

## Versuchsprotokoll

### *1.) Versuch 1d: Bestimmung der photochemischen Aktivität isolierter Chloroplasten mit der Sauerstoffelektrode*

#### **1.1. Einleitung:**

Bei der Isolierung von Chloroplasten erhält man hauptsächlich sogenannte aufgebrochene Chloroplasten, die ihre Doppelmembran ganz oder teilweise verloren haben.

Somit sind diese Chloroplasten für von außen zugesetzte Substanzen zugänglich.

Außerdem haben diese Chloroplasten die Enzyme der CO<sub>2</sub>-Fixierung ganz und das NADP<sup>+</sup> sowie das membrangebundene Ferredoxin zu einem großen Teil verloren. Die in der Membran verankerten Multienzymkomplexe (PS I, PS II, LHC I, LHC II, etc.) bleiben jedoch erhalten.

Sie sind somit zu einem Elektronentransport und einer Sauerstoffproduktion bei Beleuchtung nur dann fähig, wenn man Elektronenakzeptoren von außen zusetzt.

Die verwendeten künstlichen Elektronenakzeptoren werden als Hill-Reagenzien bezeichnet (nach Robert Hill, der die photosynthetische Sauerstoffentwicklung als erster nachweisen konnte).

Außer mit Elektronendonatoren kann man noch mit Hemmstoffen und Elektronenakzeptoren in die Elektronentransportkette eingreifen.

In diesem Versuch wird die photochemische Aktivität isolierter, osmotisch aufgebrochener Chloroplasten als Ferricyanid-Hillreaktion gemessen. Das Hillreagenz Ferricyanid (= Kaliumhexacyanoferrat(III), K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) übernimmt die Elektronen nach dem Photosystem I, wobei Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup> reduziert wird.

Als Sauerstoffelektrode wird hier die sogenannte Clark-Elektrode verwendet. Man misst hiermit Sauerstoff in Flüssig- und Gasphasen nach einem amperometrischen Verfahren.

Der sauerstoffabhängige Strom wird über einen Widerstand in eine Spannung umgesetzt, die dann als Signal auf einen Schreiber übertragen wird.

#### **1.2. Material und Methode:**

Der Versuch wurde nach der Anleitung im Skript durchgeführt.

Als Erstes wurde die Sauerstoffproduktion in Abhängigkeit von der Lichtintensität gemessen. Des Weiteren wurde die Reaktion des Systems auf einen Entkoppler (Ammoniumsalz) und ein Herbizid (DCMU) getestet.

Als Letztes wurde die Chlorophyllkonzentration hergestellten Thylakoidsuspension photometrisch bestimmt.

#### **1.3. Versuchsergebnisse:**

1. Sauerstoffproduktion in Abhängigkeit der Lichtintensität

Graufilter 0 (100% Lichtdurchlässigkeit) : 3,5 Skalenteile/min = 09,52 μmol O<sub>2</sub>/min

Graufilter 1 (068% Lichtdurchlässigkeit) : 5,0 Skalenteile/min = 13,60 μmol O<sub>2</sub>/min

Graufilter 2 (054% Lichtdurchlässigkeit) : 4,5 Skalenteile/min = 12,24 μmol O<sub>2</sub>/min

Graufilter 3 (028% Lichtdurchlässigkeit) : 3,5 Skalenteile/min = 09,52 μmol O<sub>2</sub>/min

Graufilter 4 (011% Lichtdurchlässigkeit) : 2,5 Skalenteile/min = 06,80 μmol O<sub>2</sub>/min

Graufilter 5 (006% Lichtdurchlässigkeit) : 1,5 Skalenteile/min = 04,08 μmol O<sub>2</sub>/min

1 Skalenteil = 2,72 μmol O<sub>2</sub>

Umrechnung auf  $\mu\text{mol O}_2/\text{h}$ :

Graufilter 0:  $09,52 \mu\text{mol O}_2/\text{min} = 571,2 \mu\text{mol O}_2/\text{h}$

Graufilter 1:  $13,60 \mu\text{mol O}_2/\text{min} = 816,0 \mu\text{mol O}_2/\text{h}$

Graufilter 2:  $12,24 \mu\text{mol O}_2/\text{min} = 734,4 \mu\text{mol O}_2/\text{h}$

Graufilter 3:  $09,52 \mu\text{mol O}_2/\text{min} = 571,2 \mu\text{mol O}_2/\text{h}$

Graufilter 4:  $06,80 \mu\text{mol O}_2/\text{min} = 408,0 \mu\text{mol O}_2/\text{h}$

Graufilter 5:  $04,08 \mu\text{mol O}_2/\text{min} = 244,8 \mu\text{mol O}_2/\text{h}$

### **Chlorophyllkonzentration in der Suspension:**

Gemessene Extinktionen:

664nm = 0,565

647nm = 0,277

750nm = 0

$\text{Chl a (mg} \cdot \text{l}^{-1}) = 11,78 \times 0,565 - 2,29 \times 0,277 = 6,02137 \text{ mg/l}$

$\text{Chl b (mg} \cdot \text{l}^{-1}) = 20,05 \times 0,277 - 4,77 \times 0,565 = 2,85881 \text{ mg/l}$

$\text{Chl a} + \text{Chl b} = 8,88017 \text{ mg/l}$

Die Verdünnung in der Küvette muss ebenfalls beachtet werden:

$5000\mu\text{l Aceton} + 50\mu\text{l Thylakoidsuspension} = 5050\mu\text{l Lösung}$ , also entspricht das Verhältnis einer Verdünnung von 101:1.

$8,88017 \text{ mg/l} \times 101 = \underline{896,897 \text{ mg/l}}$

### **Chlorophyllkonzentration in der Elektrodenkammer:**

Hier herrscht ein Verdünnungsverhältnis von 22:1, daher die folgende Berechnung:

$(896,897 / 22) \text{ mg/l} = \underline{40,77 \text{ mg/l}}$

Graufilter 0:  $571,2 \mu\text{mol O}_2/\text{h} / 40,77 \text{ mg/l} = 14,01 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Chl} \cdot \text{h}^{-1}$

Graufilter 1:  $816,0 \mu\text{mol O}_2/\text{h} / 40,77 \text{ mg/l} = 20,01 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Chl} \cdot \text{h}^{-1}$

Graufilter 2:  $734,4 \mu\text{mol O}_2/\text{h} / 40,77 \text{ mg/l} = 18,01 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Chl} \cdot \text{h}^{-1}$

Graufilter 3:  $571,2 \mu\text{mol O}_2/\text{h} / 40,77 \text{ mg/l} = 14,01 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Chl} \cdot \text{h}^{-1}$

Graufilter 4:  $408,0 \mu\text{mol O}_2/\text{h} / 40,77 \text{ mg/l} = 10,00 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Chl} \cdot \text{h}^{-1}$

Graufilter 5:  $244,8 \mu\text{mol O}_2/\text{h} / 40,77 \text{ mg/l} = 06,00 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Chl} \cdot \text{h}^{-1}$

### **Produktionsraten in Abhängigkeit von der Lichtintensität:**

100% = 90,0 W/m<sup>2</sup>

028% = 25,2 W/m<sup>2</sup>

068% = 61,2 W/m<sup>2</sup>

011% = 12,2 W/m<sup>2</sup>

054% = 48,6 W/m<sup>2</sup>

006% = 05,4 W/m<sup>2</sup>

**Sauerstoffproduktion in Abhängigkeit von einem Entkoppler (Ammoniumsalz):**

Graufilter 0 (100% Lichtintensität) : 12 Skalenteile/min

$$= 1958,4 \mu\text{mol O}_2/\text{h} / 40,77 \text{ mg/l} = \underline{48,035 \mu\text{mol} * \text{mg}^{-1} \text{ Chl} * \text{h}^{-1}}$$

**Sauerstoffproduktion in Abhängigkeit von einem Herbizid (DCMU):**

Graufilter 0 (100% Lichtintensität) : 0 Skalenteile/min

**1.4. Auswertung:**

Die oben aufgezeigten Versuchsergebnisse zeigen deutlich, dass bei höherer Lichtintensität eine größere Sauerstoffproduktion stattgefunden hat. Eine Ausnahme stellt hier die Lichtintensität von 100%. Dies lässt sich folgendermaßen erklären. Bei einer Lichtintensität von 100% ist eine zu hohe Temperatur da. Dadurch werden die Enzyme, die bei der Photosynthese benötigt werden, gehemmt. Somit ist ein Optimum der Photosyntheserate bei 100% Lichtintensität nicht möglich. Das Optimum liegt hier also bei den 68%.

Bei Zugabe von Methylammoniumchlorid (MAC), das hier als Entkoppler wirkt, steigt die Photosyntheserate ungemein an. Das System verfügt über selbst regulierende Fähigkeiten. Durch den Entkoppler werden Membrandurchgänge geöffnet, durch die die Protonen den Innenraum verlassen können. Somit wird der Protonengradient abgebaut. Somit verschiebt sich das chemische Gleichgewicht und die Photosynthese bzw. der Elektronentransport läuft schneller ab, um den Protonenmangel auszugleichen. Als Resultat erhöht sich auch die Sauerstoffproduktion.

Bei dem DCMU (Herbizid) ist keine Sauerstoffproduktion feststellbar, da DCMU den natürlichen sekundären PSII-Akzeptor Q<sub>b</sub> von seiner Bindestelle am D1 Protein (P680) verdrängt und so den linearen Elektronentransport hemmt.

*2.) Versuch 1e: Hill-Reaktion isolierter Chloroplasten mit DCPIP*

**2.1. Einleitung:**

Bei diesem Versuch wird der Chloroplastensuspension der blaue Farbstoff Dichlorphenolindophenol (DCPIP) zugesetzt.

DCPIP wird am Plastochinon reduziert und dadurch farblos.

Hemmt man jetzt die Elektronentransportkette an der Reaktion vom Plastochinon zum Plasto-hydrochinon durch das Herbizid DCMU kann DCPIP nicht mehr reduziert werden.

Dementsprechend bleibt auch die Entfärbung aus.

## 2.2. Material und Methode:

Der Versuch wurde nach der Anleitung im Skript durchgeführt.

Färbung der Reagenzgläser vor Versuchsbeginn:

Reagenzglas 1: blaugrün  
Reagenzglas 2: blaugrün  
Reagenzglas 3: blaugrün  
Reagenzglas 4: grün

## 2.3. Versuchsergebnisse:

Nach Belichtung der Reagenzgläser war folgende Färbung zu erkennen:

Reagenzglas 1:	(Dunkelkontrolle), keine Veränderung nach Belichtung, dunkelgrün bis bläulich
Reagenzglas 2:	keine Veränderung nach Belichtung, dunkelgrün bis bläulich, wie RG 1
Reagenzglas 3:	Farbe, der Lösung in Reagenzglas 4 angenommen = grün
Reagenzglas 4:	gleich geblieben (grün)

## 2.4. Auswertung:

Bei Reagenzglas 1 (mit DCPIP) tritt keine Veränderung ein, da kein Licht vorhanden ist. In Reagenzglas 2 (mit DCPIP, DCMU) kann es zu keiner Veränderung kommen, da der Elektronentransport durch DCMU gehemmt ist, und DCPIP somit nicht reduziert werden kann. Reagenzglas 3 (mit DCPIP) färbt sich grün, da DCPIP durch den photosynthetisch bedingten Elektronentransport reduziert wird (farblos).  
Reagenzglas 4 behält seine Farbe, da nur Chloroplastensuspension vorhanden ist.

## 3.) Versuch If: Nachweis des bei der Photosynthese entstehenden Sauerstoffs

### 3.1. Einleitung:

In diesem Versuch wird der bei der Photosynthese entstehende Sauerstoff durch eine chemische Reaktion nachgewiesen.

Der reduzierte gelbe Farbstoff Indigocarmin wird durch den entstehenden Sauerstoff zu blauem Indigocarmin (= 5,5'-Natriumindigosulfat) oxidiert.

### 3.2. Material und Methode:

Der Versuch wurde nach der Anleitung im Skript durchgeführt.

Als Versuchsobjekt diente hier die Wasserpest (Elodea).

### 3.3. Versuchsergebnisse:

Die Lösung in dem Glas, in dem sich die Wasserpest befand, wechselte Ihre Farbe in der Umgebung der Pflanze von Gelb nach Blau.

Im Kontrollglas war keine Veränderung festzustellen.

### 3.4. Auswertung:

Die Farbveränderung des Indigocarmins beruht auf der Oxidation des Farbstoffes. Der bei der Photosynthese entstehende Sauerstoff oxidiert das gelbe Indigocarmin zu der blauen Form (5,5'-Natriumindigosulfat).

## 4.) Versuch 1g: Photoreduktion von Methylrot durch Chlorophyll

### 4.1. Einleitung:

Durch Beleuchtung wird das Pigment P680 im Photosystem II angeregt und erreicht so ein stark negatives Redoxpotential. Damit ist es in der Lage seine Elektronen an die nachfolgenden Redoxpartner abzugeben, welche durch die Elektronenaufnahme reduziert werden. Die dadurch entstehende Elektronenlücke beim P680 wird mit den Elektronen aus der Photolyse des Wassers wieder geschlossen.

Diese Verhältnisse lassen sich durch den durchgeführten Versuch veranschaulichen. Es wird gezeigt, dass Methylrot durch angeregtes Chlorophyll reduziert wird. Bei der Reduktion wird Methylrot farblos.

### 4.2. Material und Methode:

Der Versuch wurde nach der Anleitung im Skript durchgeführt.

Färbung der Reagenzgläser vor Versuchsbeginn:

Reagenzglas 1: bräunlich  
Reagenzglas 2: bräunlich  
Reagenzglas 3: bräunlich  
Reagenzglas 4: rot  
Reagenzglas 5: farblos

### 4.3. Versuchsergebnisse:

Färbung der Reagenzgläser nach Versuchsende:

Reagenzglas 1: bräunlich (Dunkelkontrolle)  
Reagenzglas 2: grün  
Reagenzglas 3: bräunlich (keine Veränderung)  
Reagenzglas 4: rot (keine Veränderung)  
Reagenzglas 5: farblos (keine Veränderung)

### 4.4. Auswertung:

Das Prinzip des Versuches beruht auf den Redoxpotentialen der einzelnen Komponenten. Im Reagenzglas 1 tritt keine Farbveränderung auf, da ohne Licht keine Photosynthese/Elektronentransport stattfinden kann. Das P680 kann also nicht angeregt werden.

Beim Reagenzglas 2 wird Methylrot reduziert. Als Elektronendonator dienen hier sowohl das Chlorophyll, als auch die Ascorbinsäure, welche ein niedriges Redoxpotential hat.

Im Reagenzglas 3 kommt es zu keiner Farbveränderung, da keine Ascorbinsäure als Elektronendonator vorhanden ist.

Bei Reagenzglas 4 fehlt das Chlorophyll um die Reaktion ablaufen zu lassen. Es kommt zu keinem Elektronentransport, also auch zu keiner Entfärbung.

Im Reagenzglas 5 wird Methylrot entfärbt, da Natriumdithionit ein so negatives Redoxpotential hat, das Methylrot direkt entfärbt werden kann.

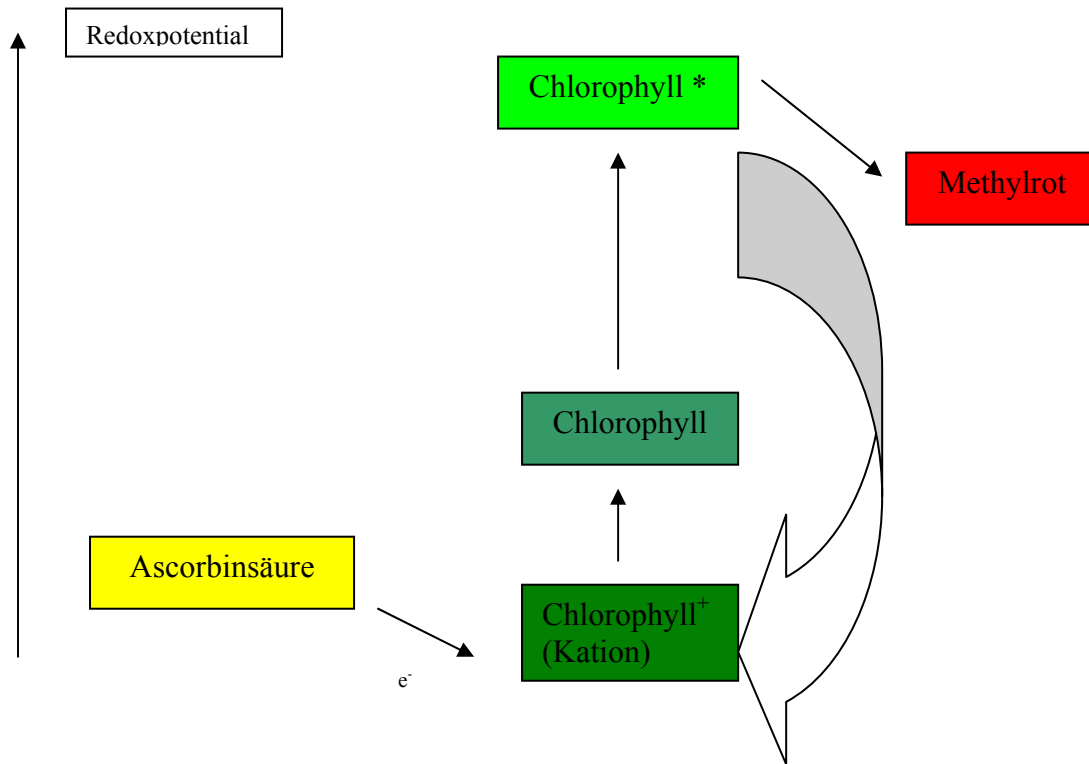


Abb. 1: Schema der Redoxpotentiale relativ zueinander

**5. Literatur: (Die Literaturangabe bezieht sich auf alle Versuche des vorliegenden Protokolls)**

- CAMPELL, Biologie, 5. Auflage, 1997, Spektrum Verlag, Stichwort „Photosynthese“  
RICHTER, Biochemie der Pflanzen, 1996, Thieme Verlag  
BUSCHMANN + KRUMMBACH, Physiologie der Photosynthese, 1985, Springer Verlag  
LICHTENTHALER + PFISTER, Praktikum der Photosynthese, 1978, Quelle & Meyer  
HELDT, Pflanzenbiochemie, 2003, Spektrum Verlag