarenko E. I. 1975. *Gidrobiol. zh.*, 11, 97—101.
- [105] Strain H. H. 1952. *Pigments of Algae*, 14 „*Manual of Phycology* (ed. Smith M.), Waltham Chronica Co, pp. 243—262.
- [106] Strain H. H., Manning W. M., Hardlin G. 1944. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.* 86, 170—189.
- [107] Tanaka Y., Matsugucki H., Katayama T. 1974. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, 23, 111—115.
- [108] Tanaka Y., Katayama T. 1975. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, 24, 127—131.
- [109] Theriault R. J. 1965. *J. Appl. Microbiol.*, 13, 402—406.
- [110] Thomas D. M., Goodwin T. W. 1965. *J. Phycol.*, 1, 118—121.
- [111] Tischer J., Hoppe-Seylers Z. 1940. *Physiol. Chem.* 267, 281—283.
- [112] Tischer J., Hoppe-Seylers Z. 1944. *Physiol. Chem.* 281, 143—145.
- [113] Viala G. 1966. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) ser. D*, 1383—1385.
- [114] Wasiliewa W. E., Piniewicz W. W. 1972. *Fizjolog. Rast.* 12, 1185—1191.
- [115] Weedon B. C. L. 1967. *Pure Appl. Chem.*, 14, 265—278.
- [116] Weedon B. C. L. 1967. *Chem. in Britain*, 3, 424—432.
- [117] Whittle S. J., Casselton P. J. 1969. *Brit. Phycol. J.* 4, 55—64.
- [118] Williams R. J. H., Britton G., Goodwin T. W. 1967. *Biochem. J.*, 105, 99—105.
- [119] Williams R. J. H., Goodwin T. W. 1967. *Phytochemistry*, 6, 1037—1039.
- [120] Withers N., Haxo F. T. 1974. *Plant Sci. Lett.* 5, 7—15.
- [121] Wolk C. P. 1973. *Bacteriol. Rev.*, 37, 32—101.
- [122] Wojciechowski Z. 1972. *Post. Biochem.*, 18, 285—302.
- [123] Yamamoto H. Y., Chichester C. O. 1965. *Biochim. Biophys. Acta* 109, 303—312.
- [124] Yamamoto H. Y., Chichester C. O., Nakayama T. O. M. 1962. *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, 645—648.
- [125] Yamamoto H. Y., Nakayama T. O. M., Chichester C. O. 1962. *Arch. Biochem. Biophys.*, 97, 168—175.