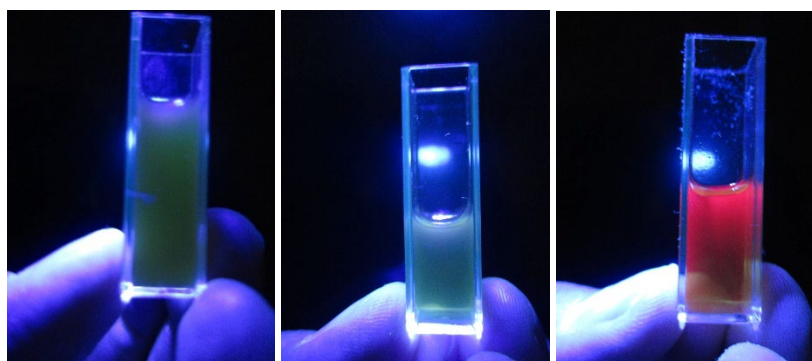


# Lys, farver og klorofyl

Nanoteket, DTU Fysik



Copyright: Hel eller delvis gengivelse af denne vejledning er tilladt med kildeangivelse.

Forsidebillede: Udtræk af klorofyl til måling af absorptions- og fluorescensspektrum.

Rettelser til: [ole.trinhammer@fysik.dtu.dk](mailto:ole.trinhammer@fysik.dtu.dk)

10. marts 2022.

## Indledning

I denne øvelse skal I undersøge lysets farver, dels ved opdeling af hvidt lys og anvendelse af farvefiltre, dels ved absorption i farvet væske og endelig ved fluorescens i klorofyl. I kommer til at udnytte lysets bølgenatur ved diffraktion i optisk gitter samt måle emission og absorbans med spektrofotometer. Og I kommer til at udnytte lysets partikelnatur for at forstå fluorescensen i klorofyl og hvordan det spiller sammen med planternes fotosyntese.

## Lys

Lys er elektromagnetiske bølger med forskellige frekvenser. Frekvensen  $f$  fortæller, hvor mange gange pr tidsenhed bølgen svinger op og ned i et givet punkt. Den måles i hertz, Hz, som er en enhed for antal svingninger pr sekund. Det betyder at svingningens periode  $T$  kan findes som

$$T = \frac{1}{f} \quad (1)$$

Lyset tilbagelægger en bølgelængde  $\lambda$  i løbet af svingningens periode (en svingningstid), og lysets fart  $v$  kan dermed findes som

$$v = \frac{\lambda}{T} = \lambda f \quad (2)$$

Lysets farve er bestemt af dets frekvens. Lysets bølgelængde for en given frekvens afhænger af, hvilket stof det udbreder sig i. I det tomme rum er lysets fart

$$c = 299.792.458 \frac{\text{m}}{\text{s}} \approx 300.000 \frac{\text{km}}{\text{s}} \quad (3)$$

Lysets frekvens bestemmer også energien af de "pakker" som lyset kommer i. Man siger, at lys er kvantiseret og et kvantum lys kaldes en *foton*. Fotonernes energi  $E$  viser sig at være proportional med lysets frekvens

$$E = hf \quad (4)$$

Her er  $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$  ( $= 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J/Hz}$ ) og kaldes Plancks konstant. En foton af lys fra en rød lysdiode (LED) har i tomt rum en bølgelængde på typisk 660 nm. Det giver en frekvens på 454 THz og en energi på  $3,01 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ . Det er en meget lille energi i forhold til menneskelig skala, men det er nok til at sætte gang i fotosyntesen i et blad. Det er derfor praktisk at benytte en anden energiskala, som kaldes elektronvolt

$$1 \text{ eV} = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J} \quad (5)$$

Energien i en typisk "rød" foton bliver da 1,88 eV, altså knap 2 elektronvolt. Det svarer til den energi, som en elektron får, når den løber gennem et 2V batteri. I forbifarten kan vi nævne, at der skal cirka 1,23 volt til at spalte vand ved elektrolyse, dvs. spalte vand i brint og ilt ved at tilføre en elektrisk spændingsforskel. Energier af størrelsesordenen elektronvolt er typiske energier for kemiske processer.

## Diffraction

Når en lysstråle sendes gennem et optisk gitter vil lyset spredes gennem spalterne i gitteret og interferere på den modsatte side; fænomenet kaldes *diffraction*. Sendes lyset vinkelret mod gitteret, vil spredningsvinklerne  $\theta_n$  afhænge af afstanden  $d$  mellem spalterne i gitteret og af hvor mange bølgelængder  $n\lambda$ , der er mellem de interfererende bølger ( $n$  er et heltal)

$$\sin \theta_n = \frac{n\lambda}{d} \quad \text{eller} \quad n\lambda = d \sin \theta_n \quad (6)$$

## Absorbans

Når lys bevæger sig gennem et stof, vil noget af det absorberes, dvs. det kommer ikke ud igen langs den retning, det blev sendt ind. (Enten fordi lyset optages af molekyler i stoffet eller fordi det spredes på stoffets molekyler, så det kommer ud til andre sider, eller sætter molekylerne i bevægelse, så lysets energi omdannes til varme.) Den samlede virkning af disse mekanismer er at intensiteten  $I$  af lyset hen gennem stoffet aftager eksponentielt fra sin oprindelige værdi  $I_0$  ifølge absorptionsloven

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon c d} \quad \text{eller} \quad \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon c d} \quad (7)$$

Her er  $d$  tykkelsen af det stoflag, som lyset passerer,  $c$  betegner koncentrationen af stoffet og  $\epsilon$  kaldes den extinktionskoefficienten (extinktion = udslukning). Brøken

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (8)$$

kaldes *transmittansen*. En transmittans på 100 %, betyder at lyset går usvækket igennem stoffet, dvs. stoffet er gennemsigtigt for de bølgelængder lyset har og absorberes ikke – (tænk f.eks. på vand og glas som begge er gennemsigtige for synligt lys). Som mål for absorptionen bruger man *absorbansen*  $A$ , som er defineret som

$$A = -\log T \quad (9)$$

Man kunne synes, at indførelsen af logaritmen er unødvendig, hvorfor ikke bare sige  $A = 1 - T$  ?

Svaret fås ved at indsætte højresiden fra (7) for transmittansen  $T$  i (9) og reducere, så vi får

$$A = \epsilon c d \quad (10)$$

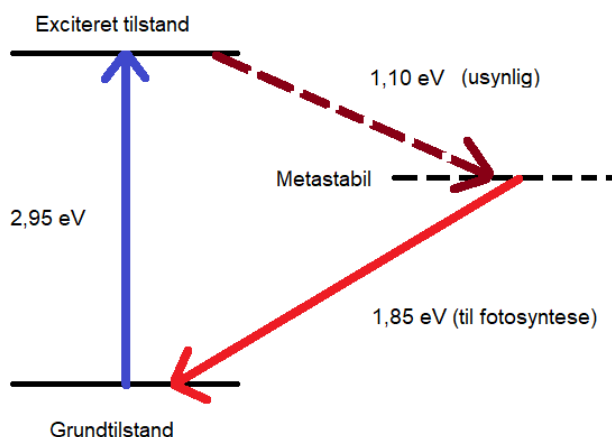
Dette er Beer-Lamberts lov, som siger at absorbansen er proportional med stofkoncentrationen  $c$  og med lysvejen  $d$ . Hvis transmittansen kun er 1 % = 0,01, ser vi ved indsættelse i (9), at absorbansen bliver 2. Det er en forholdsvis høj absorption (99 %) af lyset. Det betyder, at der ikke er så meget signal tilbage at måle på i spektrofotometret og målingen vil derfor blive usikker. I øvrigt gælder Beer-Lamberts lov ikke for vilkårligt høje koncentrationer. Ved høje koncentrationer vil de absorberende molekyler skygge for hinanden og proportionaliteten i (10) vil ikke længere holde.

## Fluorescens

Alle molekyler kan bringes i en tilstand med højere energi, hvis man lyser på dem med lys af den rette frekvens. Det kan betyde at molekylet begynder at rotere. Det kan også betyde at atomerne i

molekylets indre begynder at vibrere i forhold til hinanden. Eller det kan betyde at en eller flere elektroner løftes til en tilstand med højere energi. Man siger at molekylet *exciteres*. Ofte vil den exciterede tilstand kun holde kortvarigt, og den overskydende energi frigives igen som en foton, et lysglimt med samme energi, som blev brugt til at excitere molekylet. Processen kaldes et *henfald* og man siger, at det sker ved *spontan emission* af lys.

Nogle af de exciterede tilstande har imidlertid et lidt længere liv, fordi de ikke kan henfalde spontant til den grundtilstand, man startede med. I stedet henfalder de i en to-trins proces, se figur 1. Denne proces kaldes fluorescens og man siger at klorofyl "fluorescerer i rødt".



Figur 1. Fluorescens i klorofyl a. Molekylet exciteres med en foton fra et blåviolet lys. Herefter henfalder det til en metastabil tilstand under udsendelse af en infrarød foton. Efter yderligere lidt tid henfalder den metastabile molekyletilstand til grundtilstanden under udsendelse af en rød foton. Energien af denne foton kan bruges af klorofylet i fotosyntesen.

## Fotosyntese

Klorofyl er udviklet i grønne planter med den funktion at høste energi til opbygning af plantemateriale.

Vi begynder med at kigge på kemiske reaktioner energimæssigt først. Befries der en vis energimængde i løbet af en reaktion (exoterm reaktion), får man produkter, som er mindre energirige tilsammen end de stoffer, man startede med (energibevarelse). Kræver en reaktion en vis energimængde tilføjet udefra for at kunne forløbe (endoterm reaktion), har det som konsekvens dannelse af produkter, som er mere energirige tilsammen end de oprindelige stoffer.

Planter er under påvirkning af sollys i stand til at producere mere energirige stoffer end de optager. De kan næsten "trylle". Fysisk set, er de nødt til at optage en del energi fra en eller anden kilde, som de bagefter kan indbygge i nyopståede stoffer. I tilfældet med planter er man bare så heldig, at denne energi kommer direkte fra "luften", eller mere præcist sagt - optages fra sollys. Nu er det op til planterne, om de kan udnytte den eller ej.

Mennesker kan ikke, men grønne planter kan. Hvad skyldes det? Først skal vi forklare, hvad der egentligt foregår i planterne. Grønne planter indeholder i deres celler et grønt stof med navnet *klorofyl*. Ved påvirkning af sollys bliver klorofyls molekyler exciterede. Med andre ord: ved optagelse af lysenergi fra sollys kommer de i en såkaldt exciteret tilstand. Men en exciteret tilstand er som regel meget ustabil. Dvs. et exciteret molekyle har en stor tendens til at komme tilbage til sin stabile tilstand igen. Hvordan fastholdelse af energien foregår er lidt mere kompliceret. Det kan kun lade sig gøre ved at overføre den tidligere optagede ekstraenergi til et andet system. Sådant findes nemlig i planterne og kaldes fotosystem 1 og fotosystem 2. Det er det centrale system her som gør det muligt at overføre den overskydende energimængde fra det exciterede klorofylmolekyle direkte til kemiske reaktioner som netop har kan udnytte den. Det resulterende produkt af disse kemiske reaktioner er

mere energirige kulhydrater, hvor flere kulstofatomer bliver kædet sammen, f.eks. til sukkerstoffet glukose.

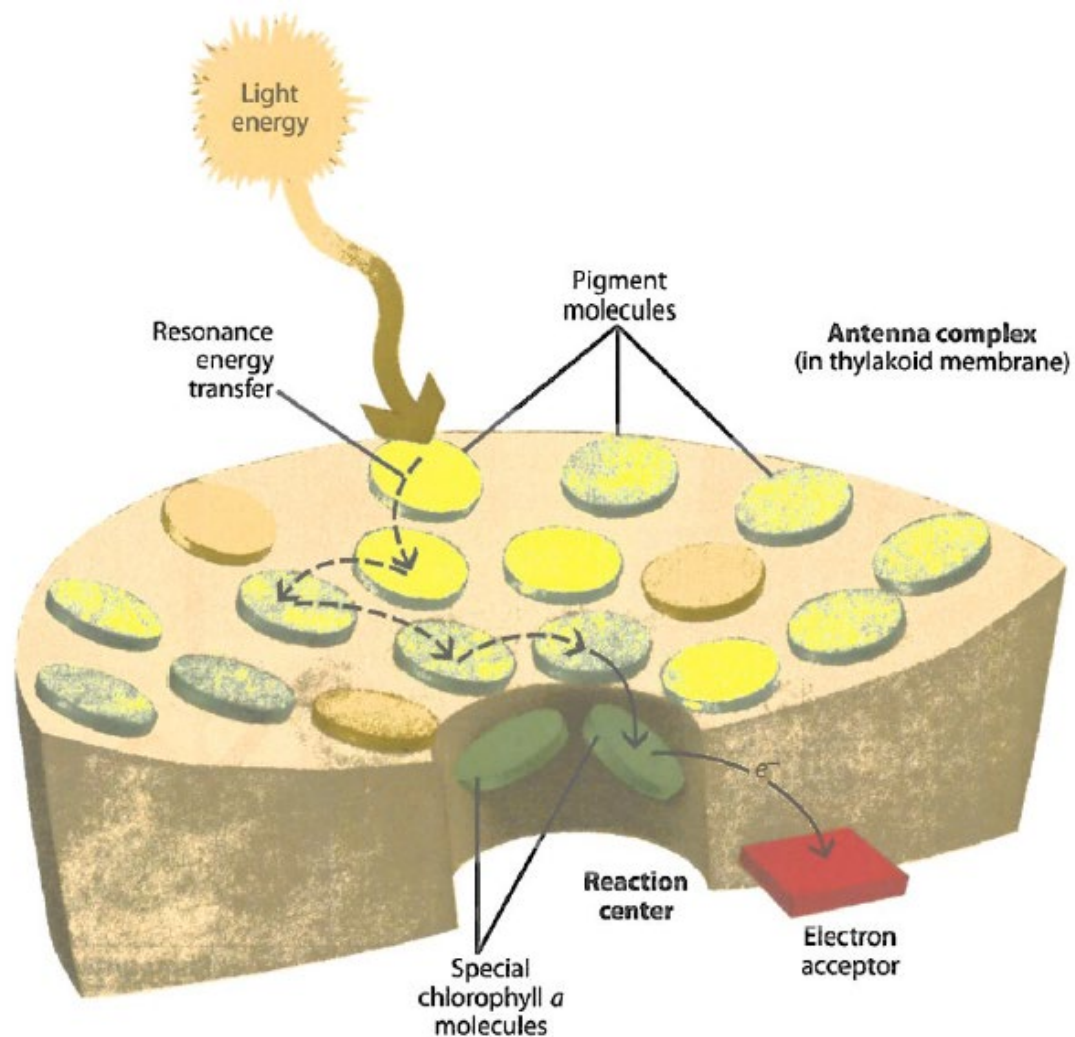
En energioverførsel med tilhørende dannelse af nye kulhydrater foregår i en plante hele dagen og i hele dens grønne del. Ud fra glukose dannes videre andre vigtige "byggestoffer", såsom mere komplicerede kulhydrater og f.eks. cellulosefibre velkendte fra træets ved. Man kan overbevise sig selv om processen f.eks. ved at klippe en stilk fra en potteplante, Pelargonium, og sætte den i et glas vand i vinduet. Stilken udvikler efterhånden sine egne rødder og begynder at vokse. Til nogle af planternes byggestoffer har planterne brug for små mængder af salte fra jorden, men det vil vi ikke behandle her. Læs mere i tillægget.

Fotosyntese er en fotokemisk reaktion, som består i at optage kuldioxid  $\text{CO}_2$  og vand  $\text{H}_2\text{O}$  fra omgivelserne og omdanne dem til noget mere energirigt. Her bliver det til kulhydrater som "byggestoffer" samt ilt  $\text{O}_2$ , som frigives fra bladene til omgivelserne.



(11)

Her er  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  sukkerstoffet glukose. Bemærk at der IKKE behøves fotoner med højere energi end de røde. At klorofyl også kan optage blått lys og "omdanne" det til rødt, må tilskrives evolutionen her på Jorden, hvor sollyset også indeholder blått lys. Dermed kan planten udnytte mere af solspektret selvom det så er med et vist tab: Den usynlige, infrarøde foton i figur 1, udnyttes IKKE af planten. I øvrigt sidder et specielt klorofyl med en lidt lavere excitationenergi i midten af et fotosystem. I fotosystemet er også indbygget gul-orange pigmenter (karotenoider), som kan optage de dele af spektret, som klorofyl ikke selv kan absorbere, se figur 2. Energien fra disse pigmenter overføres også til klorofylet i midten. Bemærk endelig, at når vi skriver "røde fotoner" i (11), er det kun en talemåde. Fotoner har egentlig ingen farve. Farven er et ord vi sætter på, når hjernen fortolker signalet fra de rød-følsomme tappe i øjets nethinde. Derimod "har" fotoner en frekvens og en bølgelængde, som kan måles. I kommer selv til at prøve at måle bølgelængder i eksperiment 1 – og disse målinger kan man sætte tal på også selv om man er farveblind.



Figur 2. Fotosystem, et antennekompleks med flere hundrede høstningsmolekyler - også kaldet pigmenter. Pigmenterne er farvestofmolekyler. Det kan være (orange/gule) karotenoider eller det kan være (grønne) klorofyl. En foton exciterer et pigment. Energien overføres ved resonans til et nabopigment i en trinvis proces indtil energien når et specielt klorofylmolekyle i midten. Dette specielle molekyle kan afgive en elektron med høj energi til en "elektron-acceptor". Her foregår en kemisk opbygning af mere energirige molekyler. Herefter er lysenergien bundet i stofflig form som nye molekyler - ikke bare som excitation til metastabile tilstande i eksisterende molekyler. Figur med tilladelse fra [3].

## Eksperiment 1 – hvidt lys med optisk gitter og farvefiltre

### Udstyr:

Reuterlampe m/strømforsyning (max 12 V), farvefiltre, spalte, optisk gitter, samlelinse (+10), skærm, optisk bænk med ryttere, lineal.

### Forsøgsgang:

På den optiske bænk monteres reuterlampen på en rytter i den ene ende og en skærm i den anden ende. Mellem lampe og skærm placeres en lodret spalte ca. 10 cm fra reuterlampen. Mellem spalte og skærm placeres en linse.

- Skru ned for strømforsyningen inden den tændes. Pæren kan nemt springe, hvis den får en pludselig spænding. Skru langsomt op for spændingen. Pæren kan tåle max 12 V.
- Pæren i lampen kan rykkes frem og tilbage ved hjælp af en stang for enden af lampen. Spalte og linse rykkes frem og tilbage indtil man har et skarpt billede af spalten på skærmen.
- Hvad vil der nu ske, hvis man indsætter et optisk gitter mellem linsen og skærmen? Prøv.
- Beskriv, hvad I ser.
- Tegn en skitse af opstillingen set fra oven. Angiv de afstande, I skal bruge til at bestemme afbøjningsvinklerne.
- Bestem bølgelængderne for forskellige farver lys i diffraktionsmønstret.
- Hvad vil der ske, hvis man indsætter et rødt farvefilter foran reuterlampen? Prøv.
- Mål hvilket interval bølgelængderne nu spreder sig over.



Figur 3. Opstilling til eksperiment 1 med reuterlampe, spalte og linse uden optisk gitter. Hvad vil der ske, hvis man indsætter et optisk gitter mellem linsen og skærmen?



## Eksperiment 2 – hvidt lys og farver med spektrofotometer

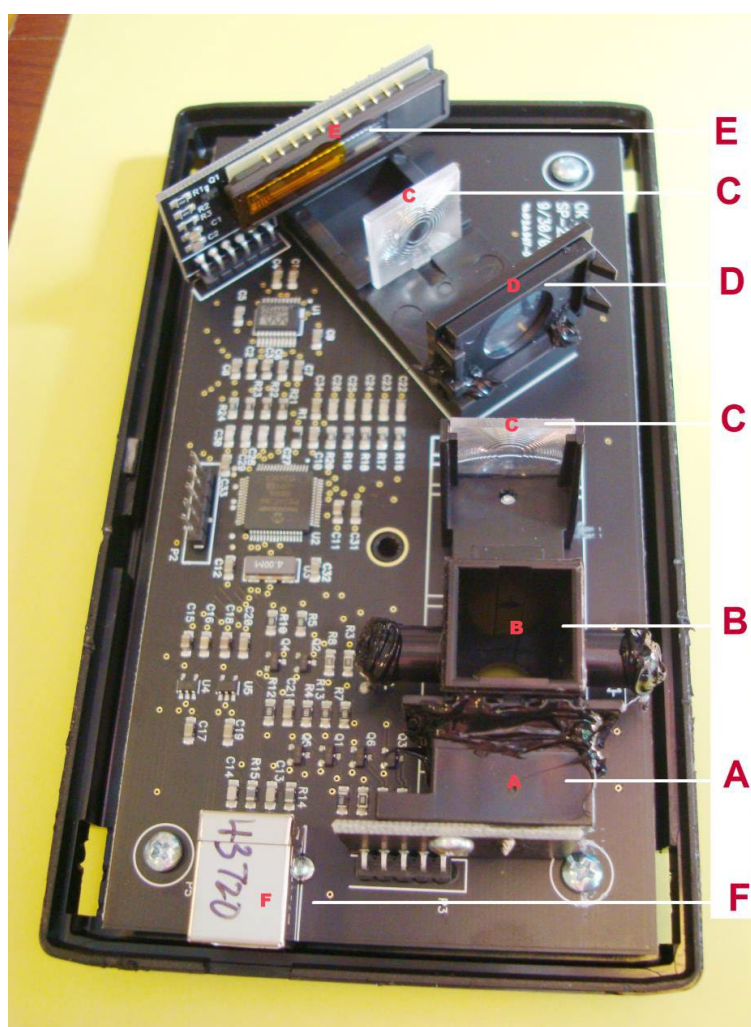
### Udstyr:

Reuterlampe m/strømforsyning (max 12 V), farvefiltere, diodestang med LED med variable farver, spektrofotometer m/optisk fiber, stativ, muffe og klemme.

### Forsøgsgang:

Spalte, linse og optisk gitter fra eksperiment 1 afmonteres fra bænken. Spektrofotometret kobles til en computer med Logger Pro. Under "Experiment" vælges "Change Units" og man indstiller til "Intensity". Man kan nu optage et spektrum af lyset ved hjælp af spektrofotometret med fiberenden sat i cuvetteholderen. Hvis apparatet "mætter" må man vælge en større afstand til lampen eller sætte integrationstiden ned.

- Prøv at optage reuterlampens spektrum uden filter og sammenlign bølgelængder med jeres resultater fra Eksperiment 1.
- Prøv dernæst med rødt filter og sammenlign igen.
- Prøv også med en rød lysdiode (LED) som lyskilde uden filter. Noter bølgelængden for den mest intense farve fra dioden. Resultatet skal bruges i opgaven efter eksperiment 4.



Figur 4. Spektrofotometrets indmad: A) lampehus, B) cuvetteholder, C) linser, D) optisk gitter, E) sensorarray, F) USB-stik. Sammenlign opbygningen med jeres opstilling i eksperiment 1.



## Eksperiment 4 – klorofyl, fluorescens

### Udstyr:

Spinat (frosne, hele blade), støder og morter, spektrofotometer med cuvette, tragt, filterpapir, ætanol i sprøjteflaske, bægerglas, UV-lommelygte (LED)

### Forsøgsgang:

Her skal I undersøge fluorescens fra klorofyl. I skal bruge jeres opløsninger fra eksperiment 3.

- En kraftig opløsning af klorofyl overføres til en cuvette og belyses med UV-lommelygten i en dunkel kasse. Beskriv hvad I ser.
- Cuvetten med indhold fra eksperiment 3 monteres i spektrofotometret. Under "Experiment" vælges "Change Units" og man indstiller til "Fluorescence 405 nm".
- Beskriv fluorescensspektret i ord og forklar jeres observation med UV-lommelygten.

### Opgave – spar på lyset

Her skal I forestille jer dyrkning af spinat i drivhus med kunstigt lys. Enten med lys, som er tilpasset klorofyls absorptionstop i det blåviolette eller en diodebelysning med røde dioder, som den I brugte i eksperiment 2.

- Hvilken løsning udnytter lysets energi bedst? (Overvej først uden at regne og skriv jeres svar ned).
- Prøv derefter at sætte tal på de forskellige lysenergier, som er relevante for problemet.
- Skriv jeres beregninger ned og sammenlign med jeres første bud.

### Referencer

[1] EUSO 2017, hvor Danmark var vært for *den europæiske scienceolympiade*. På DTU stod vi for opgaven "Ocean", som handlede om et havbrug med dyrkning af alger i spildevand med kunstigt lys. Algerne skulle bruges som foder til vandlopper som til sidst skulle spises af fisk. Eleverne i konkurrencen skulle undersøge algerne evne til at rense spildevandet, sammenligne forskellige lyskilder samt beskrive og vælge de bedst egnede vandlopper. Opgaverne kan ses på linket <http://euso2017.dk/tasks-1>

[2] <https://da.wikipedia.org> *Den lyskrævende fase*, 24. april 2019.

[3] R. E. Evert og S. E. Eichhorn, *Raven Biology of Plants*, 8. udgave, W. H. Freeman and Company, New York (USA), Houndmills (UK), 2013. Tilladelse til reproduktion af figurerne 6,7,8,9,10 fra Macmillan International Higher Education.

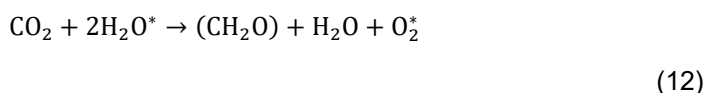
## Tillæg: Detaljer om fotosyntesen

I dette tillæg vil vi referere fra [3] hvor fotosyntesen er beskrevet i større detalje og med fine figurer.

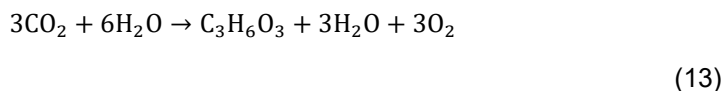
### Historie

Fra oldtiden har man troet, at planterne fik deres stoflighed fra jorden (Aristoteles og græske naturfilosoffer). Men allerede for mere end 350 år siden udførte den belgiske læge Jan Baptista van Helmholt (ca. 1577-1644) et forsøg til at teste denne antagelse. Han plantede et piletræ i en urtepotte og vejede jorden og træet ved starten af forsøget. Herefter tilføjede han kun vand gennem de næste fem år og vejede igen. Træets masse var vokset med 74,4 kilogram mens jordens masse kun var aftaget med 57 gram. Han konkluderede, at plantens massetilvækst kom fra vandet og ikke fra jorden.

Cirka hundrede år senere opdagede den engelske gejstlige videnskabsmand Joseph Priestly at luft, som var blevet "skadet" ved at afbrænde et stearinlys i den, indtil lyset gik ud, kunne gendannes af levende planter. Han satte den 17. august 1771 en levende mynteplante ind i en beholder, hvor luften var blevet "skadet" på den beskrevne måde. Ti dage senere kunne han igen tænde et stearinlys i luften. Han konkluderede, at "Ingen planter gror forgæves ... men rengør og renser vores atmosfære." Den hollandske læge Jan Ingenhousz bekræftede Priestlys arbejde og viste at genskabelsen kun skete ved tilstedeværelse af sollys og grønne plantedele. I 1796 foreslog Ingenhousz at kuldioxid spaltes under fotosyntesen og frigiver ilt. Først næsten 150 år senere blev det klart, at ilten som udvikles under fotosyntese kommer fra vandet. Dette blev vist ved radioaktiv mærkning. Samuel Ruben og Martin Kamen brugte i 1941 den tunge iltisotop  $O^*$  (ilt-18) i vandet og kunne vise reaktionen



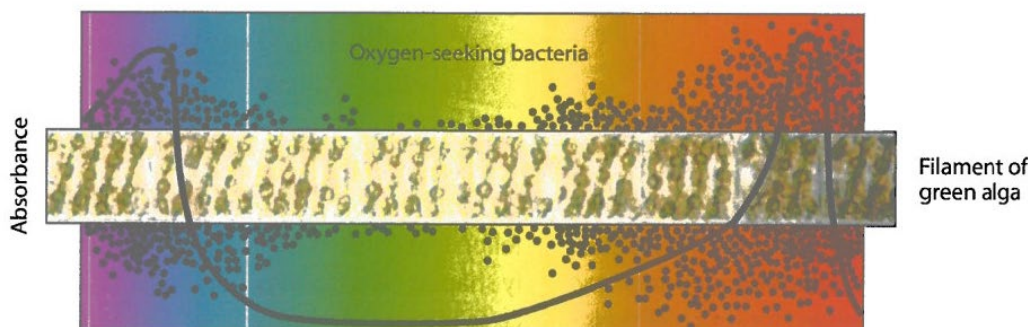
Den fuldt afstemte reaktion for fotosyntese frem til *triose* bliver dermed



I senere skridt i fotosyntesen bygges triose op til glukose, som indeholder seks kulstofatomer.

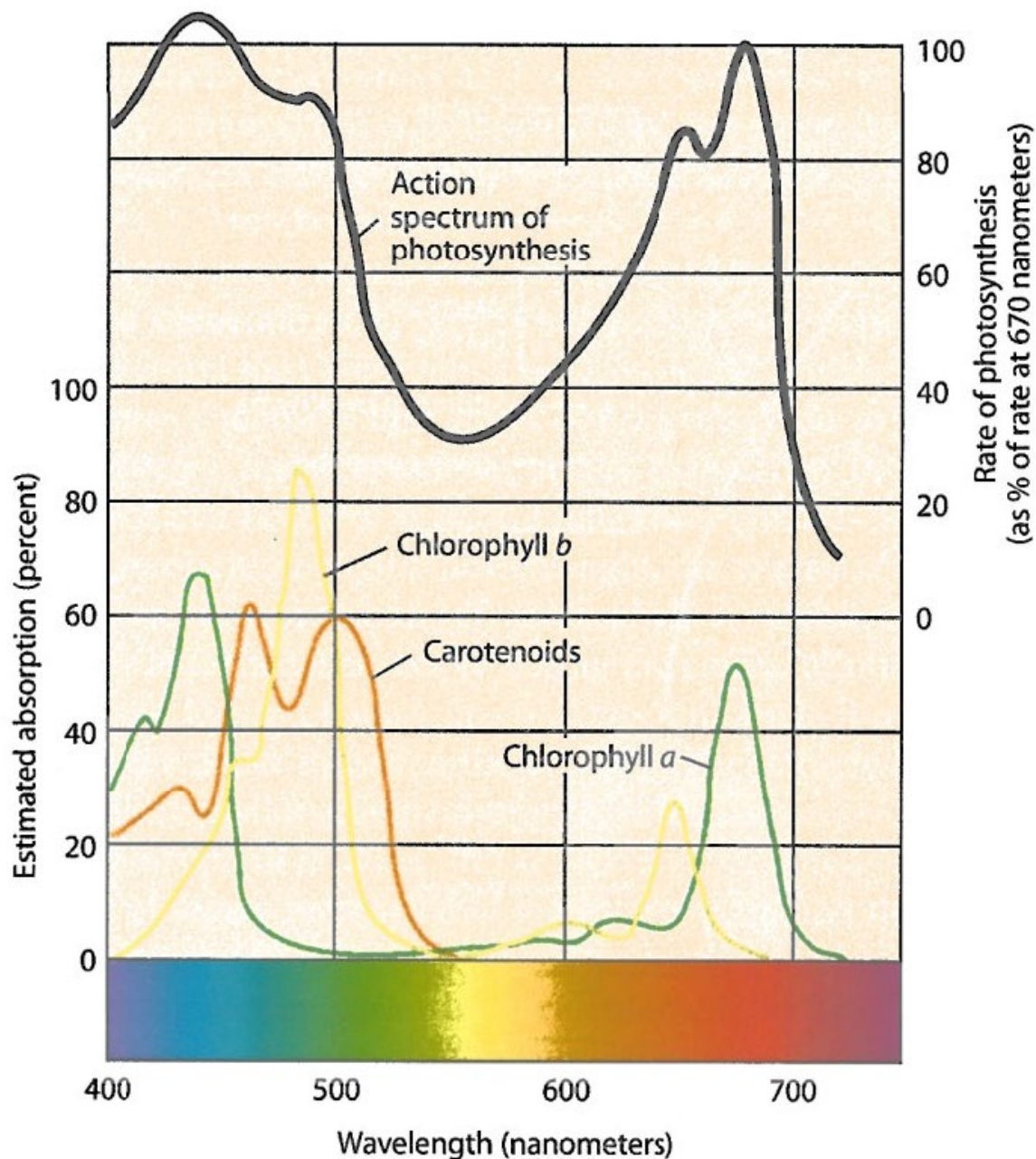
### Spektret og molekylerne

Ved at belyse alger af typen *Sirogyra* med et bælteformet spektrum af synligt lys fandt T. W. Engelmann i 1882 ud af, at det kun var visse områder af lyset, som algen kunne bruge, se figur 6. Som indikator for algerne aktivitet brugte Engelmann ilt-søgende bakterier, som samlede sig om de områder, hvor algerne producerede ilt. Raven, Evert og Eichhorn [3], hvorfra vi har figuren, skriver at dette er et eksempel på, hvad videnskabsfolk vil kalde et elegant eksperiment, ikke bare er det brilliant udtænkt, men også simpelt i design og konklusion.



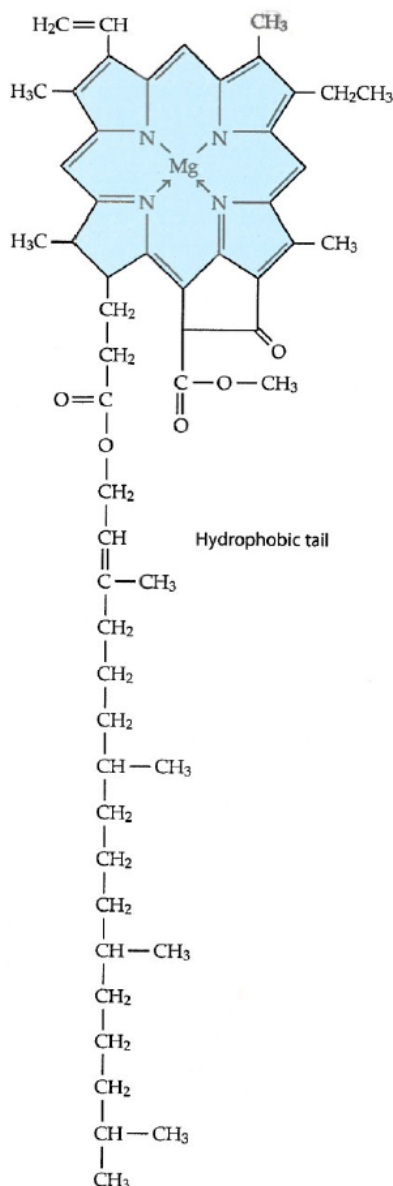
Figur 6. Aktiviteten af klorofyl målt med ilt-søgende bakterier. Figur med tilladelse fra [3].

Klorofylets aktivitet skyldes som nævnt, at det absorberer fotoner og indbygger deres energi i nye stoffer. Figur 7 viser absorptionsspektret og den relative aktivitet. Man ser, at absorptionen sker ved de bølgelængder, hvor Engelmann kunne konstatere vækst af iltøgende bakterier.



Figur 7. Absorptionsspektrum for klorofyl *b*, karotenoider og klorofyl *a*. Sammenlign med den skitse af absorptionskurven som er lagt ind over grønalgeforsøget i figur 6. Den sorte kurve viser den relative aktivitet i iltproduktionen, som ses at hænge tæt sammen med absorptionen af fotoner i klorofyl *a* og *b*. Figur med tilladelse fra [3].

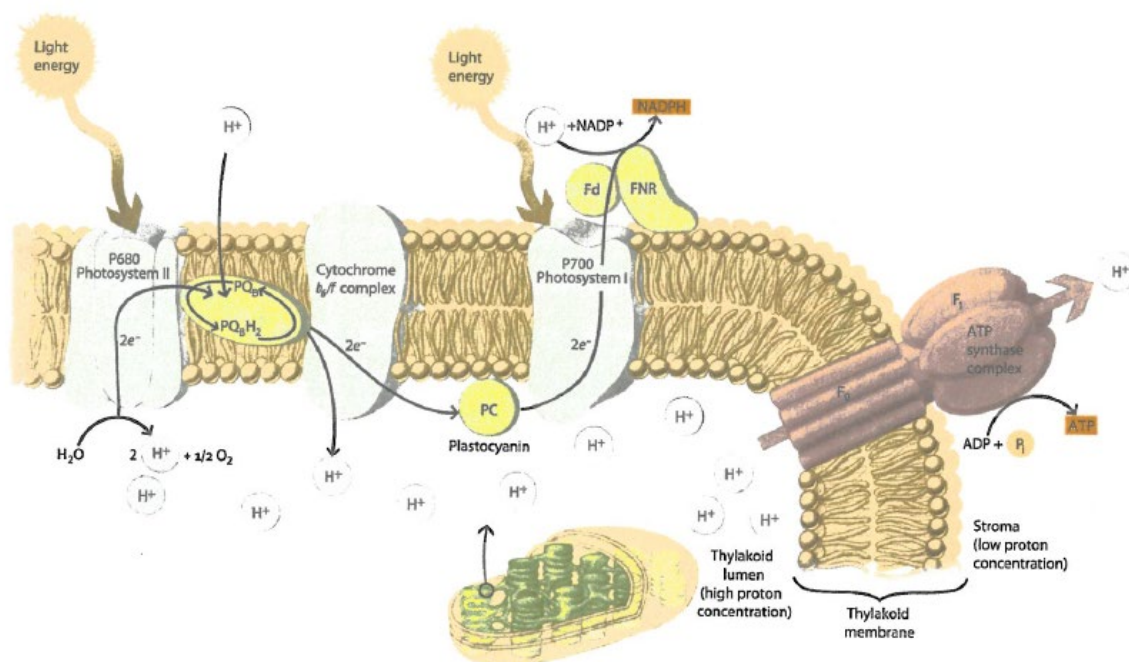
For at indbygge fotonernes energi i nye stoffer, kræves en kemisk proces. Hjertet i flytningen af energi fra exciteret klorofyl til egentlig stofomdannelse er et magnesiumcenter i klorofyl *a*:



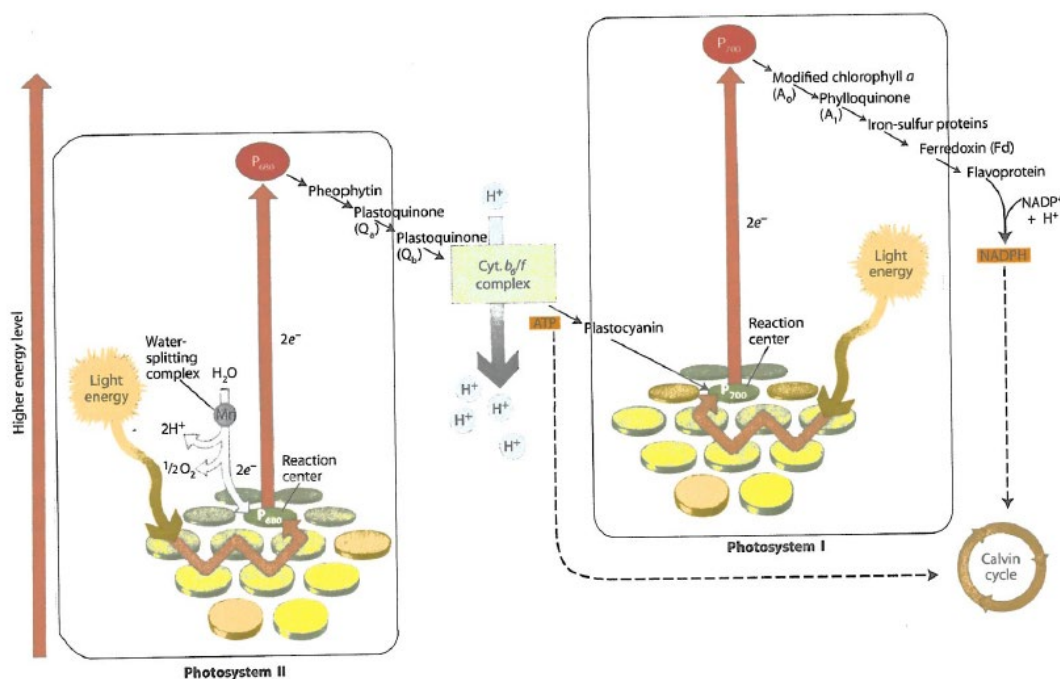
Figur 8. Strukturen i klorofyl *a*. Det aktive center med en magnesiumion i midten er markeret med blå. Den hydrofobe hale er anker til hydrofobe proteiner i tylakoidmembranen. Figur med tilladelse fra [3].

### Fotosystemerne og tylakoidmembranen

De to typer af klorofyl, *a* og *b* er bygget ind i såkaldte fotosystemer, fotosystem 1 og fotosystem 2 sammen med karotenoiderne. Alle tre typer molekyler kan absorbere fotoner, men det er kun klorofylerne, der kan overføre energien til kemiske omdannelser. Figur 9 og 10 viser skitser af de to fotosystemer. Vi ser, at indbygningen af fotonenergi er en to-trinsproces hvis resultat er spaltning af vand og dannelse af "energimolekylet" ATP samt NADPH. Retningen mellem de to trin drives af en koncentrationsforskel af brintioner fra vandspaltningen. Brintionerne fra vandspaltningen frigives nemlig på den ene side af den membran, som omslutter thylakoiderne i planternes grønkorn.



Figur 9. Tylakoid-membran i grønkorn med fotosystem 2 og fotosystem 1. Det er i fotosystem 1, at syntesen af energirige molekyler foregår, med andre ord: Det er her lys bliver til stof. For at processen kan fortsætte skal der være en vis koncentration af protoner uden for membranen. Forsyningen hermed sker fra indersiden, hvor koncentrationen er høj, til ydersiden gennem ATP-syntase-komplekset, som "pumper" protoner ud gennem membranen. (ATP står for adenosintrifosfat). Cellen for neden i figuren er et grønkorn. Figur med tilladelse fra [3].



Figur 10. Fotosystem 2 og fotosystem 1 virker tilsammen i en trinvis proces. Resultatet er at den flygtige energi ved fotonabsorptionen i klorofylerne overføres til nye, energirige molekyler, NADPH og ATP, som leverer energi blandt andet til opbygning af kulhydrater. Denne opbygning er ganske kompliceret og starter med udbyttet fra Calvinkredsen, som drives af energien i ATP og NADPH (NADP<sup>+</sup> står for nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat). Udbyttet fra Calvinkredsen er PGAL (glyceraldehyd 3-fosfat), som danner grundlag for syntese af sukker, stivelse og andre celledkomponenter. Figur med tilladelse fra [3].