**Eksperiment****Undersøgelse af fotosyntesepigmenter**

Baseret på Biokemi – Levende organismers kemi side 126-131.

I dette eksperiment skal du først oprense fotosyntesepigmenter fra bladenes chloroplastre. Derefter skal du lave tre eksperimenter, hvor du undersøger pigmenternes egenskaber:

- Eksperiment A: Chlorofyls epifluorescens
- Eksperiment B: Måling af absorbtionsspektrum
- Eksperiment C: Adskillelse af pigmenter ved tyndtlagskromatografi

Oprensning af fotosyntesepigmenter**Materialer**

- Blade fx af spinat eller mælkebøtte. Er det efterår kan man fx sammenligne grønne og gule blade fra samme træ.
- Saks
- Morter og pistel
- Sand
- 96 % Ethanol

Fremgangsmåde

1. Klip bladene i stykker og knus dem i lidt sand i en morter.
2. Tilsæt lidt ethanol med en pipette og rør med pistelen til det tager farve. Chlorofylekstraktet skal være så koncentreret som muligt, så tilsæt kun så meget ethanol at det netop dækker bladmaterialet, og så du kan tage væske op med en pipette, uden at få sand og bladmateriale med.
3. Lad partiklerne bundfælde sig. Overfør evt. ekstrakt uden partikler til et lille bægerglas eller eppendorfrør.

Bladekstraktet indeholder nu chlorofyl og de andre molekyler fra plantecellerne, som kan opløses i ethanol. Du skal bruge dette ekstrakt til både eksperiment A, B og C.

Efterbehandling

- Forklar ud fra figur 6b, side 11, hvorfor man kan ekstrahere chlorofyl ved knusning og tilsætning af ethanol.



Ekspirement A: Chlorofyls epiflouescens

Ved fotosyntesens lysproces afgiver chlorofyl elektroner til enzymer i thylakoidmembranen.

Det sker ved at chlorofylmolekylet exciteres, dvs. centraler atomer i molekylet energiberiges. Exciteringen betyder at elektroner hopper ud i en anden skal. Den exciterede elektron kan enten afgives til et andet molekyle, eller elektronen kan henfalde til sin tidligere skal, så energien udsendes som synligt lys.

Fænomenet kaldes epiflouescens.

- Forklar hvordan et chloroplast er opbygget.
- Forklar ud fra figur 211 hvorfor fotosyntesen kun kan foregå, hvis fotosystemerne er indlejrede i membranerne i intakte chloroplaste.

Materialer

- Bladestrakt
- UV-lampe

Fremgangsmåde

1. Belys bladestraktet med UV-lampen
2. Tag et foto af den farve chlorofylekstraktet udsender.

Resultater

Indsæt et foto af chlorofylekstraktet uden UV-belysning og med UV-belysning.

Efterbehandling

Forklar resultaterne.

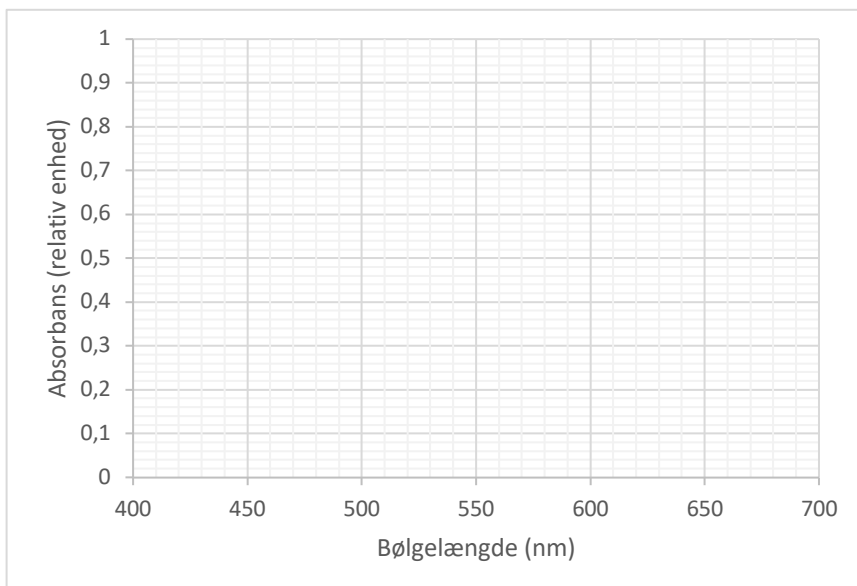


Ekspériment B: Måling af absorbtionsspektrum

- Forklar ud fra figur 207 hvilken funktion chlorofyl spiller i fotosyntesen.
- Giv en uddybende forklaring af chlorofyls rolle i fotosyntesen ud fra figur 211.
- Forklar hvilke rolle hjælpepigmenterne spiller i fotosyntesen ud fra figur 210.
- Forklar hvilke farver af synligt lys der absorberes af de forskellige pigmenter ud fra figur 209.
- Forklar på den baggrund, hvilke farver af lys planter vil udnytte i fotosyntesen.

Hypotese

Skitsér ud fra figur 36 én samlet kurve som viser, hvilke bølgelængder af lys du vil forvente absorberes af bladekstraktet:



Materialer

- Bladekstrakt
- Pipette
- 2 kuvetter
- Spektrofotometer

Fremgangsmåde

1. Overfør ethanol til den ene kuvette og et par dråber bladekstrakt til den anden. Fortynd bladekstraktet med ethanol. Det skal være svagt lysegrønt.
2. Nulstil spektrofotometret med ethanol.
3. Skift til kuvetten med bladekstraktet og mål absorbtionsspektret.
4. Hvis absorbansen er højere end 1,000, fjernes lidt af bladekstraktet med pipetten og det resterende fortyndes yderligere med ethanol før der måles.
5. Gem absorptionsspektret.

**Resultater**

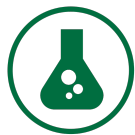
Indsæt absorptionsspektret.

Bølgelængde (nm)	Absorbans (relativ værdi)	Mulige pigmenter

Tabel 1. Resultatskema.

Efterbehandling

1. Aflæs bølgelængden for de toppe der ses i absorptionsspektret og notér dem i tabel 1.
2. Angiv ud fra figur 128 hvilke mulige pigmenter der kan give de enkelte absorptionsstoppe. Husk at en top kan være resultat af flere pigmenters absorbans.
3. Overvej, hvordan resultaterne passer med jeres forventninger.
4. Forklar ud fra målingerne, hvorfor blade fremstår grønne, når vi ser på dem.
5. Overvej fejlkilder og usikkerheder.



Eksperiment C: Adskillelse af pigmenter ved tyndtlagskromatografi

Chromatografi er en metode til at adskille de molekyler der befinder sig i en blanding. Chromatografi betyder farve-skrivning, og navnet stammer fra at metoden først blev udviklet til at adskille farvestoffer ved at lade dem fordele sig på papir eller stof. Ved tyndtlagskromatografi, TLC, adskilles pigmenterne på en kiselgel-plade.

Ved chromatografi lader man blandingen vandre i en blanding af en stationær (stående) og en mobil (bevægelig) væskefase, som har forskellig polaritet. Den stationære fase er ved TLC kiselgelen, som er polær, mens den mobile fase et upolært opløsningsmiddel.

De opløste molekyler i blandingen vil vandre med forskellig hastighed i de to faser på baggrund af deres størrelse, ladning og polaritet. Jo mere polært et pigment er, jo lettere bindes det til kiselgelen, og vandrer derfor ikke så langt. Jo mere upolært et pigment er, jo lettere opløses det i løbevæsken, og jo længere op ad pladen vandrer det.

TLC-pladen med de adskilte stoffer kaldes et chromatogram, og pigmenterne vil kunne ses som adskilte farvede bånd. Man kan få et mål for hvor langt de enkelte pigmenter er vandret i forhold til hvor langt løbevæsken er vandret. Det kaldes retenstionsfaktoren, R_f .

Sammenlign molekylstrukturene for pigmenterne i figur 209a.

- Identificer polære bindinger i molekylerne.
De findes som udgangspunkt mellem atomerne C-O, O-H, C-N, N-H.
Bindinger mellem C-H og mellem to atomer af samme grundstof (C-C, H-H, O-O, N-N) er upolære.
- Sammenlign strukturen af Chlorofyl a og Chlorofyl b. Hvilket indeholder flest polære bindinger og hvilket vil vandre længst på TLC-pladen?
- Sammenlign på samme måde β -caroten og xanthofyl: Hvilket vil vandre længst?
- Hvilket pigment vil være det mest upolære?

Ud over de fire pigmenter som ses i figur 209, vil man oftest se deres nedbrydningsprodukter.

Nedbrydningsprodukterne fra chlorofyl er phaeophytin a og b som begge er grå og lidt mere upolære end de tilsvarende chlorofyller. Ofte vil man også se flere forskellige xanthophyller, som har lidt forskellig polaritet.

Hypotese

Anbring følgende pigmenter i den rækkefølge I vil forvente de vil optræde på TLC-pladen:

Chlorofyl a, Chlorofyl b, Phaeophytin a, pheophytin b, β -caroten, xanthophyl.

Materialer

- Bladekstrakt
- TLC-kar med låg
- Strimler af kromatografipapir, 1 cm brede, og 2 cm kortere end TLC-karret
- 20 μ L automatpipette eller kapillærrør
- Løbevæske (70 % petroleumsether, 30 % acetone). *Brandfarlig, farlig at indånde! Der må kun arbejdes med løbevæsken i stinkskab.*
- Blyant og lineal

**Fremgangsmåde**

- Tegn en blyantlinje på tværs af kromatografipladen, ca. 1,5 cm fra nederste kant. Undgå at den hvide belægning beskadiges.
- Afsæt en lille plet af koncentreret pigmentekstrakt midt på blyantslinjen. Det gøres ved at overføre en dråbe ad gangen til pletten, og lade dråben tørre ind, før den næste sættes på. Dråberne overføres med automatpipette eller kapillærrør. Jo mindre og stærkere farvet pletten bliver, jo bedre.
- **I stinkskab:** Fyld løbevæske i TLC-karret, så det står ca. 1 cm fra bunden. Det skal nå ca. 1 cm op på TLC-pladen fra underkanten, men må ikke nå pigmentpletten.
- Anbring TLC-pladerne i karret.
- Lad væsken trække op i TLC-pladen.
- Afbryd processen når løbevæsken er ca. 1 cm fra kromatogrammets overkant. Tag forsigtigt kromatogrammet op, tegn straks en blyantstreg, hvor væskefronten nåede til og lad kromatogrammet tørre.
- Kromatogrammet fotograferes med en lineal som baggrund. Farverne er ustabile og forsvinder hurtigt.

Resultater

Læg en lineal ved siden af kromatogrammet og tag et billede af det.

Bånd	Farve	Vandringslængde fra blyantsstreg (mm)	Retentionsfaktor (R_f)	Sandsynligt pigment
Væskefront				
1				
2				
3				
4				
5				
6				

Tabel 2.



Efterbehandling

1. Notér farverne i tabel 2 i den rækkefølge de forekommer.
2. Mål vandringslængden for hvert bånd, målt fra blyantsstregen og notér det i tabel 2.
3. Mål afstanden til væskefronten og R_f -værdien for hvert bånd:

$$R_f = \frac{\text{Afstand fra bånd til startlinje (mm)}}{\text{Afstand fra væskefront til startlinje (mm)}}$$

4. Fortolk resultaterne og angiv, hvilke pigmenter de forskellige bånd repræsenterer.