

TBT4107 Biokjemi 2

**Oppgave 4:**  
**Fermentering av karbohydrater og**  
**identifisering av disakkaridhydrolaser i gjær**

Gruppe 20

Katrine Bringe, Lene Brattsti Dypås og Ove Øyås

NTNU, 15. mars 2012

# Innhold

<b>Sammendrag</b>	<b>3</b>
<b>1. Teori</b>	<b>3</b>
1.1. Glykolysen . . . . .	3
1.2. Fermentering . . . . .	4
<b>2. Eksperimentelt</b>	<b>6</b>
<b>3. Resultater</b>	<b>6</b>
3.1. Fermentering av ulike karbohydrater . . . . .	6
3.2. Identifisering av disakkaridhydrolaser i gjær . . . . .	7
<b>4. Diskusjon</b>	<b>8</b>
<b>5. Konklusjon</b>	<b>9</b>
<b>Litteratur</b>	<b>10</b>
<b>A. Framstilling av blandinger for fermentering av ulike karbohydrater</b>	<b>11</b>
<b>B. Standardkurve for konsentrasjon av reduserte ender</b>	<b>12</b>
<b>C. Beregning av mengde sukrose og laktose spaltet per volumenhet</b>	<b>13</b>
<b>D. B-spørsmål</b>	<b>14</b>

# Sammendrag

I dette forsøket ble fermentering av ulike karbohydrater undersøkt for bakegjær ved måling av gassutvikling som funksjon av tid. Det ble også testet hvorvidt den kjente inhibatoren natriumfluorid hindret fermentering. Aktiviteten til disakkaridhydrolaser i en gjærløsning ble dessuten observert som endring i antall reduserende ender over tid for løsninger av laktose og sukrose.

Karbohydratene glukose, fruktose, sukrose, og maltose ble fermentert av gjæren. Laktose og galaktose ble ikke fermentert. Natriumfluorid hindret fermentering av glukose og fungerte således som en inhibitor av glukosemetabolismen. Fermenteringsprosessen kom raskest i gang for glukose og langsamst for maltose. Fruktose og sukrose ga lignende starthastigheter, begge mellom de to ytterverdiene for glukose og maltose, men starthastigheten for sukrose så ut til å være noe raskere enn for fruktose.

Mengden spaltet sukrose økte i løpet av forsøket mens mengden spaltet laktose ikke gjorde det. Sammen med resultatene fra fermenteringen, indikerer dette at sukrase finnes i den anvendte gjærtypen mens laktase ikke gjør det.

## 1. Teori

Teori er hentet fra kursheftet [1] og to ulike lærebøker [2, 3].

### 1.1. Glykolysen

#### Oversikt: Glykolysens to faser

Glykolysen (av gresk *glykys*, “søtt” eller “sukker”, og *lysis*, “splittelse”) er en nærmest universell metabolsk prosess, hvor et glukose-molekyl brytes ned til to pyruvat-molekyler i en serie enzymkatalyserte reaksjoner. Den finner sted i cellens cytosol hos både prokaryoter og eukaryoter og står i de fleste celler for det største bidraget til den totale karbonfluksen. Oversikt over glykolysen finnes i Figur 1.1. Av figuren kan det ses at prosessen kan deles inn i to faser, én som forbruker energi og én som gir energiutbytte i form av ATP, med fem reaksjonstrinn hver:

1. *Forberedende fase* (trinn ① - ⑤). Energien i ATP investeres med økning av den frie energien til de dannede intermediatene som resultat. Karbonkjedene til alle metaboliserte heksoser konverteres til et felles produkt, glyseraldehyd-3-fosfat.
2. *Gjenvinningsfase* (trinn ⑥ - ⑩). Et netto energiutbytte på to ATP-molekyler per glukosemolekyl hentes ut av prosessen. Energi konserveres også i form av to molekyler av elektronbæreren NADH.

Fluksen gjennom glykolysen, og dermed nedbrytningen av glukose, kan stanses ved inhibering av et av trinnene vist i Figur 1.1. Et eksempel på en inhibitor er natriumfluorid som hemmer aktiviteten til enolase, enzymet som katalyserer den reversible fjerningen av et vannmolekyl fra 2-fosfoglyserat i glykolysens trinn ⑨.

## Veier inn i glykolysen for fruktose og galaktose

Mange andre karbohydrater enn glukose møter sin katabolske skjebne i glykolysen ved transformasjon til et av de glykolytiske intermediatene. De viktigste er de energilagrende polysakkaridene glykogen og stivelse; disakkaridene maltose, laktose, trehalose og sukrose; og monosakkaridene fruktose, mannose og galaktose. Her ses det kun på tilførselsspor for fruktose og galaktose.

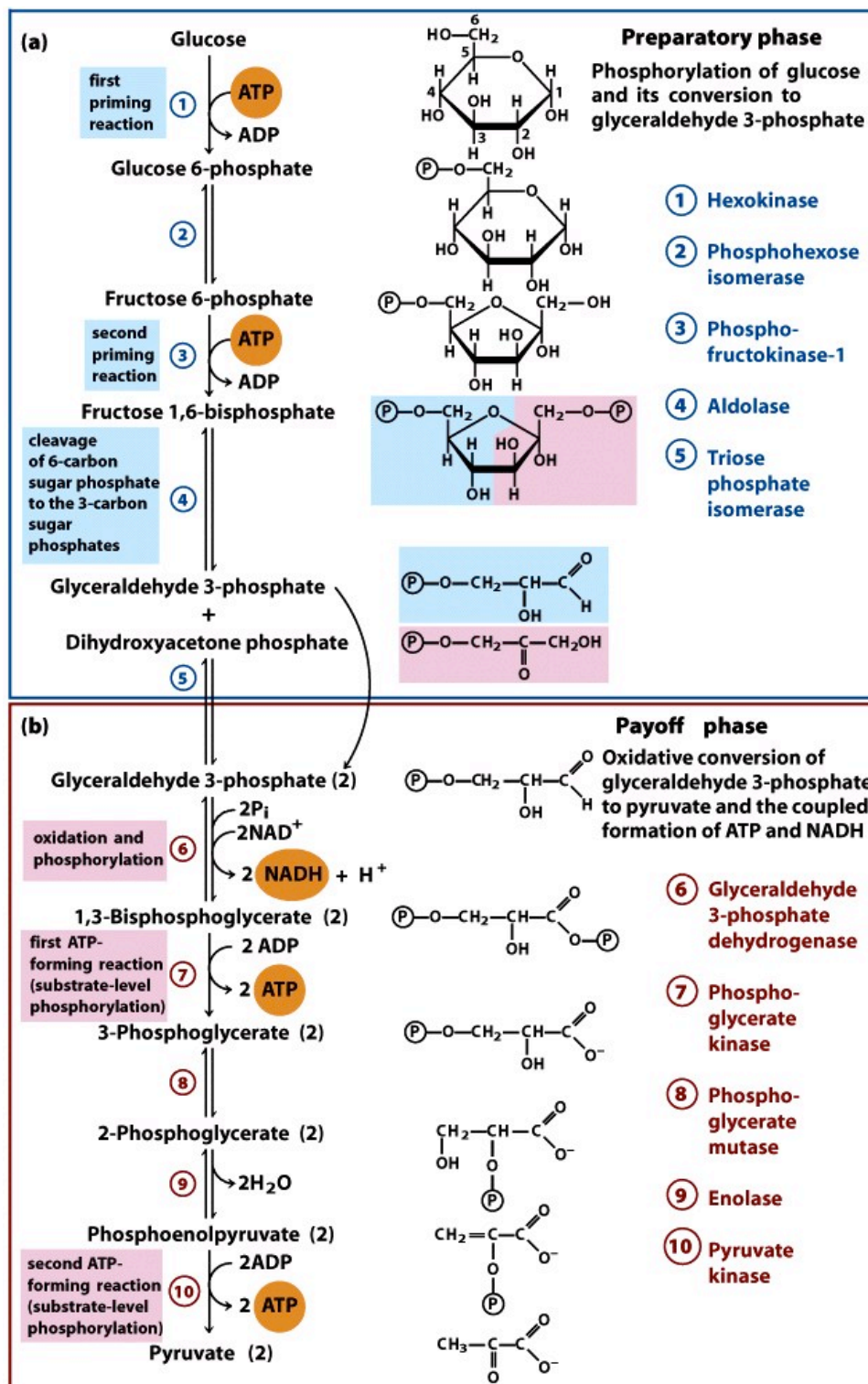
Fruktose går inn i glykolysen via et eget katabolsk spor kalt fruktose-1-fosfatsporet eller fruktolyse. Fruktose fosforyles her først av fruktokinase til fruktose-1-fosfat, som deretter gjennomgår aldolkløyving til triosene dihydroksyacetonfosfat og glyseraldehyd av fruktose-1-fosfat aldolase. Dihydroksyacetonfosfat er produkt i glykolysens trinn ④ og kan dermed gå direkte inn i glykolysens gjenvinningsfase, mens glyseraldehyd først må fosforyles av triose kinase til glyseraldehyd-3-fosfat.

Galaktose konverteres til glukose-6-fosfat i fire trinn. Det første involverer fosforyle-ring av galaktose til galaktose-1-fosfat med forbruk av ATP katalysert av galaktokinase. En uridylgruppe overføres deretter til galaktose-1-fosfat fra uridindifosfatglukose (UDP-glukose) slik at UDP-galaktose og glukose-1-fosfat blir dannet. Denne reaksjonen katalyseres av galaktose-1-fosfat uridyl transferase. Galaktosedelen av UDP-galaktose epimeriseres videre til glukose ved invertering av konformasjonen til hydroksylgruppen på 4'-karbonet katalysert av galaktose 4-epimerase. UDP-glukose som dannes i epimeriseringen kan donere sin uridylgruppe til et nytt galaktosemolekyl, mens galaktose-1-fosfat isomeriseres til glukose-6-fosfat av fosfoglukomutase. Glukose-6-fosfat er et glykolytisk intermediat og kan omdannes til pyruvat ved å gå inn i glykolysens trinn ②.

## 1.2. Fermentering

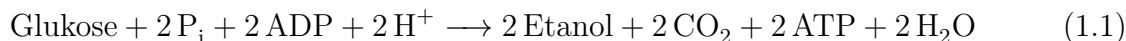
Under aerobe betingelser oksideres pyruvat som går ut av glykolysen til acetat (acetyl-CoA) som videre går inn i sitronsyresyklusen og oksideres til  $\text{CO}_2$  og  $\text{H}_2\text{O}$ . NADH dannet ved dehydrogeneringen av glyseraldehyd-3-fosfat reoksidert før eller siden til  $\text{NAD}^+$  ved elektronoverføring til  $\text{O}_2$  i mitokondriene. Under hypoksiske betingelser vil reoksidasjon av NADH imidlertid ikke være mulig, noe som kan ha store konsekvenser for cellen. Uten  $\text{NAD}^+$  vil cellen mangle elektronakseptor ved oksidasjon av glyseraldehyd-3-fosfat, noe som videre vil medføre stans i de energigivende reaksjonene i glykolysen. Regenerering av  $\text{NAD}^+$  er følgelig nødvendig.

Når vev i dyr ikke får tilstrekkelig oksygen til at den aerobe oksidasjonen av pyruvat og NADH kan opprettholdes, regenereres  $\text{NAD}^+$  ved reduksjon av pyruvat til laktat i en



Figur 1.1: Oversikt over glykolysen. (a) Forberende fase. (b) Gjenvinningsfase. Figuren er hentet fra en lærebok [2].

prosess kalt melkesyrefermentering. I enkelte plantevev, virveldyr, protister og mikroorganismer, eksempelvis gjær, konverteres pyruvat til etanol og CO<sub>2</sub> under hypoksiske (lite oksygen) eller anaerobe (ikke noe oksygen) forhold. Denne prosessen kalles etanolfementering. Nettoreaksjon for hele prosessen, fra inngang av glukose i glykolysen til dannelse av etanol ved fermentering, er



Gjær kan også fermentere flere andre karbohydrater, men dette forutsetter at cellene er i stand til å produsere de nødvendige enzymene for transport inn og ut av cellen samt degradering. Det finnes mange forskjellige former for gjær og disse er i stand til å fermentere ulike karbohydrater. For å spalte disakkarider til monosakkarider som kan fermenteres benytter gjær en klasse enzymer kalt disakkaridhydrolaser. Eksempler er sukrase, maltase og  $\beta$ -galaktosidase som bryter ned henholdsvis sukrose, maltose og galaktose til sine respektive monosakkarider.

## 2. Eksperimentelt

Forsøket ble utført som beskrevet i kursheftet [1] med unntak av at DNSA-analyse ikke ble utført på løsningene av laktose og sukrose før tilsats av gjær.

## 3. Resultater

På grunn av at DNSA-analyse ikke ble utført på løsningene av laktose og sukrose før tilsats av gjær, ble de korresponderende absorbansverdiene hentet fra rådata fra gruppe 4B. På grunn av stor ulikhet mellom egne absorbansverdier for laktose og absorbansverdien for laktose målt av gruppe 4B før tilsats av gjær, ble kun rådata fra gruppe 4B benyttet for laktose.

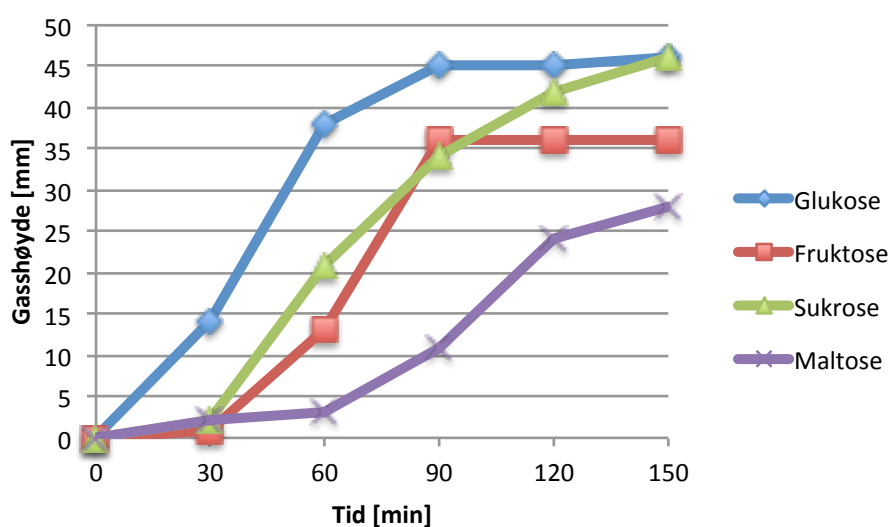
### 3.1. Fermentering av ulike karbohydrater

Det ble forberedt 7 små reagensrør med ulike sammensetning av gjærsuspensjon, vann, natriumfluorid (NaF) og 2% karbohydratløsning. Alle rør inneholdt gjærsuspensjon og karbohydratløsning og alle rør unntatt rør 2 ble fortynnet med vann. Inhibitoren natriumfluorid ble tilsatt i rør 2. Rørene ble tilsatt ulike typer sukker. For en oversikt over nøyaktig sammensetning i de ulike rørene vises det til Vedlegg A.

Rørene ble satt opp ned i glassrør med flat bunn slik at gassutvikling kunne registreres ved måling av høyden på gasslommene inne i rørene ved ulike tidspunkter. Gassutvikling ble registrert i rørene 1, 4, 5 og 7, mens det i de øvrige rørene ikke ble sett tegn til dannelse av gass. Rør 1 inneholdt glukose uten tilsatt inhibitor, rør 4 inneholdt fruktose,

rør 5 inneholdt sukrose og rør 7 inneholdt maltose. Plott av gassutvikling mot tid for rørene hvor det ble dannet gass er vist i Figur 3.1.

Det kan ses at mengden gass i rør 1 økte raskt i omtrent 90 minutter inntil stagnasjon ved en gasshøyde på rundt 45 mm. Omtrent det samme skjedde også i rør 2, hvor det ble observert gassutvikling med et platå rundt målingen som ble gjort etter 90 minutter. Gassutviklingen stagnerte i dette tilfellet ved omtrent 35 mm. Hastigheten til gassdannelsen var langsom innledningsvis, men ble raskere etter hvert. I rør 5 økte gasshøyden gjennom hele forsøket inntil en sluttverdi ved 150 minutter på i overkant av 45 mm ble nådd. Også her var gassutviklingen langsom i starten av forsøket og ble raskere etter noe tid. Gassutviklingen nådde ikke noe stagnasjonspunkt i løpet av forsøket. Også i rør 7 kan det tydelig ses at gassutviklingen gikk langsommere i starten enn mot slutten av forsøket. En verdi på rundt 28 mm ble avlest ved forsøkets slutt etter 150 minutter.

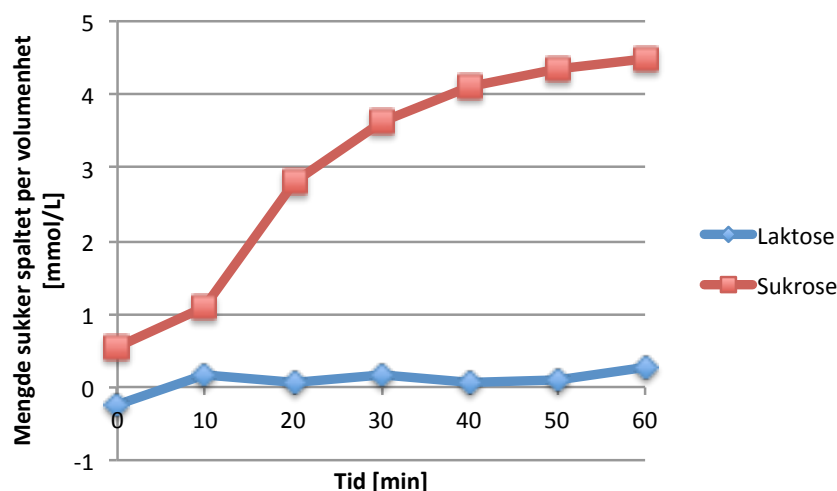


Figur 3.1: Plott av gasshøyde mot tid for rør med glukose uten tilsatt inhibitor, fruktose, sukrose og maltose.

### 3.2. Identifisering av disakkaridhydrolaser i gjær

Aktiviteten til disakkaridhydrolaser i en gjærløsning ble bestemt ved DNSA-analyse. 0,2% løsninger av lakose og sukrose ble tilsatt 1% gjærløsning og deretter satt i varmeskap for oppvarming til 37 °C. Prøver ble tatt ut og tilsatt DNSA før tilsats av gjær, rett etter tilsats av gjær og deretter med 10 minutters mellomrom over 60 minutter. Det ble utført tre paralleler for hver prøve og alle disse ble satt til koking før måling av absorbans ved 540 nm. Endring i konsentrasjonen av reduserte ender som funksjon av tid ble bestemt ved sammenligning av målte absorbansverdier med en standardkurve og videre benyttet til å bestemme endring i sukkerkonsentrasjon som funksjon av tid. Framstillingen av standardkurven er beskrevet i vedlegg B.

Mengde sukrose og laktose spaltet per volumenhet er plottet mot tid i Figur 3.2.



Figur 3.2: Plott av mengde sukrose og laktose spaltet per volumenhet mot tid.

Det kan tydelig ses at mengden spaltet sukrose økte i løpet av forsøket mens mengden spaltet laktose ligger stabilt omkring 0 mmol/L.

## 4. Diskusjon

Karbohydratene glukose, galaktose, fruktose og maltose ble fermentert av gjæren. Laktose og galaktose ble ikke fermentert, noe som antyder at gjæren mangler enzymer som er nødvendige for nedbrytning av disse karbohydratene. Det ble heller ikke observert fermentering i røret som var tilsatt natriumfluorid i tillegg til glukose. Ettersom glukose undergikk fermentering i et annet rør der natriumfluorid ikke var tilsatt, indikerer dette at natriumfluorid inhiberer nedbrytningen av glukose. Mer spesifikt antas det på bakgrunn av gitte opplysninger at natriumfluorid hemmer aktiviteten til enzymet enolase som katalyserer det nest siste trinnet i glykolysen [1].

Den initielle hastigheten til gassutviklingen varierende mellom de ulike rørene. Det er vanskelig å formulere noe kvantitativt om hvor stor denne forskjellen er, ettersom det ble utført få målinger, men basert på formen til de framstilte grafene og verdiene til de første målepunktene kan det slås fast at gassutviklingen kom i gang raskest i røret med glukose uten inhibitor og langsamst i røret med maltose. Rørene med fruktose og sukrose har lignende starthastigheter, begge mellom de to ytterverdiene for glukose og maltose. Det kan imidlertid se ut som om starthastigheten for sukrose er noe raskere for sukrose enn for fruktose. Dersom dette stemmer, kan en årsak være at glukose er en disakkarid bygd opp av fruktose og glukose, da det kan tenkes at glukosen som dannes ved spalting sørger for at fermenteringsprosessen kommer raskere i gang enn det som er tilfelle når det tas utgangspunkt i ren fruktose. Dette kan isåfall tyde på at spaltingsprosessen og



investeringsfasen i glykolysen tilsammen utgjør en raskere prosess enn omdannelsen av fruktose til glykolytiske intermediater.

Årsaken til at fermenteringen kom i gang raskere i noen rør enn i andre antas å være at de ulike sukrene følger ulike spor frem til fermenteringsprosessen. Kun glukose kan fermenteres og det er derfor rimelig at prosessen kommer raskest i gang i røret hvor det er tilsatt glukose, da alle andre karbohydrater først må brytes ned til glukose eller omdannes til et glykolytisk intermediat. Den intielle hastigheten til gassutviklingen reflekterer således altså tiden det tar for et gitt karbohydrat å omdannes til en forbindelse som kan gå inn på et eller annet punkt i glukosemetabolismen. Foruten glukose, ser dette ut til å skje raskest for fruktose og sukrose og en god del langsommere for maltose.

I andre del av forsøket ble det funnet at mengden spaltet sukrose økte i løpet av forsøket mens mengden spaltet laktose ikke gjorde det. Dette er en sterk indikator på at disakkaridhydrolasen sukrase, som er nødvendig for spalting av sukrose, finnes i den anvendte gjærtypen, mens laktase, som spalter laktose, ikke gjør det. Dette reflekterer resultatene fra forsøkets del 1, hvor gassutvikling ble observert i røret med sukrose, men ikke i røret med laktose.

## 5. Konklusjon

Karbohydratene glukose, fruktose, sukrose, og maltose ble fermentert av gjæren. Laktose og galaktose ble ikke fermentert. Natriumfluorid hindret fermentering av glukose og fungerte således som en inhibitor av glukosemetabolismen. Det antas at natriumfluorid inhiberer enzymet enolase i glykolysens nest siste trinn. Fermenteringsprosessen kom raskest i gang for glukose og langsamst for maltose. Fruktose og sukrose ga lignende starthastigheter, begge mellom de to ytterverdiene for glukose og maltose, men starthastigheten for sukrose så ut til å være noe raskere enn for fruktose. En mulig forklaring er at glukosen som dannes ved spalting av sukrose sørger for at fermenteringsprosessen kommer raskere i gang for sukrose enn for fruktose. Årsaken til at fermenteringen kom i gang raskere i noen rør enn i andre antas generelt å være at de ulike sukrene følger ulike spor frem til fermenteringsprosessen.

Mengden spaltet sukrose økte i løpet av forsøket mens mengden spaltet laktose ikke gjorde det. Sammen med resultatene fra fermenteringen, indikerer dette at sukrase finnes i den anvendte gjærtypen mens laktase ikke gjør det.

Trondheim, 15. mars 2012.

---

Lene Brattsti Dypås

---

Katrine Bringé

---

Ove Øyås

## Litteratur

- [1] Kurshefte (2012), *Laboratoriekurs i TBT4107 Biokjemi 2*, NTNU, Trondheim.
- [2] Cox, M.M., Nelson, D.L. (2008), *Lehninger Principles of Biochemistry*, 2. utgave, W.H.Freeman & Co Ltd, New York.
- [3] Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2002), *Biochemistry*, 5. utgave, W.H.Freeman & Co Ltd, New York.

## A. Framstilling av blandinger for fermentering av ulike karbohydrater

Det ble forberedt 7 små reagensrør med ulike sammensetning av gjærsuspensjon, vann, natriumfluorid (NaF) og 2% karbohydratløsning. Tilsatt volum av de ulike ingrediensene er oppgitt i Tabell A.1.

Tabell A.1: Oversikt over mengde gjærsuspensjon, vann, natriumfluorid og karbohydratløsning tilsatt i de ulike rørene.

Ingrediens	Tilsatt volum		
	Rør 1	Rør 2	Rør 3-7
Gjærsuspensjon	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Vann	0,5 mL	-	0,5 mL
Natriumfluorid	-	0,5 mL	-
Karbohydratløsning (2%)	3,5 mL	3,5 mL	3,5 mL

Rørene ble tilsatt ulike typer sukker. En oversikt over type sukker i hvert av de 7 rørene finnes i Tabell A.2.

Tabell A.2: Oversikt over mengde gjærsuspensjon, vann, natriumfluorid og karbohydratløsning tilsatt i de ulike rørene.

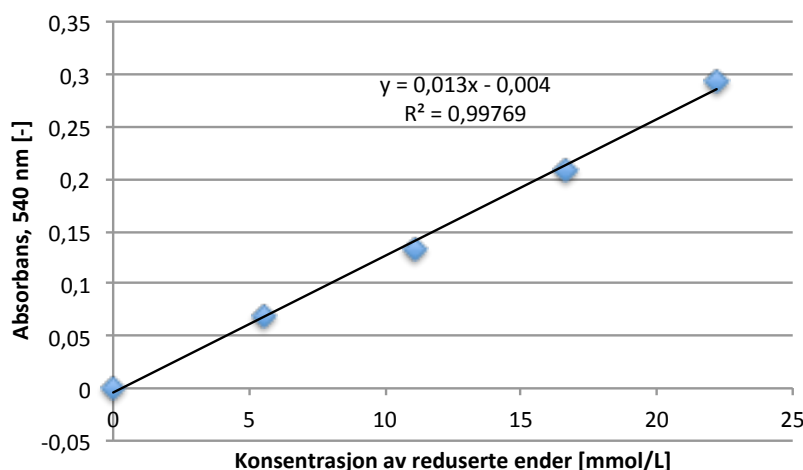
Rør	Sukker
1	Glukose
2	Glukose
3	Galaktose
4	Fruktose
5	Sukrose
6	Laktose
7	Maltose

## B. Standardkurve for konsentrasjon av reduserte ender

Absorbans ved 540 nm ble målt for ulike konsentrasjoner av en stock-løsning av glukose. Det ble utført målinger i tre ulike paralleller for hver konsentrasjon og gjennomsnittsverdien til de tre parallellene ble benyttet til å framstille en standardkurve. Data for framstillingen av standardkurven finnes i Tabell B.1 og kurven er vist i Figur B.1.

Tabell B.1: Rådata for framstilling av standardkurve. Absorbans ved 540 nm er målt for ulike konsentrasjoner av en stock-løsning av glukose,  $C_{stock}$ . Absorbansen er målt i tre ulike paralleller for hver konsentrasjon og en gjennomsnittsverdi er beregnet. Konsentrasjonen av reduserte ender,  $C_{red. ender}$ , er også beregnet.

$C_{stock}$ [mg/mL]	Absorbans, 540 nm			Gjennomsnittlig absorbans, 540 nm	$C_{red. ender}$ [mmol/L]
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3		
0	0,000	-0,010	0,000	0,000	0,000
1	0,076	0,066	0,065	0,069	5,551
2	0,183	0,161	0,165	0,134	11,10
3	0,201	0,223	0,203	0,209	16,65
4	0,292	0,298	0,286	0,292	22,20



Figur B.1: Standardkurve. Absorbans ved 540 nm som funksjon av konsentrasjon av reduserte ender. Kurven ble funnet ved regresjon og beskrives av det lineære uttrykket  $y = 0,013x - 0,004$  med bestemmelseskoeffisient  $R^2 = 0,99769$ .

## C. Beregning av mengde sukrose og laktose spaltet per volumenhet

Konsentrasjonen av reduserte ender ved et gitt tidspunkt ble beregnet ved omforming av regresjonsuttrykket fra standardkurven med påfølgende innsetting av gjennomsnittlig absorbanse ved 540 nm i:

$$y = 0,013x - 0,004 \iff x = \frac{y + 0,004}{0,0013} \quad (\text{C.1})$$

Her betegner  $y$  absorbanse ved 540 nm og  $x$  konsentrasjonen av reduserte ender. Videre ble endringen i konsentrasjonen av reduserte ender,  $\Delta C_{\text{red. ender}}$ , funnet ved å trekke fra den målte konsentrasjonen av reduserte ender før tilsats av gjær:

$$\Delta C_{\text{red. ender}} = C_{\text{red. ender}} - C_{\text{red. ender}}^0 \quad (\text{C.2})$$

Her betegner  $C_{\text{red. ender}}$  konsentrasjonen av reduserte ender ved et gitt tidspunkt og  $C_{\text{red. ender}}^0$  konsentrasjonen av reduserte ender før tilsats av gjær. For laktose dannes én redusert ende per spaltede laktose molekyl slik at

$$\Delta C_{\text{laktose}} = \Delta C_{\text{red. ender}} \quad (\text{C.3})$$

der  $\Delta C_{\text{laktose}}$  er endringen i laktosekonsentrasjon, altså mengden spaltet laktose. Ved spalting av sukrose dannes to reducerende ender per spaltede molekyl, altså er

$$\Delta C_{\text{sukrose}} = \frac{1}{2} \Delta C_{\text{red. ender}} \quad (\text{C.4})$$

Her er  $\Delta C_{\text{sukrose}}$  endringen i sukrosekonsentrasjon, altså mengden spaltet sukrose.

Med gjennomsnittlig absorbanse på 0,014 gir dette for eksempel

$$C_{\text{red. ender}} = \frac{0,014 + 0,004}{0,0013} = 1,385 \text{ mmol/L}$$

Videre gir  $C_{\text{red. ender}}^0 = 0,308 \text{ mmol/L}$

$$\Delta C_{\text{red. ender}} = 1,385 - 0,308 = 1,077 \text{ mmol/L}$$

Dersom det aktuelle sukkeret er laktose blir konsentrasjonsendringen dermed

$$\Delta C_{\text{laktose}} = 1,077 \text{ mmol/L}$$

For sukrose blir konsentrasjonsendringen

$$\Delta C_{\text{sukrose}} = \frac{1}{2} \cdot 1,077 = 0,538 \text{ mmol/L}$$

## D. B-spørsmål

### 1. Hvilke karbohydrater ble fermentert og hvilke ble ikke fermentert? Hvorfor/hvorfor ikke?

Karbohydratene glukose, fruktose, sukrose, og maltose ble fermentert av gjæren. Laktose og galaktose ble ikke fermentert. Gjær kan fermentere glukose og inneholder samtidig enzymene som trengs for å spalte fruktose, sukrose og maltose til glukose. Dette fører til at alle disse karbohydratene kan fermenteres. Gjær inneholder ikke de nødvendige enzymene for spalting av laktose til glukose eller omdanning av galaktose til det glykolytiske intermedietet glukose-6-fosfat.

### 2. Tror du gjær kan fermentere stivelse? Hvorfor/hvorfor ikke?

Stivelse er bygd opp av to ulike glukosepolymerer, amylose og amylopektin. Både amylose og amylopektin består av lange kjeder av glukose som er koblet sammen via  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -bindinger. Amylose er lineært, mens amylopektin er sterkt forgrenet med  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -bindinger i forgreningspunktene. For å fermentere stivelse må gjæren først bryte stivelsen ned til glukosemonomerer, noe som krever enzymet amylase. Gjær inneholder imidlertid ikke dette enzymet og kan følgelig ikke fermentere stivelse.

### 3. Hvis galaktose ble fermentert, ville det kostet gjærcellene ekstra energi (sammenlignet med glukose)? Hvorfor/hvorfor ikke?

For at galaktose skal kunne fermenteres må det først konverteres til det glykolytiske intermedietet glukose-6-fosfat. Dette skjer via en firetrinns prosess som forbruker ett ATP-molekyl per galaktose-molekyl som omdannes. Fosforylering av glukose til glukose-6-fosfat krever også ett ATP-molekyl per glukosemolekyl. Prosessen videre er uavhengig av hvilket monosakkarid glukose-6-fosfat ble dannet fra; den går uansett gjennom glykolysen og til fermentering. Den totale energikostnaden for fermentering av galaktose blir således den samme som ved fermentering av glukose.

### 4. Hvorfor tar det en stund før gassutviklingen kommer i gang?

Primærårsaken til at fermenteringen kom i gang raskere i noen rør enn i andre antas å være at enzymene som kreves for spalting av enkelte disakkarider må syntetiseres – og kanskje også ekskreteres – før spalting kan komme i gang. Dette sinker også fermenteringsprosessen. De ulike sukrene følger dessuten ulike spor frem til fermentering; eksempelvis må sukrose spaltes til glukose og fruktose, fruktose omdannes til glykolytiske intermedier og så videre.

## 5. Inhibitoren fluorid hemmer enzymet enolase

### a) Hvilken reaksjon er det egentlig som blir inhibert?

Natriumfluorid inhiberer dehydreringen av 2-fosfoglyserat til fosfoenolpyruvat i glykolysens nest siste trinn.

### b) Hvilke forbindelser vil hope seg opp i gjærcellen som følge av dette?

Inhibering av nest siste trinn i glykolysen vil i første rekke medføre opphopning av 2-fosfoglyserat og 3-fosfoglyserat, de to forbindelsene som eksisterer i likevekt i det reversible niende trinnet i glykolysen. Videre vil alle glykolytiske intermediater som ikke er substrat i en irreversibel reaksjon eller kan tas unna via andre biokjemiske spor akkumuleres. NADH vil også hope seg opp, ettersom fermentering, og dermed regenerering av  $\text{NAD}^+$  fra NADH, ikke kan foregå uten reduksjon av pyruvat, produktet i glykolysen.

## 6. Hvor mange reduserte ender dannes ved hydrolyse av laktose og sukrose? Hvorfor er antall reduserende ender ulikt for de to sukkermolekylene?

Hydrolyse gir dannelse av to reduserende ender for laktose og én for sukrose. Grunnen til at det bare dannes én reduserende ende ved spalting av laktose er at  $\beta(1 \rightarrow 4)$ -bindingen i disakkaridet er dannet ved sammenkobling av den reduserende enden i galaktose og den ikke-reduserende enden i glukose. I  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -bindingen i sukrose inngår imidlertid reduserende ende både hos glukose og fruktose slik at to reduserende ender dannes ved spalting.