



Fotosyntese hos spinat

Baseret på side 212-224

Formål

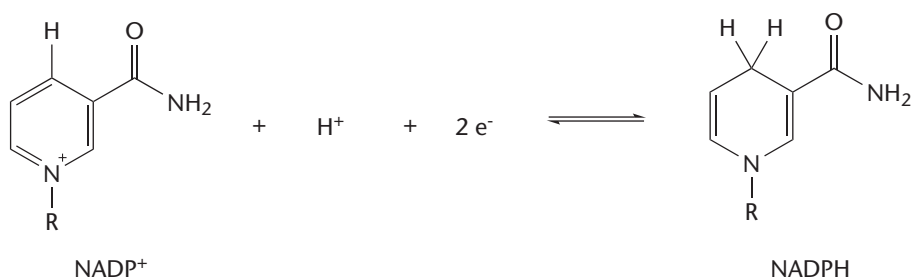
At undersøge om lys og kogning af spinatekstrakt påvirker fotosyntesen.

At sammenligne hastigheden af fotosyntesen under forskellige lysbetingelser.

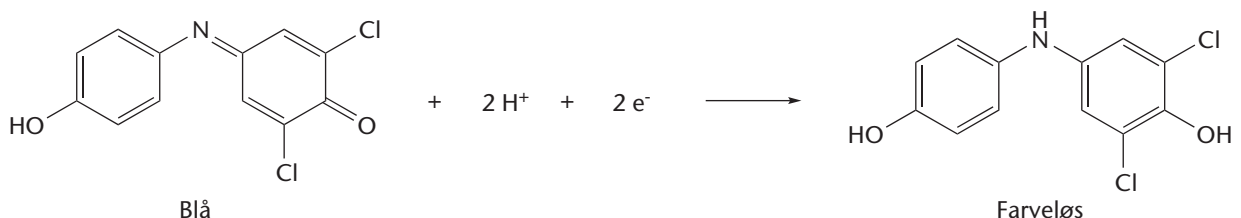
Teori

Fotosyntesen består af to delprocesser som begge sker i chloroplasterne. Den lysafhængige proces hvor lysenergi omdannes til kemisk energi i form af de energiholdige stoffer ATP og NADPH, og den lysuafhængige proces, Calvin cyklus, hvor energien fra ATP og NADPH anvendes til at opbygge glucose ud fra carbondioxid.

I den lysafhængige proces reduceres coenzymet NADP^+ til det energirige NADPH:



Det er denne delreaktion af fotosyntesen som undersøges i dette eksperiment. I eksperimentet anvendes et blå farvestof (2,6-dichlorphenol-indophenol eller forkortet DCPIP) som erstatning for coenzymet NADP^+ . Når den lysafhængige proces sker, bliver den oxiderede blå form af DCPIP reduceret til en farveløs form:



Farveændringen kan følges vha. spektrofotometri, og den giver et mål for hastigheden af fotosyntesen. Jo hurtigere farveændringen sker, jo højere er hastigheden af fotosyntesen. Hastigheden af fotosyntesen bestemmes som ændringen i absorbans i et bestemt tidsrum:

$$v = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$



Forarbejde

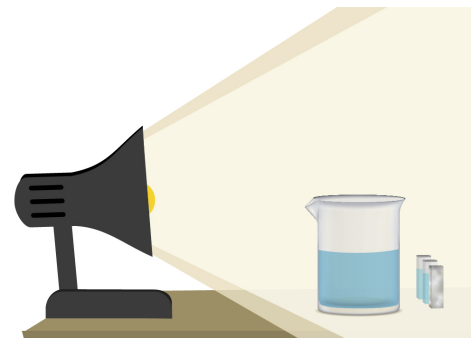
1. Argumentér for hvorfor DCPIP kan erstatte NADP^+ i de lysafhængige reaktioner.
2. Forklar hvorfor det er vigtigt at DCPIP som anvendes i eksperimentet, er opløst i phosphatpuffer.
3. Forklar hvorfor spinatchloroplasterne som anvendes i eksperimentet, er opslæmmet i en opløsning af sucrose.
4. Argumentér for at DCPIP har absorptionsmaksimum ved en bølgelængde på ca. 600 nm, og forklar hvorfor forsøget netop udføres ved denne bølgelængde.
5. Skriv hypoteser for de tre delforsøg.

Materialer

- Spektrofotometer / kolorimeter
- Tre kuvetter med låg
- Alufolie
- Kraftig lyskilde
- Stopur
- Engangspipetter
- 100 mL bægerglas med is
- Opløsning af DCPIP i phosphatpuffer
- Opblækning af spinatchloroplaster i en vandig opløsning af sucrose (ca. 1 mL i et eppendorfrør til hver gruppe)
- Opblækning af kogte spinatchloroplaster i en vandig opløsning af sucrose (ca. 1 mL i et eppendorfrør til hver gruppe)

Fremgangsmåde

1. Et spektrofotometer / kolorimeter med tilhørende dataopsamlingsprogram klargøres.
2. Kalibrér spektrofotometeret /kolorimetret ved 635 nm med en kuvette med demineraliseret vand.
3. Fyld et 1 L bægerglas/kasse med vand og opstil en lyskilde som vist på figur 2. Tænd ikke for lampen endnu. Bægerglasset vil fungere som varmeskjold og beskytte chloroplasterne mod varme fra lyskilden.
4. Hent to eppendorfrør med en opblækning af hhv. ukogte og kogte chloroplaster og placér dem i et 100 mL bægerglas med is.
5. Tilsæt 2,5 mL DCPIP/phosphatpuffer-opløsning til hver af de 3 kuvetter.
6. Mærk to engangspipetter med hhv. K(kogt) og U(ukogt). Genopslæk chloroplasterne vha. engangspipetterne.



Figur 2. Forsøgsopstilling.

Illustration: Lotte Thorup



7. Til hver af de 3 kuvetter tilsættes så hurtigt som muligt følgende:
 - 3 dråber **ukogte** chloroplaster. Sæt låg på kuvetten og bland indholdet.
Forsøg at undgå bobler.
 - 3 dråber **ukogte** chloroplaster. Sæt låg på kuvetten og bland indholdet.
Forsøg at undgå bobler. Pak kuvetten ind i alufolie så chloroplasterne er i **mørke**.
 - 3 dråber **kogte** chloroplaster. Sæt låg på kuvetten og bland indholdet.
Forsøg at undgå bobler.
8. Placer de 3 kuvetter foran lyskilden som vist på figur 2. Markér kuvetternes positioner så de igennem hele eksperimentet placeres på de samme steder.
9. For hver af de 3 kuvetter måles absorbansen til tiden = 0. Før måling af absorbansen for kuvetten i mørke fjernes alufolien, og den sættes igen på efter måling. Straks efter måling genplaceres kuvetterne på deres plads foran lyskilden.
10. Tænd nu lyskilden og mål absorbansen hvert 5. minut. Notér sammenhængende værdier i skemaet under resultater.

Resultater

Tid (min)	Absorbans af DCPIP målt ved 635 nm		
	Ukøgt (lys)	Ukøgt (mørke)	Køgt (lys)

Diskussion

1. Tegn i samme koordinatsystem absorbansen som funktion af tiden for hvert af de 3 delforsøg.
2. Beregn fotosyntesehastigheden for hver af de tre delforsøg.
3. Argumentér for om chloroplasterne var i stand til at reducere DCPIP.
4. Forklar hvilken betydning det havde for fotosyntesehastigheden at chloroplasterne var i mørke eller kogte?
5. Diskutér fejlkilder i eksperimentet.
6. Hvad kan der konkluderes om fotosynteseaktiviteten hos spinat? Er eksperimentets formål opfyldt?



Lærervejledning til eksperimentet Fotosyntese i spinat

Fremstilling af opløsninger

0,5 M sucrose(aq)

Afvej 34,2 g sucrose og overfør det til en 200 mL målekolbe. Tilsæt demineraliseret vand til stregen og omryst til opløsningen bliver homogen.

Phosphatpuffer

Fremstil først en opløsning af hhv. kaliumhydrogenphosphat og kaliumdihydrogenphosphat. De to opløsninger fremstilles således:

Afvej 8,7 g K_2HPO_4 og overfør det til en 50 mL målekolbe. Tilsæt demineraliseret vand til stregen og omryst til opløsningen bliver homogen.

Afvej 13,6 g KH_2PO_4 og overfør det til en 100 mL målekolbe. Tilsæt demineraliseret vand til stregen og omryst til opløsningen bliver homogen.

Bland nu de to opløsninger så der dannes en puffer med pH 6,5. Afmål i måleglas 68,5 mL KH_2PO_4 og overfør det til en 1 L målekolbe. Afmål ligeledes 31,5 mL K_2HPO_4 og overfør det til samme målekolbe. Omryst kolben til opløsningen bliver homogen. Tjek pH-værdien og juster evt.

Opløsning af DCPIP

Afvej 0,072 g DCPIP og overfør det til en 1 L målekolbe. Tilsæt demineraliseret vand til stregen og omryst kolben til opløsningen bliver homogen. Opbevar opløsningen i en mørk flaske i køleskabet.

DCPIP/phosphatpuffer-opløsning

Fremstilles umiddelbart før forsøget ved at blande følgende i en 250 mL konisk kolbe:

- 50 mL DCPIP(aq)
- 50 mL phosphatpuffer
- 150 mL demineraliseret vand

Chloroplastsuspension

1. Anbring en pose med friske spinatblade i lyset i et par timer. De skal forblive kolde og hydrerede selvom de ligger i lyset.
2. Hæld den vandige opløsning af sucrose i en blender så knivene er dækket.
3. Tryk spinatblade godt ned i blenderen indtil de er tre centimeter over knivene.
4. Blend spinatbladene i 3 x 10 sek. Vent 30 sek. mellem hver omgang.
5. Filtrér spinat-blandingen igennem et osteklæde over i et bægerglas. Sæt bægerglasset på is.
6. Fordel chloroplastsuspensionen i to lige store dele, a og b.



7. Test om suspensionen har en passende koncentration ved at tilsætte DCPIP til suspensionen som beskrevet i øvelsesvejledningen. Hvis DCPIP reduceres for hurtigt, skal suspensionen fortyndes.
8. Chloroplastsuspension a fordeles i eppendorfrør – 1 mL pr. rør er passende, og der skal anvendes et eppendorfrør pr. gruppe. Rørene skal enten tapes med sort tape eller placeres i en skumgummi-rack så der ikke kommer lys igennem. Placér eppendorfrørene på is.
9. Chloroplastsuspension b koges i 5 min. Herefter fordeles den kogte suspension på samme måde som i 8).