

Ćwiczenie nr 6

Metabolizm węglowodanów – utlenianie glukozy w warunkach tlenowych z udziałem drożdży

Celem ćwiczenia jest:

- utlenianie glukozy w warunkach tlenowych, przy udziale enzymów komórek drożdży
- badanie przemian glukozy w obecności związków hamujących różne etapy glikolizy lub mitochondrialnego transportu elektronów
- ilościowe oznaczenie glukozy metodą Somogyi-Nelsona

Wstęp teoretyczny

W komórkach wszystkich tkanek i narządów glukoza ulega fosforylacji do glukozo-6-fosforanu pod wpływem izoenzymów heksokinazy, kosztem energii ATP. Szybkość estryfikacji glukozy w komórkach jest w przybliżeniu tego samego lub podobnego rzędu co szybkość transportu nośnikowego, stąd praktycznie w obrębie komórek wolna glukoza nie występuje. Ufosforylowana glukoza nie przechodzi przez błonę cytoplazmatyczną poza komórkę, a powstający glukozo-6-fosforan jest bezpośrednim bądź pośrednim substratem w różnych torach metabolicznych przemiany węglowodanowej. Jego losy są zależne od okresów w ciągu doby (poposiłkowych i międzytrawiennych) oraz od specyfiki funkcjonalnej danej tkanki. Niektóre tory metaboliczne przemiany węglowodanowej przebiegają w komórkach wszystkich tkanek i narządów, chociaż z różną szybkością, zaś inne tylko w określonych tkankach. Stąd zużycie glukozy jest różne w poszczególnych tkankach. Glikoliza oraz tor pentozofosforanowy, dwa podstawowe kataboliczne tory przemiany węglowodanowej zachodzą w komórkach wszystkich tkanek i narządów. Podobnie jest z glikozylacją, prowadzącą do wytworzenia glikoprotein, jak również z syntezą glikozaminoglikanów, a następnie proteoglikanów. Z kolei synteza glikogenu (glikogenogeneza), a także degradacja tego związku (glikogenoliza) zachodzą tylko w wątrobie i w mięśniach. Natomiast synteza glukozy (glukoneogeneza) z metabolitów niecukrowych, (kwas mlekowy, glicerol i aminokwasy cukrotwórcze), ma miejsce w wątrobie oraz w korze nerek. Ponadto w wątrobie glukoza powstaje także z nadmiaru przyjętych z pożywieniem innych heksoz (fruktoza i galaktoza oraz mannoza).

Prawidłowe stężenie glukozy we krwi zależy z jednej strony od szybkości uwalniania tego cukrowca przez wątrobę lub jelito (dostarczanie do krwi), zaś z drugiej strony od szybkości pobierania go przez pozostałe tkanki (usuwanie z krwi). Należy podkreślić, że magazynowanie glukozy w formie glikogenu w wątrobie jest konieczne dla dostarczania jej do innych tkanek, które nie mogą magazynować tego cukrowca. Jest to szczególnie istotne w przypadku tych tkanek, w których glukoza jest podstawowym substratem energetycznym,

np. dla mózgu.

W ciągu całej doby nośniki GLUT-1 i GLUT-3 zapewniają dopływ glukozy do komórek mózgu, w których głównym torem przemiany węglowodanowej jest glikoliza. Pirogronian, końcowy produkt glikolizy, przedostaje się z cytoplazmy do mitochondriów, gdzie ulega karboksylacji do szczawiooctanu oraz dekarboksylacji tlenowej do acetylo~CoA. Pierwsza z tych reakcji zachodzi pod wpływem karboksylazy pirogronianu, a druga przy udziale kompleksu multienzymatycznego dehydrogenazy pirogronianowej. Następnie kondensacja acetylo~CoA ze szczawiooctanem przy udziale syntetazy cytrynianowej (ze zużyciem ATP) prowadzi do wytworzenia cytrynianu. Zapewnia to prawidłową szybkość cyklu Krebsa, w trakcie którego powstają dwie cząsteczki dwutlenku węgla i trzy cząsteczki zredukowanego dinukleotydu nikotynamidoadeninowego $\text{NADH}+\text{H}^+$, które są bezpośrednio utleniane w łańcuchu oddechowym. Redukcja pośredników łańcucha oddechowego, zaś w końcowym efekcie tlenu powoduje powstawanie cząsteczek wody. Równoległe do łańcucha oddechowego zachodzi fosforylacja tlenowa, czyli wytwarzanie ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego. W tkance mózgowej ponad 70% wytworzonego ATP (na drodze fosforylacji substratowej i tlenowej) jest wykorzystywane na utrzymanie potencjału błonowego. Prawidłowy przebieg glikolizy, cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego jest więc szczególnie uzależniony od dopływu substratu, jakim jest glukoza, a także od dopływu tlenu. W ciągu doby mózg zużywa średnio 120 g glukozy. Natomiast z 16–20 moli tlenu przyjmowanych w ciągu tego samego okresu, aż 25% jest właśnie wykorzystywane przez mózg (o wadze około 1,2 kg). W mózgu cykl Krebsa jest także istotny dla utrzymania odpowiedniego stężenia związków pośrednich jak, na przykład kwasu α -ketoglutazarowego, uczestniczącego w wiązaniu toksycznych jonów amonowych.

W ciągu całej doby glukoza jest również podstawowym substratem energetycznym dla erytrocytów. Jest ona transportowana przy udziale nośnika GLUT-1. Erytrocyty są komórkami o ograniczonym zapotrzebowaniu energetycznym, bo nie zawierają ani jądra i mitochondriów, ani lizosomów i aparatu Golgiego. Cząsteczki ATP, powstające w tych komórkach podczas fosforylacji substratowej, zachodzącej w trakcie glikolizy, są zużywane głównie na utrzymanie gradientu stężeń elektrolitów i potencjału spoczynkowego błony. Powstający jako produkt glikolizy pirogronian musi być więc zredukowany do mlecza, który jest usuwany do krwi na drodze dyfuzji niejonowej, bądź transportem nośnikowym na zasadzie symportu (anion mleczanowy i jon H^+). Mleczan przedostaje się do wątroby, gdzie jest wykorzystywany do syntezy glukozy. Przechodzenie mleczanu z erytrocytów do wątroby, a następnie uwalnianie wytworzonej glukozy, z powrotem do krwi zwane jest cyklem Corrich. Do odrębności metabolicznych w zakresie glikolizy w erytrocytach należy także zdolność przekształcania 1,3-difosfoglicerynianu w 2,3-difosfoglicerynian, z równoczesnym ominięciem pierwszej reakcji fosforylacji substratowej. Związek ten zmniejszając powinowactwo hemoglobiny do tlenu, ułatwia dysocjację oksyhemoglobiny na hemoglobinę i tlen. Ponieważ reakcja ta musi zachodzić dostatecznie szybko, stężenie 2,3 difosfoglicerynianu w erytrocytach jest tego samego rzędu, co stężenie hemoglobiny. W erytrocytach część glukozy jest też zużywana w torze pentozofosforanowym, przy czym szczególnie ważny jest oksydacyjny, nieodwracalny pierwszy etap tego toru, w trakcie którego następuje redukcja dinukleotydu NADP do $\text{NADPH}+\text{H}^+$. Zredukowany dinukleotyd $\text{NADPH}+\text{H}^+$ jest niezbędny do redukcji glutationu w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową. Z kolei zredukowany glutation przy współudziale seleno-zależnej peroksydazy glutationu uczestniczy w usuwaniu nadtlenu wodoru. Należy pamiętać, że nadtlenek wodoru ułatwia utlenianie

jonów metali przejściowych (miedzi i żelaza), co prowadzi do powstawania reaktywnego rodnika hydroksylowego, a następnie także innych reaktywnych form tlenu. Uszkadzają one błonę komórkową utleniając przede wszystkim nienasycone kwasy tłuszczowe wchodzące w skład lipidów błonowych. W przypadku erytrocytów uszkodzenie błony prowadzi do hemolizy. Odpowiedni poziom zredukowanego glutationu zapobiega też wytwarzaniu methemoglobiny z hemoglobiny.

Wątroba jest narządem, w którym tor metaboliczny przemiany węglowodanowej przebiega inaczej po posiłkach niż w okresach międzytrawiennych. Po posiłkach przede wszystkim zachodzi szybkie przekształcanie glukozy w glukozo-6-fosforan nie tylko pod wpływem heksokinazy, ale także glukokinazy. Izoenzymy te różnią się powinowactwem do glukozy (glukokinaza ma znacznie wyższą wartość K_m i może działać przy dużym stężeniu glukozy), oraz mają odmienną wrażliwość na glukozo-6-fosforan (heksokinaza jest hamowana przez glukozo-6-fosforan). Tak więc fosforylacja przy współudziale obydwóch kinaz, powoduje, że stężenie wolnej glukozy w hepatocytach jest minimalne nawet przy dużym posiłku węglowodanowym. Sprzyja to dalszemu napływowi tego cukrowca do komórek wątroby. W hepatocytach, zachodzi wtedy przede wszystkim uzupełnianie zapasu glikogenu. Należy podkreślić, że substancją wyjściową oprócz glukozy mogą być także inne heksozy, a nawet związki niecukrowe, a przede wszystkim mleczan. Wytworzony z tych związków glukozo-6-fosforan ulega izomeryzacji do glukozo-1-fosforanu pod wpływem fosfoglukomutazy. Powstająca następnie, z glukozo-1-fosforanu i UTP pod wpływem pirofosforylasy UDP-glukozy, aktywna glukoza (UDPG) jest już bezpośrednim substratem zużywanym do syntezy glikogenu, przy czym enzymem kluczowym jest tu syntaza glikogenowa. Proces ten polega przeważnie na wydłużaniu łańcucha polisacharydowego na „primerze” glikogenowym, a czasami rozpoczyna się od „primera” białkowego zwanego glikogeniną. Zawsze jednak pod wpływem syntazy glikogenowej tworzą się wiązania glikozydowe typu $\alpha 1,4$, oraz uwalnia się nieorganiczny pirofosforan. Ulega on hydrolizie pod wpływem pirofosfatazy, co warunkuje nieodwracalność powstawania wiązania glikozydowego pomiędzy C-1 aktywnej glukozy i C-4 końcowych reszt glukozowych w glikogenie. W ten sposób wątroba „przygotowuje” zapas glikogenu dla okresów międzytrawiennych. Glikogen w wątrobie stanowi około 6% masy mokrej tkanki.

Jeżeli po posiłku, stężenie glukozy w żyłach wrotnej utrzymuje się w granicach 7–9 mmol/l, to w wątrobie dominuje magazynowanie glikogenu, zaś nasilenie glikolizy jest tylko umiarkowane. Przy diecie wysokowęglowodanowej, obok resyntezy glikogenu intensywnie zachodzi zarówno glikoliza, jak i tor pentozofosforanowy, zaś w konsekwencji synteza kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Wtedy glikoliza może zachodzić nawet z 10-krotnie większą szybkością niż w innych tkankach. Obok dużego stężenia substratu (napływ glukozy) nasila się także aktywność enzymów kluczowych, takich jak fosfofruktokinaza-I i kinaza pirogronianowa. Kończącym produktem glikolizy jest pirogronian, który z cytoplazmy przedostaje się do mitochondriów transportem nośnikowym, na zasadzie symportu (jon pirogronianu z jodem H^+). Równoczesne wytwarzanie szczawiooctanu i acetylo-CoA prowadzi do powstawania cytrynianu, co warunkuje prawidłową szybkość cyklu Krebsa. Jednak nadmiar powstającego cytrynianu przedostaje się do cytoplazmy, gdzie powstały z tego związku acetylo-CoA jest substratem wyjściowym do syntezy kwasów tłuszczowych, jak również cholesterolu. W trakcie syntezy tych związków musi być wykorzystywana zredukowana forma dinukleotydu $NADP^+$, która powstaje w nieodwracalnym, oksydacyjnym etapie toru pentozofosforanowego. Wtedy nawet do 40% glukozy dostającej się do wątroby

może być metabolizowane na tej drodze. Powstające kwasy tłuszczowe są bezpośrednio zużywane do wytwarzania triacylogliceroli (TG). Część cholesterolu jest natomiast estryfikowana do jego estrów, zaś pozostała część zużywana do wytwarzania kwasów żółciowych. Zarówno TG, jak i cholesterol oraz jego estry, jako związki nierozpuszczalne w wodzie są wiązane we frakcji lipoproteinowej VLDL, usuwanej z wątroby do krwi bezpośrednio po jej wytworzeniu. Ponadto po posiłkach nasila się utlenianie aktywnej glukozy (UDPG) do UDP-glukuronianu. Związek ten w wątrobie jest zużywany w reakcjach sprzęgania z substancjami nierozpuszczalnymi w wodzie. Powstają wtedy glukuronidy z niektórymi substancjami endogennymi, takimi jak bilirubina i hormony steroidowe, a także ze związkami egzogennymi, przyjmowanymi na przykład z pokarmem, jak również z niektórymi lekami. Jednak UDP-glukuronian jest przede wszystkim zużywany do syntezy glikozaminoglikanów, a następnie proteoglikanów. Główną funkcją wątroby w okresach międzytrawiennych w zakresie przemiany węglowodanowej jest dostarczanie glukozy do krwi. Zachodzi więc wtedy degradacja, nagromadzonego w okresach poposiłkowych glikogenu.

W mięśniach, podobnie jak w wątrobie, nasilenie torów przemiany węglowodanowej, jest zależne od okresów w ciągu doby (poposiłkowych i międzytrawiennych). Po posiłkach insulina oprócz pozytywnego wpływu na nośnik GLUT-4, od czego jest uzależniona szybkość pobierania glukozy, zwiększa także aktywność heksokinazy-I. W mięśniach glukoza jest zużywana przede wszystkim do regeneracji zapasu glikogenu. W pierwszym etapie powstały glukozo-6-fosforan jest zamieniany w glukozo-1-fosforan, a ten ostatni w UDPG, substrat zużywany w trakcie syntezy glikogenu. Zawartość glikogenu w mięśniach, po uzupełnieniu zapasu, nawet po posiłkach nie przekracza 1–2% masy mokrej tkanki. Część glukozo-6-fosforanu jest wtedy również wykorzystywana do wytwarzania innych monosacharydów, heksozamin, kwasów sjałowych i kwasów uronowych oraz ich pochodnych, zużywanych w glikozylacji białek, a także w syntezie glikozaminoglikanów, a następnie proteoglikanów. Nadmiar niewykorzystanej glukozy, może być wtedy materiałem energetycznym dla mięśni, przy czym stopień nasilenia glikolizy zależy pośrednio od ilości węglowodanów w pożywieniu. Powstający w trakcie glikolizy pirogronian, po przedostaniu się z cytoplazmy do mitochondriów, w mięśniach ulega głównie karboksylacji do szczawiooctanu. Acetylo~CoA jest bowiem wytwarzany z kwasów tłuszczowych w trakcie β -oksydacji. Kwasy tłuszczowe stanowią podstawowy materiał energetyczny dla tej tkanki, stąd w ciągu całej doby w mięśniach jest wystarczająca ilość acetylo~CoA. Pirogronian może być też zużywany do wytwarzania alaniny, która przedostaje się do krwi, a następnie do wątroby (cykl alaninowy). W okresach międzytrawiennych pobieranie glukozy przez mięśnie jest ograniczone. Podobnie jak w wątrobie, zachodzi wtedy degradacja glikogenu na drodze glikogenolizy. Powstający glukozo-1-fosforan jest przekształcany w glukozo-6-fosforan. Ze względu na brak w mięśniach fosfatazy glukozo-6-fosforanu, związek ten jest zużywany przede wszystkim w glikolizie. W trakcie degradacji jednej cząsteczki glukozo-6-fosforanu powstają dwie cząsteczki ATP na drodze fosforylacji substratowej (wytwarzanie ATP kosztem innych związków wysokoenergetycznych, jak kwas 1,3 difosfoglicerynowy oraz 2-fosfoenolopirogronian, a także bursztynilo~CoA) i zachodzi w cytoplazmie oraz w mitochondriach. Zaś fosforylacja tlenowa przebiega w mitochondriach i prowadzi do wytwarzania ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego, kosztem energii uzyskiwanej w trakcie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym. W mięśniach szybkość glikolizy musi być jednak zawsze wystarczająca do wytwarzania takiej ilości pirogronianu, a następnie szczawiooctanu, która zapewniłaby

prawidłową szybkość cyklu Krebsa. Acetylo~CoA powstaje wtedy w trakcie degradacji kwasów tłuszczowych (β -oksydacja). Ponadto znacznie większa ilość pirogronianu jest przekształcana do alaniny w okresach międzytrawiennych niż po posiłkach.

W mięśniach, zależnie od potrzeb zmienia się szybkość glikolizy. Przyjmuje się, że w spoczynku mięśnie zużywają tylko około 30% tlenu pobieranego przez organizm. Stąd przy nadmiernym wysiłku, w trakcie którego dochodzi do niedotlenienia mięśni, zwiększa się szybkość glikogenolizy, a następnie glikolizy. Zużycie glukozy jest więc większe niż w stanie spoczynku. Mięśnie są wyjątkową tkanką, w której szybkość fosforylacji substratowej może być wystarczająca do uzyskania potrzebnej ilości ATP, ale tylko przez krótki okres czasu. W tych warunkach zasadniczym problemem jest reoksydacja zredukowanego dinukleotydu $\text{NADH}+\text{H}^+$. Redukcja NAD zachodzi podczas utleniania aldehydu 3-fosfoglicerynowego do 1,3-difosfoglicerynianu, przy współudziale dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego. W warunkach ograniczonego dostępu tlenu taka reoksydacja zachodzi w cytoplazmie, a nie w mitochondriach. Dla odtworzenia utlenionej formy koenzymu NAD^+ pirogronian jest redukowany do mleczanu. Enzymem katalizującym tę reakcję jest dehydrogenaza mleczanowa współdziałająca z $\text{NADH}+\text{H}^+$. Reakcja ta zapewnia więc regenerację dinukleotydu NAD^+ , na skutek czego glikoliza może zachodzić nawet przy bardzo ograniczonym dostępie tlenu. Nadmiar mleczanu jest usuwany do krwi na drodze dyfuzji niejonowej bądź transportem nośnikowym na zasadzie symportu. Istotne jest usunięcie jonów H^+ poza komórkę, bowiem wtedy następuje dalsze nasilenie glikolizy. Z krwi mleczan przedostaje się do wątroby, gdzie jest wykorzystywany do syntezy glukozy. Przechodzenie mleczanu z mięśni do wątroby, a następnie jego przekształcanie w glukozę, która poprzez krew może ponownie „wędrować” do mięśni nazywane cyklem Corich, zachodzi przy niedotlenieniu. Tak więc podczas wysiłku poziom glukozy we krwi, konieczny do funkcjonowania mózgu, ale także mięśni szkieletowych, jest podtrzymywany na skutek nasilenia glukoneogenezy przebiegającej w wątrobie. Substratem wykorzystywanym wtedy w dużym stopniu jest mleczan wytwarzany w mięśniach.

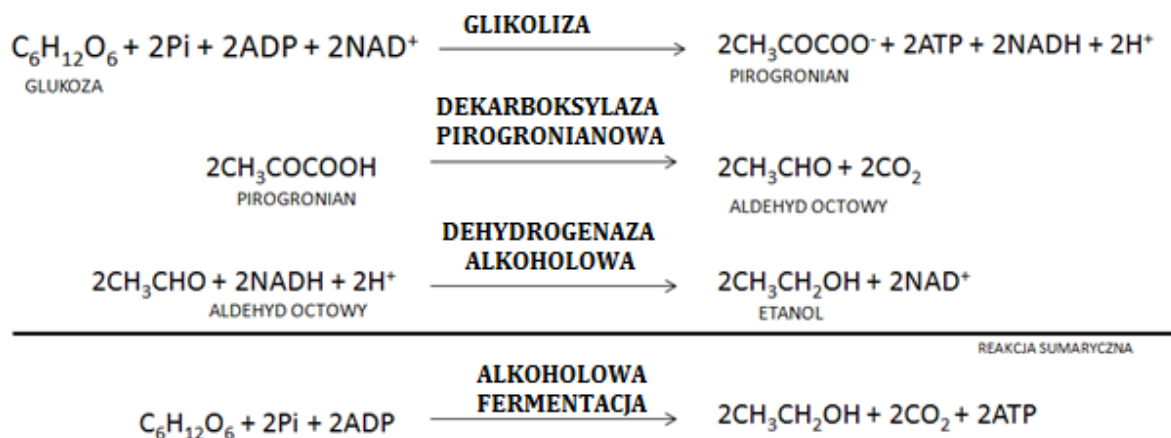
Tkanka tłuszczowa jest najbardziej wrażliwa na działanie insuliny, stąd po posiłku glukoza bardzo szybko przedostaje się do adipocytów przy udziale nośnika GLUT-4. Proporcjonalnie do ilości pobranej glukozy, nasila się wtedy szybkość glikolizy. Powstający fosfodihydroksyaceton ulega redukcji do fosfoglicerolu pod wpływem dehydrogenazy fosfoglicerolu działającej z dinukleotydem NAD^+ . Fosfoglicerol jest zużywany wraz z napływającymi kwasami tłuszczowymi do syntezy triacylogliceroli (TG), które są następnie magazynowane w adipocytach, jako rezerwa energetyczna ustroju. Gdy napływ glukozy do adipocytów jest zbyt duży, a ilość ATP wystarczająca, pirogronian ulega redukcji do mleczanu, który jest następnie usuwany do krwi. Podobnie jak w pozostałych tkankach pewna ilość glukozy jest przekształcana do innych monosacharydów, heksozamin, kwasów sjałowych i kwasów uronowych oraz ich pochodnych, zużywanych w glikozylacji białek oraz do syntezy glikozaminoglikanów, a następnie proteoglikanów. W tkance tłuszczowej tor pentozofosforanowy zachodzi wolno i to głównie nieoksydacyjny, odwracalny etap tego toru. W okresach międzytrawiennych transport glukozy do komórek insulinozależnej tkanki tłuszczowej jest w bardzo znacznym stopniu zahamowany, co ogranicza szybkość glikolizy, podobnie jak inne tory przemiany węglowodanowej.

Glukoza, jako substancja dobrze rozpuszczalna w wodzie jest łatwo transportowana w osoczu krwi. Jednak jej przechodzenie do komórek jest już uwarunkowane sprawnością nośników glukozowych. Po przedostaniu się do komórek glukoza wchodzi w tory

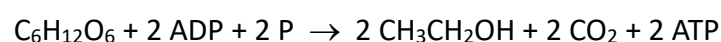
metaboliczne przemiany węglowodanowej, zależnie od specyfiki funkcjonalnej danej tkanki. Przy ocenie przemiany węglowodanowej w organizmie należy też uwzględnić występujące po sobie w ciągu doby okresy poposiłkowe i międzytrawienne. Szybkość torów metabolicznych przemiany węglowodanowej, jest zawsze regulowana hormonalnie. Utrzymanie prawidłowego stężenia glukozy we krwi zależy głównie od działania takich hormonów jak insulina, glukagon, aminy katecholowe i kortyzol. Oznaczanie stężenia glukozy, jako jedno z ważnych i często wykorzystywanych badań diagnostycznych w płynach ustrojowych, daje pewną możliwość wglądu w przemianę węglowodanową. Zmiany stężenia glukozy we krwi mogą być bowiem pierwszym sygnałem zaburzenia nie tylko w obrębie przemiany węglowodanowej, ale także lipidowej.

Fermentacja alkoholowa glukozy

Organizmami zdolnymi do fermentacji alkoholowej, polegającej na degradacji glukozy do alkoholu etylowego, są przede wszystkim drożdże. Fermentacja alkoholowa do etapu wytwarzania pirogronianu nie różni się od glikolizy. Powstający z glukozy w warunkach tlenowych pirogronian jest utleniany dalej do acetyloCoA, bądź karboksylowany do szczawiooctanu. Zapewnia to prawidłowy przebieg cyklu Krebsa, a następnie łańcucha oddechowego, co prowadzi do powstawania ATP na drodze fosforylacji tlenowej.

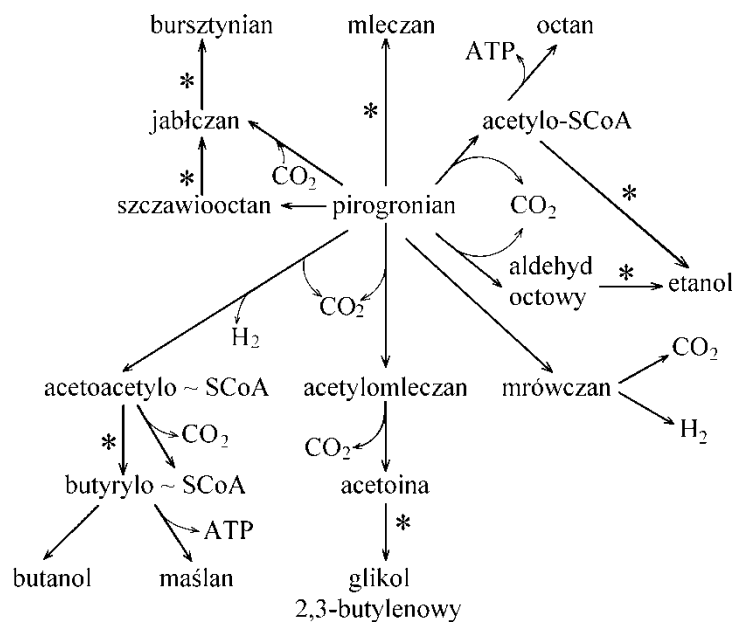


W warunkach ograniczonego dostępu tlenu następuje upośledzenie procesów mitochondrialnych. W drożdżach dochodzi do nasilenia fermentacji alkoholowej, w trakcie której pirogronian jest metabolizowany do etanolu. Biorą w tym udział dwa enzymy. W pierwszym etapie pirogronian ulega nieoksydacyjnej dekarboksylacji do aldehydu octowego. Reakcja zachodzi pod wpływem dekarboksylazy pirogronianowej, współdziałającej z pirofosforanem tiaminy TPP (brak u człowieka). Jest to reakcja nieodwracalna, stąd można przyjąć, że bezpośrednio po wytworzeniu aldehyd jest redukowany do etanolu przy udziale dehydrogenazy alkoholowej. Utworzony alkohol jest końcowym produktem fermentacji alkoholowej, którą sumarycznie można zapisać:



Donorem atomów wodoru jest zredukowany dinukleotyd $\text{NADH}+\text{H}^+$, powstający podczas utlenienia aldehydu 3-fosfoglicerolowego do kwasu 1,3-difosfoglicerolowego. Redukcja aldehydu octowego do etanolu umożliwia regenerację NAD^+ , zaś w konsekwencji powoduje nasilenie fermentacji etanolowej w warunkach ograniczonego dostępu tlenu. ATP powstaje wtedy na drodze fosforylacji substratowej.

Są także drobnoustroje w których może zachodzić fermentacja mleczanowa. Wtedy regeneracja NAD^+ następuje w trakcie redukcji pirogronianu do mleczanu pod wpływem dehydrogenazy mleczanowej współdziałającej z dinukleotydem $\text{NADH}+\text{H}^+$, jako dawcą wodorów. Ponadto u jeszcze innych drobnoustrojów występują różne modyfikacje fermentacji lub zupełnie odrębne procesy, których celem jest regeneracja powstającego w glikolizie zredukowanego dinukleotydu $\text{NADH}+\text{H}^+$ do NAD^+ . Jak się podaje, wśród końcowych produktów tych reakcji mogą być takie metabolity, jak propionian, jabłczan, maślan, octan lub mrówczan. Procesy te, zachodzące przy ograniczonym dostępie tlenu, stanowią pewien rodzaj przystosowania bakterii do wytwarzania energii metabolicznej na drodze fosforylacji substratowej.



Schemat przebiegu różnego typu fermentacji.

W komórkach drożdży glukoza może być metabolizowana zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Ekstrakt bezkomórkowy drożdży, powstały przez autolizę (liza komórek spowodowana w odpowiednich warunkach ich własnymi enzymami hydrolitycznymi), inkubowany jest z glukozą. Przemiany glukozy mogą być badane dodatkowo w obecności związków, które są inhibitorami różnych etapów glikolizy lub mitochondrialnego transportu elektronów. Prowadzi to do mniejszego zużycia glukozy. Inhibitorami glikolizy są:

- jodooctan – związek hamujący aktywność dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego przez kowalencyjne blokowanie grup $-\text{SH}$ istotnych dla funkcji katalitycznych enzymu,
- fluorek – hamujący aktywność enolazy, która wytwarza kompleks z dwuwartościowymi kationami Mg^{2+} przed związaniem substratu. Jony fluorkowe blokują przyłączenie substratu,

tworząc w miejscu aktywnym w obecności P_i , kompleks z Mg^{2+} i inaktywują w ten sposób enzym,

- azydek – podobnie jak CN^- , hamuje transport elektronów przez kompleks IV (oksydaza cytochromowa) łańcucha oddechowego.

Część doświadczalna

Zasada metody oznaczania glukozy wg Somogyi-Nelsona

Stężenie glukozy w badanych próbkach oznacza się kolorymetrycznie metodą Somogyi-Nelsona. Jest ona oparta na właściwościach redukcyjnych glukozy, związanych z obecnością grupy aldehydowej. W metodzie tej ilość jonów Cu^{2+} redukowanych do tlenku miedzi (I) jest proporcjonalna do ilości grup redukcyjnych w próbce, a więc tym samym ilości zawartej glukozy. Ilość powstałego Cu_2O można oznaczyć kolorymetrycznie w wyniku reakcji z nadmiarem kwasu arseno – lub fosfomolibdenowego, który ulega redukcji do niebiesko zabarwionego błękitu molibdenowego, oznaczanego przez pomiar absorbancji przy $\lambda=660$ nm. Stężenie glukozy w badanej próbce odpowiada stężeniu błękitu molibdenowego.

Procedura

W trakcie ćwiczeń należy przygotować trzy (I-III) zestawy próbek.

1. Ponumeruj próbki od 1 do 8 (zestaw I, małe próbki):

- Probówki 1-3 – próby kontrolne z glukozą (bez ekstraktu drożdżowego, bez inhibitorów)
- Probówka 4 – próba kontrolna z zawiesiną drożdży (bez glukozy, bez inhibitorów)
- Probówka 5 – próba badana (z glukozą, bez inhibitorów)
- Probówki 6-8 – próby badane (z glukozą i inhibitorami)

2. Przygotuj zawartość próbek zgodnie z tabelą. Rozpocznij od dodania do próbek wody i buforu, następnie dodaj inhibitory oraz zawiesinę drożdży. Na końcu dokładnie wymieszaj zawartość próbek.

Próba	H ₂ O	Bufor fosforanowo - potasowy 0.06 M (pH 7,4) (ml)	0,2 M jodoocetan (ml)	0,3 M NaF (ml)	3% azydek (ml)	Zawiesina drożdży (ml)
1,2,3	1,6	0,7				
4	1,8	0,7				0,5
5	1,1	0,7				0,5
6	0,4	0,7	0,7			0,5
7	0,4	0,7		0,7		0,5
8	0,4	0,7			0,7	0,5

3. Probówki 5-8 inkubuj w łaźni wodnej, w temperaturze 37 °C, przez 5 min.

4. Po zakończeniu inkubacji, do próbek 5-8 (zestaw I) dodaj po 0,7 ml 0,06 M roztworu glukozy. Następnie wymieszaj zawartość próbek i inkubuj przez kolejne 10 min w łaźni wodnej w temperaturze 37 °C.

5. Do próbek 1-3 (próby nieinkubowane) dodaj po 0,7 ml 0,06 M roztworu glukozy.

6. Przygotuj zestaw II małych probówek. Ponumeruj probówki od 1 do 8, a następnie do każdej z nich dodaj po 1 ml 0,15 M roztworu Ba(OH)₂.
7. Z probówek 1-8 zestawu I pobierz po 0,5 ml mieszaniny i przenieś do nowych probówek 1-8 zestawu II.
8. Do wszystkich probówek zestawu II dodaj po 1 ml 5% roztworu ZnSO₄. Zawartość probówek dokładnie wymieszaj.
9. Z probówek 1-8 zestawu II pobierz po 1,5 ml mieszaniny inkubacyjnej i przenieś do 8 mikroprobówek typu Eppendorf.
10. Zawartość mikroprobówek odwiruj przy użyciu wirówki laboratoryjnej (10 min, 6100 rcf).

Procedura oznaczenia glukozy metodą Somogyi-Nelsona

1. Przygotuj 9 dużych probówek (zestaw III), ponumeruj je od 1-8 oraz dodatkowo „0”.
2. Przygotuj zawartość probówek zgodnie z tabelą. Na końcu dokładnie wymieszaj zawartość probówek.

	Supernatant z zestawu II (ml)	Woda destylowana (ml)	Odczynnik miedziowy (ml)
Próby 1-8	0,2	-	0,2
„0”	-	0,4	0,4

3. Ogrzewaj wszystkie probówki we wrzącej łaźni wodnej przez 10 min. Następnie należy oziębic ostrożnie zawartość probówek pod bieżącą wodą.
4. Dodaj odczynnik fosfomolibdenowy zgodnie z poniższą tabelą i dokładnie wymieszaj zawartość probówek.
5. Uzupełnij zawartość probówek wodą destylowaną zgodnie z tabelą. Dokładnie wymieszaj zawartość probówek.

	Odczynnik fosfomolibdenowy (ml)	Woda destylowana (ml)
Próby 1-8	0,2	4
„0”	0,4	6

6. Zmierz absorbancję prób badanych przy długości fali 660 nm wobec próby ślepej („0”).