

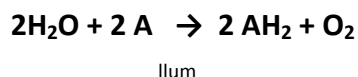
Fotosíntesi-Reacció de Hill

Material pel professorat

Orientacions tècniques i metodològiques

Tradicionalment a les pràctiques es posa de manifest la producció d'oxigen o de midó com a evidència del procés de la fotosíntesi. Es recomanable que els alumnes ja hagin realitzat alguna d'aquestes experiències clàssiques. Tanmateix, en aquesta pràctica es tracta de posar de manifest la reacció de Hill.

La primera evidència experimental que l'absorció de l'energia lumínica indueix un flux electrònic prové del descobriment de R. Hill, en 1937, que el despreniment d'oxigen, dependent de la llum, pot tenir lloc en preparacions sense cèl·lules obtingudes a partir d'organismes fotosintètics. La il·luminació d'aquests preparats que contenen cloroplasts, provocava el despreniment d'oxigen i la reducció simultània d'un acceptor d'electrons, segons l'equació:



on **A** és l'acceptor d'electrons i **AH₂** la forma reduïda. No es precisava de cap donador electrònic diferent de l'aigua. Diferents acceptors electrònics artificials (com colorants reduïbles) es van mostrar capaços d'acceptar electrons (i hidrogen) de l'aigua. I el que és més important, Hill va trobar que no es necessitava diòxid de carboni per a aquesta reacció, ni que aquest fos reduït fins alguna forma estable que s'acumulés, demostrant així que el despreniment d'oxigen i la reducció del diòxid de carboni poden dissociar-se una de l'altra. La reacció resumida en la equació anterior es coneix com a reacció de Hill. Posteriorment es va demostrar que l'acceptor electrònic biològic natural de les plantes verdes és el NADP.

Preparació de les solucions:

Solució hipertònica. Solució A.

Sorbitol	0,66 M	PM = 182,2
MgCl ₂	2 mM	PM = 95,31
MnCl ₂	2 mM	PM = 125,91

En tampó fosfat 100 mM

Càlculs per preparar 100 ml de solució A:

- **Sorbitol 0,66 M**

100 ml. 0,66 m /1000 ml. 182,2 g/1 m = **12,03 g**

- **MgCl₂ · 6 H₂O** PM sal= 95,31
 PM sal hidratada= 203,31

100 ml. $2 \cdot 10^{-3}$ mol sal/1000 ml. 1 mol sal.hidr/1 mol sal. 203,31 g/1 m sal hydr = **0,04 g**

- **MnCl₂ · 4 H₂O** PM sal = 125,91
 PM sal hidratada= 197,91

100 ml. $2 \cdot 10^3$ mol sal/ 10^3 ml . 1 mol sal hydr/ 1 mol sal . 197,91/1 m sal hydr = 0,0396
 = **0,04 g**

Tampó fosfat 100 mM

Solució 1: NaH₂PO₄ · H₂O (0,2 M) PM=137,99 g/m

Solució 2: NaH₂PO₄ (0,2 M) PM=141,96 g/m

X ml Sol 1 + y ml Sol 2 segons el pH

pH 7,9 4,2 ml Sol 1 + 45,8 ml Sol 2 + portar a 100 ml amb H₂O destil·lada

Sol 1: 50 ml . 0,2 m/10³ ml . 1 mol NaH₂PO₄ · H₂O / 1 mol NaH₂PO₄ . 137,99 g/ 1 mol sal hydr= **1,38 g**

Sol 2: 100 ml . 0,2 m/10³ ml . 141,96 g/ 1 mol NaH₂PO₄ = **2,84 g**

Per tant, Sol 1: 1,38 g de NaH₂PO₄ · H₂O en 50 ml
 Sol 2: 2,84 g de NaH₂PO₄ en 100 ml

Si volem, es pot preparar un 4x (400 ml). Es pot guardar a ña nevera durant mesos, caldrà diluir-ho ¼ abans del seu ús.

Sol A- 50 ml. 0,4 m/10³ ml. 1 mNaH₂PO₄·H₂O/ 1mol NaH₂PO₄. 137,99/1 mol sal h = **2,76 g**

Sol B-200 ml. 0,4 m/10³ ml . 141,96 g/1 mol NaH₂PO₄ = **11,36 g**

2,76 g A en 50 ml
 11,36 g B en 200 ml

16,8 ml sol A + 183,2 ml sol B diluir amb 200 ml d'aigua destil·lada

Solució isotònica. Solució B.

Solució A : H₂O destil·lada = 1:1



Advertiments sobre els riscos i la gestió dels residus: no hi ha cap risc mediambiental ni de salut

Conclusions

Resultats esperats

	Contingut	Mantenir en presència de llum (si/no)	Color inicial del tub	Color final del tub	Temps que triga en canviar
Tub A	2 ml del tub 1 + 5 ml de DCPIP	si	blau	verd	T_1
Tub B	2 ml del tub 1 + 5 ml de DCPIP	no	blau	blau, sense canvis	
Tub C	2 ml del tub 2 + 5 ml de DCPIP	si	blau	verd	$T_2 (< T_1)$
Tub D	2 ml del sobrenadant + 5 ml de DCPIP	si	blau	blau, sense canvis	
Tub E	2 ml de la solució A + 5ml de DCPIP	si	blau	blau, sense canvis	

Respostes al qüestionari

1. Justifiqueu quina pot ser la causa de les diferències observades respecte el canvi de color produït entre els tubs A i B.

El tub B no ha estat il·luminat, per tant no ha tingut lloc el flux d'electrons que determina la reducció del DCPIP i, en conseqüència, la seva decoloració.

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?

Els cloroplasts del tub A han estat sempre en contacte amb solució isotònica, per tant és d'esperar que estiguin intactes. Tanmateix, els del tub C van estar uns minuts en contacte amb aigua destil·lada (tot i que després ens assegurem que el contingut final sigui el mateix que el del tub A), cosa que podem suposar ha causat el trencament, per xoc osmòtic, de tots els cloroplasts.

Per comprovar la hipòtesi del trencament dels cloroplasts, la forma més senzilla és fer una observació al microscopi.

3. Justifiqueu la diferència observada respecte al temps que triga en produir-se el canvi de color entre els tubs A i C.

L'absència de membrana o, millor dit, el trencament de la mateixa en els cloroplasts del tub C, permet una reducció del colorant més ràpida degut a la major accessibilitat dels enzims amb l'acceptor d'electrons (el DCPIP).

4. Justifiqueu el resultat obtingut en el tub D.

Si el centrifugat serveix per precipitar els cloroplasts, és normal que en el tub D, en no haver cloroplasts no es produeixi la reducció del DCPIP degut a la falta dels enzims apropiats.

5. Expliqueu per què hem preparat el tub E.

El tub E és una prova control, serveix per excloure la possibilitat que la reducció del DCPIP sigui deguda a una altra causa diferents dels enzims dels cloroplasts.

6. Quina substància fa de manera natural en les plantes verdes el paper que aquí fa el DCPIP?

El NADP.

Propostes de recerca

Es pot ampliar la pràctica estudiant com influeixen diferents variables en la velocitat de reducció del DCPIP. Per exemple, es pot comprovar l'efecte de diferents intensitats de llum, o l'efecte de diferents "qualitats" de llum, cosa que aconseguirem superposant un filtre de color (vermell, groc,...) entre la font de llum i el tub d'assaig amb els cloroplasts.

També es pot comprovar l'efecte de la quantitat de cloroplasts (simplement diluint l'extracte de cloroplasts), o comparar la velocitat de reducció del DCPIP de cloroplasts de plantes diferents.

És interessant observar cloroplasts al microscopi.