

## Chemische Produkte zur Hill Reaktion



### 1. Produktpräsentation

#### 1.1 Pädagogische Zielsetzung

- eigenständige Versuchsdurchführung durch Schüler
- Hervorhebung der Notwendigkeit von Licht für Chloroplasten sowie eines Elektronenakzeptors in der Lichtreaktion (1. Phase) der Fotosynthese.
- Konkretisierung bestimmter Begriffe bzw. Aufzeigen bestimmter Problematiken:
  - Notwendigkeit wenigstens eines Elektronenakzeptors bei der Fotosynthese
  - reduzierter Elektronenakzeptor/ Reduktionsäquivalent
  - Reduktionsvermögen
  - Umwandlung der Lichtenergie in chemische Energie.

#### 1.2 Inhalt

- 1 Flasche (TRIS-Saccharose-Puffer) (Säureinaktivierung durch Destruktion von Enzyme)
- 1 Flasche Phosphat-Saccharose-Puffer (optimiert den pH-Wert optimal)
- Je 1 Flasche "Hill-Reagenz 1" und "Hill-Reagenz 2" (Durch Zusammenfügen der beiden Reagenzien ergibt sich das Hill-Reagenz, das einen Elektronenakzeptor enthält und das natürliche NADP ersetzt, welches bei der Zerkleinerung zerstört wird:



## 2. Vorbereitung

### 2.1 Materialien

Frische Blätter grüner Pflanzen wie beispielsweise von Lilien (beim Blumenhändler zu erwerben) oder von Spinat (hier sollte zuvor die Art der Konservierung geprüft werden) Mörser und Stößel einige Stunden zuvor in das Eisfach des Kühlschranks stellen sowie Eiswürfel bereitstellen.

### 2.2 Lösungen

#### a) Vorbereitung des TRIS-Saccharose-Puffers

Nach Zugabe von 25 ml destilliertem Wasser in die Flasche "TRIS-Saccharose" wird diese geschüttelt und in den Kühlschrank gestellt.

#### b) Vorbereitung des Phosphat-Saccharose-Puffers

Zur Flasche "Phosphat Saccharose" werden 100 ml destilliertes Wasser hinzugegeben, geschüttelt und in den Kühlschrank gestellt.

#### c) Vorbereitung des Hill-Reagenz (erst kurz vor der Verwendung!)

In die Flasche "Hill-Reagenz 1" werden zunächst 10 ml destilliertes Wasser, dann der Inhalt der Flasche "Hill-Reagenz 2" hinzugegeben und anschließend geschüttelt.

### 2.3. Vorbereitung der Suspension

- Die Blattspreiten der sauberen Blätter in kleine Stücke schneiden, in einen Mörser geben und in einer Schüssel mit Eiswürfeln kühlen
- Zugabe von 3-10 ml TRIS-Saccharose-Puffer
- Zwei Minuten mit dem Pistill zerreiben
- Zugabe von 20-40 ml Phosphat-Saccharose-Puffer (folgend der gewünschten zu erhaltenden Menge) und wenigstens eine weitere Minute weiter zerkleinern
- Durch Gaze oder Filterpapier in einen kalten Becher filtrieren
- Abtropfen lassen und den Filter vorsichtig auswringen
- Mazerat gekühlt aufbewahren

Anmerkung: Die Lösung kann einige Minuten bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden, im Kühlschrank sogar einige Stunden.

## 3. Versuchsdurchführung

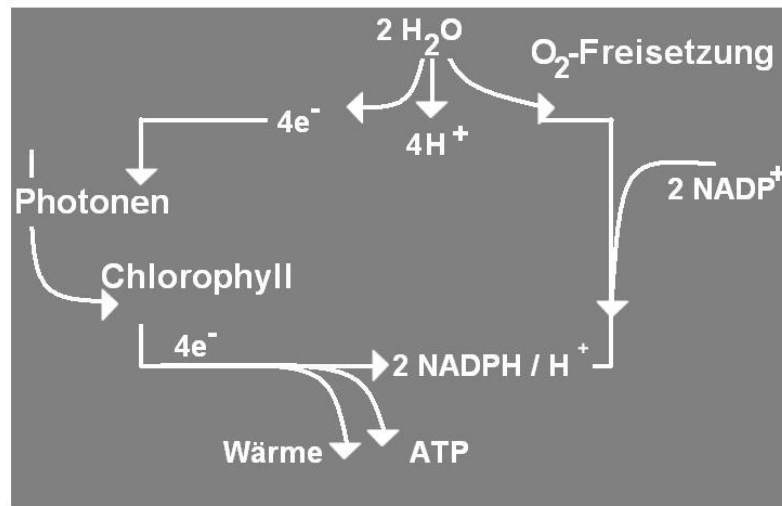
### 3.1 Bezug zu Unterrichtsinhalten

- Oberstufe: Energiefluss und Stoffkreisläufe auf Ebene der Ökosysteme und Biosphäre
- Assimilation energiereicher Verbindungen
- Umwandlung der Strahlungsenergie in chemische Energie bei Chlorophyll besitzenden Organismen

### 3.2 Versuchsprinzip

Die Umwandlung von Lichtenergie in ATP in den Chloroplasten von Chlorophyll-bildenden Pflanzen ist der erste Schritt zum Aufbau organischer Moleküle. Die Lichtenergie wird hierbei durch Chlorophyll-Pigmente in den Thylakoid-Membranen der Chloroplasten aufgefangen, Die Photonenabsorption bedingt einen Wechsel des energetischen Zustandes von Chlorophyll. Selbiges wird aktiviert, Wasser wird oxidiert und die Elektronen werden im Laufe mehrerer Abschnitte zu dem Akzeptor NADP<sup>+</sup> geleitet.

Die Übertragung von Elektronen aus Wasser (Redoxpotential = 0,81 V) auf NADP<sup>+</sup> (Redoxpotential = 0,32 V) kann nicht spontan erfolgen, sondern wird durch Lichtenergie veranlasst.



*Anmerkung:*

NADP ist ein nativer biochemischer Elektronenakzeptor, der diesem Versuch durch einen künstlichen Elektronenakzeptor ersetzt wird: Kaliumhexacyanoferrat (III)

Nach Zugabe der zerkleinerten Blätter (Chloroplasten, Mitochondrien) in den Cytoreaktor erfolgt die Messung der unterschiedlicher Sauerstoffraten mit einem klassischen Oxymeter oder mit einem automatischen Erfassungssensor ExAO. Notwendigerweise sollte die Funktion "% O<sub>2</sub>, Luxmeter, Temperatur" der EXABIO-Software sowie entsprechende Sensoren genutzt werden. Den Anweisungen auf dem Bildschirm und der allgemeinen Anleitung (SMF 10, Software und Sensoren) ist Folge zu leisten um die Messung mit diesem Gerät durchführen zu können.

Das zerkleinerte Material kann sowohl unter Zugabe verschiedener Einfluss-nehmender Reagenzien als auch alleinig im Licht oder in der Dunkelheit aufbewahrt werden (Hill-Reagenz = Elektronenakzeptor, organisches Gift).

### 3.3 Benötigte Materialien

Cytoreaktor (z.B. [201.3701](#))

Zylinder zum Abdunkeln (z.B. [201.3702](#))

Oxymeter oder automatischer Erfassungssensor ExAO (z.B. [202.2018](#))

Sensor "Sauerstoffsonde" (z.B. [200.1538](#))

Sensor "Thermometer" (fakultativ) (z.B. [201.5229](#))

Sensor "Luxmeter" (z.B. [100.3647](#))

Magnetrührer oder Magnetstab (z.B. [201.5140](#))

Kaltlichtquelle oder klassische IOOW-Lampe (z.B. [103.5294](#))

Wasserpumpe (fakultativ)

Mörser und Stößel

Eis

Scheren

Mulltücher und Filtersystem

Glaswaren

### 3.4 Montage

- Der Cytoreaktor wird in diesem Fall ohne Deckel benutzt um die Dunkelheitsvorrichtung anbringen zu können.
- Das Zentralfach des Bioreaktors soll vollständig mit dem vorbereiteten Extrakt aufgefüllt sein.
- Der Zylinder zum Abdunkeln wird so auf dem Cytoreaktor platziert, dass der Inhalt komplett gegen Licht abgedichtet ist.
- Die (zuvor geeichte!) Sauerstoff-Sonde wird in den Gummi-Einlass im Mantel des Bioreaktors eingeführt.
- Schließen des Bioreaktors
- Ein Übermaß an Flüssigkeit wird entfernt (es sollte so wenig Luft wie möglich eingeschlossen sein).
- Vergewissern Sie sich, dass der Zylinder zum Abdunkeln abgenommen und wieder platziert werden kann, ohne dass der Deckel mit der Sauerstoff-Sonde berührt wird.
- Die Probe wird unter den Magnetrührer gestellt.
- Anschalten des Rührers. Alternativ kann vorab ein Rührstab in den Mantel des Bioreaktor eingeführt werden
- Die Lichtquelle wird in die unmittelbare Nähe der Reaktorwand gebracht, oder - sofern es sich um eine klassische Lampe handelt - in 20-30 cm Entfernung.
- Das Luxmeter platzieren.
- Fakultativ: Wasser um den Reaktor zirkulieren lassen um die Temperatur konstant zu halten (unverzichtbar für den Fall, dass die Lampe zu einer Erwärmung führt!). Eventuell eine Temperatur-Sonde benutzen.

*Anmerkung:*

Bevor der Versuch begonnen wird, muss die Sauerstoff-Sonde eingestellt und geeicht werden. Beziehen Sie sich dafür auf die Anleitung der Sonde und der Software.

### 3.5 Versuchsprotokoll

- T=0 bis T'= 5-8 min: Die Vorrichtung zur Verdunklung wird benutzt. Der Sauerstoffgehalt fällt aufgrund der Zellatmung.
- T= 5-8 min bis T= 10-15 min: Belichten der Einrichtung. Die Sauerstoff-Rate fällt weiterhin. Die Lichtmenge reicht noch nicht aus, um eine Photosynthese in Gang zu bringen (oder die Zellatmung ist zu diesem Zeitpunkt noch größer als das der Photosynthese).
- T= T15 min oder zu einem gewünschten Zeitpunkt, wird eine Dosis Hill-Reagenz injiziert (0,3 bis 1ml).

*Anmerkung:*

Das Hill-Reagenz sollte nicht zu schnell injiziert werden, weil sich die Druckänderung auf das Oxymeter auswirkt. Nun kann das Wiederansteigen der Sauerstoff-Rate beobachtet werden. Das Hill-Reagenz ermöglicht die Lichtreaktion der Photosynthese, da sie als Elektronenakzeptor dient. Wenn keine Änderung erfolgt, sollte eine weitere Dosis injiziert werden. Ein Tropfen des Extraktionssafts kann unter dem Mikroskop betrachtet werden um die Anwesenheit von Chloroplasten nachzuweisen.

### 3.6 Ergebnisse des Versuchs

