

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.07>

ROZDZIAŁ VII. **REAKCJA HILLA**

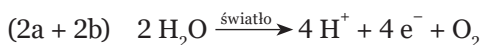
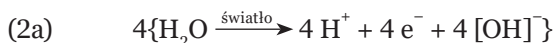
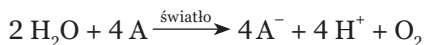
CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Fotosynteza polega na wytwarzaniu związków organicznych z CO_2 i wody kosztem energii świetlnej w obecności barwników fotosyntetycznych, co przedstawia ogólna reakcja fotosyntezy (1). Jest to bardzo uproszczona definicja, która nie oddaje złożoności całego procesu fotosyntezy. W 1937 roku Robert Hill wykazał, że oświetlane chloroplasty w obecności odpowiednich akceptorów (A), np. potasu heksacyjanożelazianu (III), powodują rozszczępienie wody przy nieobecności CO_2 , czemu towarzyszy wydzielanie tlenu (2a i 2b). Zredukowaniu czterech równoważników akceptora (A) odpowiada wydzielenie jednej cząsteczki tlenu (2). Zjawisko to, nazwane reakcją Hilla, przyczyniło się do wyjaśnienia roli wody jako źródła elektronów do redukcji CO_2 i ostatecznego potwierdzenia, że tlen wydzielający się w trakcie fotosyntezy pochodzi z wody. Pod wpływem światła następuje transport elektronów z ulegającej fotolizie cząsteczki wody na akceptory oraz wytwarzanie tlenu jako produktu ubocznego fotosyntezy. Reakcja Hilla wykazuje możliwość oddzielenia fotochemicznej reakcji wydzielania O_2 od fotosyntetycznej redukcji CO_2 (1 i 2).

(1) Ogólna reakcja fotosyntezy:



(2) W obecności akceptora (A) chloroplasty wydzielają O_2 na świetle:



CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Wykazanie, że znajdujące się w roztworze wodnym izolowane chloroplasty w obecności akceptora elektronów dokonują rozszczepienia wody i jest to proces zależny od światła.

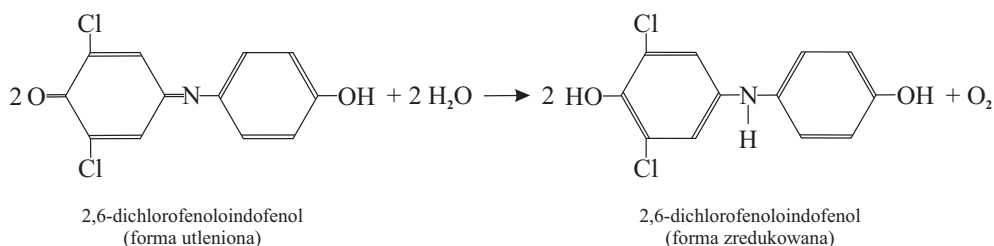
Doświadczenie I

Reakcja Hilla

Zasada metody

Przykładem reakcji Hilla jest redukcja 2,6-dichlorofenolindofenolu (2,6-DCIP) przez naświetlone chloroplasty. Naświetlenie zawiesiny chloroplastów w środowisku wodnym pozbawionym CO_2 i zawierającym 2,6-DCIP (akceptor elektronów) powoduje wydzielanie się tlenu, pomimo braku CO_2 , a 2,6-DCIP znajdujący się w roztworze ulega redukcji z formy utlenionej (barwa niebieska) do zredukowanej (bezbarwnej) (por. rysunek 7.1). W warunkach *in vivo* ostatecznym akceptorem elektronów jest NADP^+ , ale przeprowadzając reakcję *in vitro* z wykorzystaniem izolowanych chloroplastów, można go zastąpić innymi związkami, np. 2,6-DCIP. Szybkość redukcji 2,6-DCIP ocenia się kolorymetrycznie, dokonując pomiarów absorbancji roztworu przy długości fali 600 nm. Spadek absorbancji wynikający ze zmniejszenia stężenia utlenionej formy 2,6-DCIP na skutek jego redukcji jest skorelowany z intensywnością procesu rozszczepienia wody przez izolowane chloroplasty.

Rysunek 7.1. Redukcja 2,6-dichlorofenolindofenolu (2,6-DCIP)



Materiał

liście szpinaku lub fasoli

Odczynniki

0,5 M sacharoza, roztwór inkubacyjny zawierający 0,08 M KCl i 0,4 M KH_2PO_4 (pH 6,5), 0,05% 2,6-DCIP

Sprzęt laboratoryjny

moździerz, zlewka 100 cm³, cylinder miarowy 25 cm³, włóknina typu Miracloth, łaźnia wodna 25°C, lejek, skalpel, waga, 5 probówek, statyw na probówki, palnik, łapa drewniana, pipety (0,1–10 cm³), bagietka, folia aluminiowa, spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne, waga laboratoryjna

Wykonanie doświadczenia

1. Otrzymanie zawiesiny chloroplastów

Liście szpinaku lub fasoli umyć pod bieżącą wodą, a następnie destylowaną. W celu zwiększenia turgoru można je umieścić na pewien czas w worku foliowym. Odważyć 3 g liści, pociąć drobno i umieścić w schłodzonym moździerzu. Homogenizować przez 5 minut z 18 cm³ schłodzonego 0,5 M roztworu sacharozy. Homogenat przesączyć przez podwójną warstwę Miracloth. Przesącz zawiera chloroplasty.

2. Reakcja Hilla

Umieścić w probówce 3 cm³ zawiesiny chloroplastów i poddać termicznej denaturacji, delikatnie ogrzewając nad palnikiem aż do wrzenia. Następnie ochłodzić probówkę pod bieżącą wodą i w razie potrzeby zawiesinę przesączyć przez włókninę. Przygotować 4 probówki: jedną dla próby kontrolnej i trzy dla badanych, z których jedną owinąć dokładnie folią aluminiową. Do wszystkich probówek wlać po 9 cm³ roztworu inkubacyjnego. Następnie do pierwszej probówki (kontrola) dodać 0,5 cm³ 0,5 M sacharozy, do drugiej 0,5 cm³ zagotowanej zawiesiny chloroplastów, do trzeciej i czwartej (owiniętych folią aluminiową) po 0,5 cm³ zawiesiny świeżych chloroplastów. Do trzech prób badanych dodawać kolejno po 0,1 lub 0,5 cm³ 0,05% roztworu 2,6-DCIP, energicznie zamieszać i natychmiast

zmierzyć absorbancję przy 600 nm wobec kontroli (t_0). Drugą i trzecią probówkę wystawić na działanie żarówki 100 W (próbówki umieścić w łaźni wodnej w temperaturze 25°C w celu zabezpieczenia przed przegrzaniem od ciepła emitowanego przez żarówkę). Czwartą probówkę (owiniętą folią) umieścić w ciemności, zakrywając folią również od góry. Następnie wykonać dwa pomiary: po 10 i 20 minutach (odpowiednio t_{10} i t_{20}). Przed każdym pomiarem próbki wstrząsnąć.

Opracowanie wyników

Wyniki umieścić w tabeli 7.1 i wykonać wykres, odkładając na osi odciętych (x) czas w minutach [min], a na osi rzędnych (y) absorbancję A_{600} . Wyjaśnić, jaki jest związek zmian absorbancji z intensywnością procesu fotolizy wody.

Tabela 7.1. Redukcja 2,6-dichlorofenolindofenolu przez wyizolowane chloroplasty na podstawie wartości absorbancji mierzonej przy długości fali 600 nm

Materiał	Naświetlanie	A_{600}				
		t_0	t_{10}	$t_0 - t_{10}$	t_{20}	$t_{10} - t_{20}$
Chloroplasty świeże	Światło					
	Ciemność					
Chloroplasty poddane termicznej denaturacji	Światło					

Literatura

Hall D. O., Rao K. K., *Fotosynteza*, Wydawnictwo WNT, Warszawa 1999.
 Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.