

## La fotosíntesi. Reacció de Hill

### Objectius

- Comprovar que els cloroplasts aïllats, i en presència de llum, tenen la capacitat de reduir una substància, com ara el DCPIP -2,6 diclorofenolindofenol-
- Comprovar que la fase lumínica i la fosca de la fotosíntesi poden dissociar-se una de l'altra.
- Fer servir la tècnica de la centrifugació per separar cloroplasts.

### Introducció

Al 1939, Robin Hill i col·laboradors van demostrar que un preparat de cloroplasts aïllats podia produir oxigen si afegien un compost oxidat capaç d'acceptar els electrons procedents de la fotòlisi de l'aigua. Així, van aconseguir separar les reaccions lluminoses de les reaccions que no depenen de la llum (cicle de Calvin). Es per això que a la fase lumínica també se l'anomena Reacció de Hill.

Per a la reducció del  $\text{CO}_2$  al cicle de Calvin cal un donador d'electrons i ATP. En les cèl·lules, el donador és el NADPH produït durant la fase lluminosa. Recordeu que els electrons transportats a la fase lluminosa són recollits per la Ferredoxina i finalment pel  $\text{NADP}^+$ .

"In vitro", la ferredoxina i el NADP s'investiven com a conseqüència del procés d'aïllament dels cloroplasts; així el compost oxidat afegit fa la seva funció, per no es produeix el cicle de Calvin.

En aquesta experiència una substància acolorida de blau, el DCPIP -2,6 diclorofenolindofenol- pot actuar com a acceptor d'electrons de la fase lumínica i reduir-se, passant a ser incolor.

### Material i Equipament

Equipament	Reactius i altres materials
– Tisores	– <i>Espinacs</i>
– Morter	– <i>Aigua destil·lada</i>
– Sorra	– <i>2,6 diclorofenolindofenol sal sòdica</i>
– Cotó	– <i>(<math>\text{C}_{12}\text{H}_6\text{Cl}_2\text{NnaO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math>) DCPIP</i>
– Centrífuga i 4 tubs de centrífuga	– <i>solució hipertònica (H) (té una tonicitat doble de la de la solució IS)</i>
– Nevera	– <i>solució isotònica (IS)</i>
– Paper d'alumini	

## Procediment

### Aïllament de cloroplasts

Abans de començar la pràctica és convenient mantenir tant els espinacs com el morter, els tubs de centrifuga... a la nevera.

- Seleccionen unes 8 fulles d'espinacs freds (5 o 10 g). Traieu-los els nervis centrals i talleu-les a trossos petits amb les tisores.
- Tritureu els trossos d'espinacs en un morter de vidre (fred) amb una mica de sorra i 50 ml de solució IS durant tres o cinc minuts.
- Filtreu-ho amb una capa fina de cotó. Recolliu el filtrat en un tub d'assaig i repartiu-lo en **dos tubs de centrifuga** (freds).
- Centrifugueu a 1200 RPM durant un minut.
- Decanteu el sobrenedant en dos tubs nous de centrifuga (freds).
- Torneu a centrifugar, ara a 3067 RPM durant 5 minuts.
- Separeu el sobrenedant i el precipitat en tubs diferents i emboliqueu els tubs amb paper de plata, poseu-los en gel. El precipitat contindrà cloroplasts sencers.

### Execució de l'experiència

- Resuspeneu el precipitat d'un dels tubs d'assaig amb 10 ml de la solució IS (isotònica) freda mitjançant un pinzell. Anomeneu el tub com a **tub 1** i guardeu-lo protegit de la llum (amb paper de plata) i en fred.
- Resuspeneu el precipitat de l'altre tub d'assaig amb 5 ml d'aigua destil·lada, espereu 5 minuts i afegiu-hi 5 ml de la solució H (hipertònica). Anomeneu aquest tub com a **tub 2**. Guardeu-lo també protegit de la llum amb paper de plata i en fred.
- Prepareu els tubs que s'indiquen en la taula següent (atenció, llegiu primer l'apartat "Adquisició i enregistrament de dades". Cal començar a enregistrar les dades immediatament després de preparar cadascun dels tubs.

	Contingut	Mantenir en presència de llum (sí/no)
<b>Tub A</b>	5 ml del tub 1	sí
<b>Tub B</b>	5 ml del tub 1 + 3-4 gotes de DCPIP	sí
<b>Tub C</b>	5 ml del tub 2 + 3-4 gotes de DCPIP	no
<b>Tub D</b>	5 ml del tub 2 + 3-4 gotes de DCPIP	sí
<b>Tub E</b>	5 ml del sobrenadant + 3-4 gotes de DCPIP	sí
<b>Tub F</b>	5 ml de la solució A + 3-4 gotes de DCPIP	sí



**Riscos i gestió dels residus: no hi ha cap risc mediambiental ni de salut.**

## Adquisició i enregistrament de dades

En afegir el DCPIP a cadascun dels tubs, agiteu el contingut i comenceu a comptar el temps que triga cada tub a canviar de color (pot ser que algun dels tubs no canviï).

Escriviu els resultats observats en la taula següent:

	Contingut	Mantenir en presència de llum (sí/no)	Color inicial del tub	Color final del tub	Temps que triga a canviar
<b>Tub A</b>	5 ml del tub 1	sí			
<b>Tub B</b>	5 ml del tub 1 + 3-4 gotes de DCPIP	sí			
<b>Tub C</b>	5 ml del tub 1 + 3-4 gotes de DCPIP	no			
<b>Tub D</b>	5 ml del tub 2 + 3-4 gotes de DCPIP	sí			
<b>Tub E</b>	5 ml del sobrenadant + 3-4 gotes de DCPIP	sí			
<b>Tub F</b>	5 ml de la solució A + 3-4 gotes de DCPIP	sí			

## Conclusions

Descriviu i justifiqueu els canvis produïts en els diferents tubs. Potser us ajudarà respondre primer les qüestions proposades a l'apartat següent.

1. Justifiqueu quina pot ser la causa de les diferències observades respecte al canvi de color produït entre els tubs A i B.
2. Descriviu quina és la diferència entre el contingut del tub A i el del tub C (repasseu el procediment que heu seguit en preparar cadascun dels tubs). Quin penseu que pot ser l'estat dels cloroplasts del tub A? I el dels cloroplasts del tub C? Quina penseu que és la causa de l'estat d'aquests cloroplasts? Com podríeu comprovar que la vostra hipòtesi és correcta?
3. Justifiqueu la diferència observada respecte al temps que triga a produir-se el canvi de color entre els tubs A i C.
4. Justifiqueu el resultat obtingut en el tub D.
5. Expliqueu per què hem preparat el tub E.