



Atmung und Gärung

Versuchsdurchführende

Oscar Moore (634083)
Fridolin Rehnig (625757)
Philipp Kunze (625468)
Daniel Kollenkirchen (625426)
Huyen Anh Nguyen (572309)

Versuchsort

Campus Nord, Haus 9
R2001

Versuchsbetreuer

Dr. Boris Hedtke

02. Juli 2024

Contents

1 Einführung	1
2 Material und Methode	2
3 Ergebnis	2
3.1 Komplexe Atmung und Gärung	2
3.1.1 Glucoseverbrauch bei aerobe und aerobe Bedingung	2
3.1.2 Anaerobe Gärung	3
3.2 Sauerstoffverbrauch und cyanidresistente Atmung	4
4 Diskussion	7
4.1 Backhefe bei aerobe und anerobe Bedingungen	7
4.1.1 anaerobe Gärung	7
4.2 Sauerstoffverbrauch und cyanidresistente Atmung	8
5 Anhang	9
5.1 Rohdaten	9

1 Einführung

In diesem Versuchskomplex werden der Glucose- und Sauerstoffverbrauch von Hefekulturen unter verschiedenen Bedingungen untersucht, um die Unterschiede zwischen Atmung und Gärung zu verstehen. Hefen eignen sich hierfür perfekt, da sie fakultativ anaerob und daher in der Lage sind, Energie sowohl durch Atmung in Gegenwart von Sauerstoff als auch durch Gärung unter anaeroben Bedingungen zu gewinnen. Ziel ist es, die Effekte von Sauerstoffverfügbarkeit und Inhibitoren auf den Energiestoffwechsel der Hefe zu analysieren und dadurch die Energiegewinnung in Hefezellen unter unterschiedlichen Umweltbedingungen besser zu verstehen.

Der Versuch wird in zwei Hauptteile geteilt:

Im ersten Teil wird, anhand von der Glucosekonzentration, der Glucoseverbrauch von Hefesuspensionen unter aeroben und anaeroben Bedingungen gemessen. Das Ziel ist ein Vergleich, bzw. Unterscheidung der Suspensionen anhand des Glucoseverbrauchs. Zudem wird gravimetrisch die Gewichtsabnahme einer rein anaeroben Hefesuspension gemessen. Die Zielsetzung des Versuchs ist die Prüfung, ob man mit der Gewichtsabnahme eine CO₂-Abnahme effektiv bestimmen kann.

Hier ist ein theoretisches Verständnis des Pasteur- und des Crabtree-Effekts besonders wichtig. Der Pasteureffekt besagt, dass unter zunehmend anaeroben Bedingungen der Glucoseverbrauch ansteigt, bis zur 15- bis 16-fache Menge. Dies soll bedingt sein dadurch, dass in aeroben Bedingungen in den Mitochondrien Pyruvat vollständig oxidativ abgebaut wird, jedoch in anaerober Umgebung nicht vollständig oxidiert wird und, ohne ATP-Bildung, in Endprodukte wie Milchsäure, Ethanol, Propionsäure umgesetzt wird. Der Crabtree-Effekt beschreibt, dass selbst in hoher Sauerstoffverfügbarkeit, gleichzeitig mit der Atmung eine Alkoholgärung auftritt. Vermutlich wird den Hefen, durch den schnellen Abbau von Glucose zu Ethanol ein Vorteil gegenüber Konkurrenten. Dieses gleichzeitige Ablaufen von Gärung und Atmung führt zu einem starken Anstieg des respiratorischen Quotienten.

Im zweiten Teil wird der Sauerstoffverbrauch von Hefe- und Tabakpflanzen-Gewebesuspension, mithilfe einer Clarkelektrode unter anaerobe Bedingung gemessen. Zudem wird beide Gewebesuspensionen miteinander verglichen, welche mit Kaliumcyanid versetzt wurde.

Das Ziel ist zu ermitteln, wie sich der Sauerstoff von Hefe und Pflanzen unterscheidet und wie sich Kaliumcyanid, einem Cytochromoxidase-Hemmstoff, auf den Sauerstoffverbrauch der Suspensionen auswirkt.

In Flüssigkulturen, die nicht ständig Sauerstoff ausgesetzt sind, wie in diesem Versuch, kommt es zum schnellen Verbrauch des Sauerstoffs, da die Sauerstoffkonzentration begrenzt ist durch die Löslichkeit des Sauerstoffs in Wasser welches ca. 8mg pro Liter beträgt. In der Atmungskette ist

die terminale Oxidase die Cytochromoxidase, welche eine hohe Sauerstoffaffinität hat. Bei der Zugabe von Cyanid-Ionen wird das Enzym Cytochromoxidase gehemmt. Bei höheren Pflanzen gibt es eine cyanidresistente Atmung über die Alternative Oxidase, welche direkt aus dem Ubiquinonpool Elektronen bezieht. Die ATP-Regenerierung ist jedoch geringer und durch die teilweise Entkopplung des Protonen- und Elektronentransports wird die Energiedifferenz in Form von Wärme frei.

2 Material und Methode

Es wurde größtenteils, wie im Skript beschrieben verfahren. Bei Versuchsteil 1a wurden die Glucosekonzentration nach 10 Minuten gemessen und alle 5 Minuten bis Minute 25 gemessen. Zudem wurde 54g Hefe anstelle von 12.5g eingewogen.

Für den zweiten Versuchsteil wurden beim Erstellen der Hefelösung, 0.52g Hefe und 2.01g Glucose abgewogen. Beim Ansetzen der Pflanzenzellsuspension, wurden 1.51g Glucose und 5.25g der BY2-Pflanzenzellkulturen verwendet.

3 Ergebnis

3.1 Komplexe Atmung und Gärung

3.1.1 Glucoseverbrauch bei aerobe und aerobe Bedingung

Die Konzentration von Glucose aus der Einwaage wurde nach der Gleichung (1) berechnet.

$$c(\text{Glucose}) = \frac{\frac{m(\text{Glucose})}{M(\text{Glucose})}}{V(\text{Medium})} = \frac{\frac{1.8\text{g}}{180\text{g/mol}}}{0.25\text{L}} = 0.04\text{mol/L} \hat{=} 40\text{mmol/L} \quad (1)$$

Da bei der Durchführung der Glucosebestimmung nicht sofort der Farbwert des Teststreifen abgelesen wurde, sind die ersten zwei Werte nicht genau.

Der Glucoseverbrauch wird somit mit der Anfangskonzentration der Einwaage bestimmt und mit dem 25 Minuten Wert der Teststreifen (siehe Figure 1) berechnet.

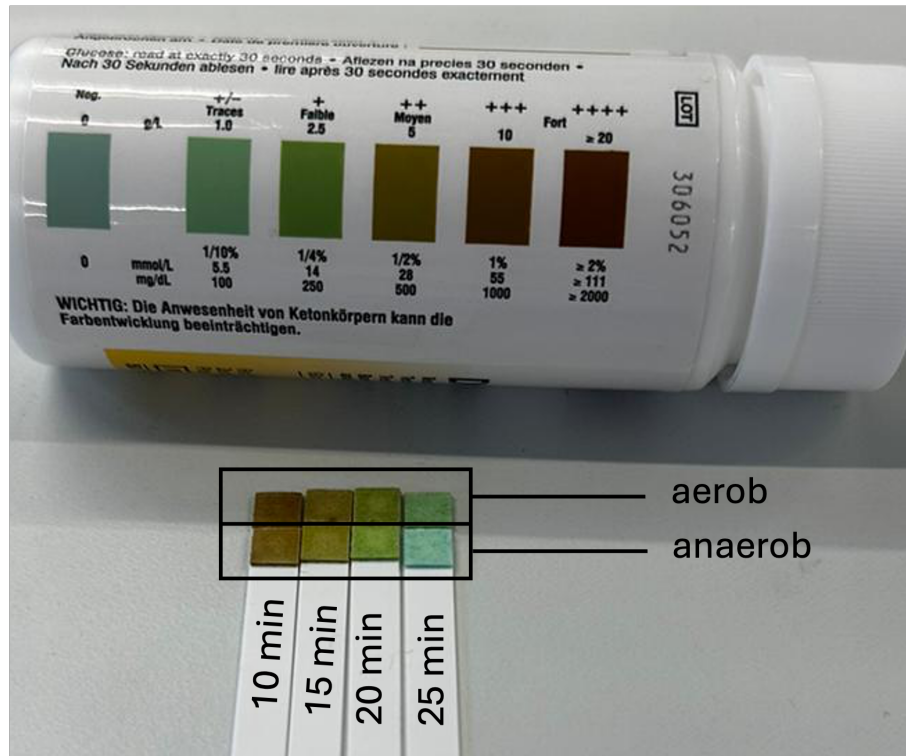


Figure 1: Glucose-Teststreifen nach 10, 15, 20, 25 Minuten in der Backhefe-Lösung bei aerobe und anaerobe Bedingungen.

Es wird angenommen, dass der Verbrauch a linear verläuft, weswegen der Glucoseverbrauch aus der Differenz des Anfangswertes und Endwertes der Glucose bestimmt werden kann. Der Verbrauch pro Frischgewichtes in Gleichung (2) bezieht sich auf 50.4g Backhefe, die für den Versuch eingewogen wurde.

$$\begin{aligned}\Delta c &= c_{Glucose,0} - c_{Glucose,1} \\ \Delta c(aerob) &= 40mM - 5.5mM = 34.5mM \\ a(aerob) &= \frac{\Delta c(aerob)}{\frac{m(Hefe)}{V(Hefelösung)} \cdot t_{ges}} = \frac{34.5mmol/L}{\frac{54g}{0.25L} \cdot 25min} \\ &= 0.0064mmol/g \cdot min\end{aligned}\quad (2)$$

Table 1: Glucoseverbrauch a von Backhefe bei aerobe und anaerobe Bedingungen nach 25 Minuten.

	$\Delta c(\text{Glucose})$ in mM	a in $mmol/g \cdot min$
aerobe Bedingung	34.5	0.0064
anaerobe Bedingung	40	0.0074

3.1.2 Anaerobe Gärung

Die wiederholte Messung des Gewichts im Abstand von 10 min sowie die daraus resultierende Abnahme der Stoffmenge von Glukose (siehe Gleichung 3) wurde in Table 2 dargestellt. Die Abnahme der Stoffmenge der Glukose je Gramm Hefe konnte einfach abgeleitet werden, da genau 1 Gramm Hefe genutzt wurde. Aus diesem Wert konnte ein Diagramm im zeitlichen Verlauf erstellt werden

(siehe Figure 2). Es zeigte sich, dass die ersten zwei Messpunkte (nach 0 und 12 min) nicht in den Verlauf des Verbrauchs passte. Aber auch der Messwert nach 52 min weicht von dem restlichen Verlauf ab. Es wurde mittels einer linearen Regression durch die Messpunkte ab Messpunkt 3 (22 min) der durchschnittliche Glukoseverbrauch ermittelt. Dabei entspricht der Anstieg der linearen Regressionsgeraden dem Verbrauch. Dementsprechend konnte ein Glukoseverbrauch von 0,1686 mmol Glukose pro Minute und Gramm Hefe festgestellt werden. Der Bestimmtheitsgrad der linearen Regression liegt bei $R^2 = 0,97$.

Table 2: Glucoseverbrauch von Backhefe bei aerobe und anaerobe Bedingungen nach 25 Minuten.

Uhrzeit [hh:mm]	t in min	m in g	Δ Gewicht in mg	Δ n(Glucose) in mmol	Δ n(Glucose)/g Hefe in mmol/g
15:49	0	72.1833	0	0	0
16:01	12	72.1817	16	0.1818	0.1818
16:11	22	72.1779	54	0.6136	0.6136
16:21	32	72.1689	144	1.6363	1.6363
16:31	41	72.1602	231	2.6250	2.6250
16:42	52	72.1356	477	5.4205	5.4205
16:52	62	72.1207	626	7.1136	7.1136

$$\text{Abnahme der Stoffmenge von Glucose[mmol]} = \frac{1\text{mmol Glucose}}{88\text{mg CO}_2} \cdot \text{Abnahme des Gewichts[mg]} \quad (3)$$

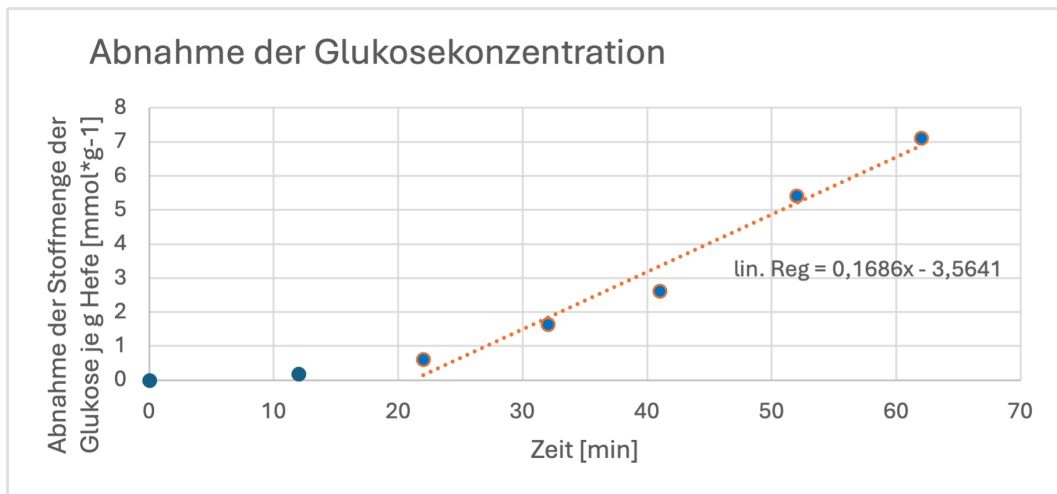


Figure 2: Abnahme der Stoffmenge der Glukose je g Hefe abhängig von der Zeit mit linearer Regression durch die Werte ab 22 min..

3.2 Sauerstoffverbrauch und cyanidresistente Atmung

Der Sauerstoffverbrauch wird aus der Steigung a (a: Verbrauch) in dem Linearen Bereich der Kurve in Figure (3) bestimmt. Eine Beispielrechnung für den Sauerstoffverbrauch pro g Hefe wurde in Gleichung (4) für die Hefe ohne KCN durchgeführt.

Aus der Sauerstoffverbrauch wird der Glukoseverbrauch bestimmt. In Gleichung (5) ist eine Beispielrechnung für den Glukoseverbrauch von Hefe ohne KCN dargestellt.

In Table 3 wurden die Verbrauchsrate von Hefe und BY2-Zellen mit und ohne KCN dargestellt.

$$a(O_2) = 0.00089 \frac{mg}{L \cdot s} \hat{=} 0.534 \frac{mg}{L \cdot min} \hat{=} 534 \frac{\mu g}{L \cdot min} \quad (4)$$

$$\frac{a(O_2)}{\beta(Hefe)} = \frac{534 \mu g / L \cdot min}{\frac{0.52g}{0.3L}} = \underline{308 \mu g / g(Frischgewicht) \cdot min}$$

$$a(O_2) = 0.0089 \frac{mg}{L \cdot s} \hat{=} 0.534 \frac{mg}{L \cdot min} \hat{=} 534 \frac{\mu g}{L \cdot min}$$

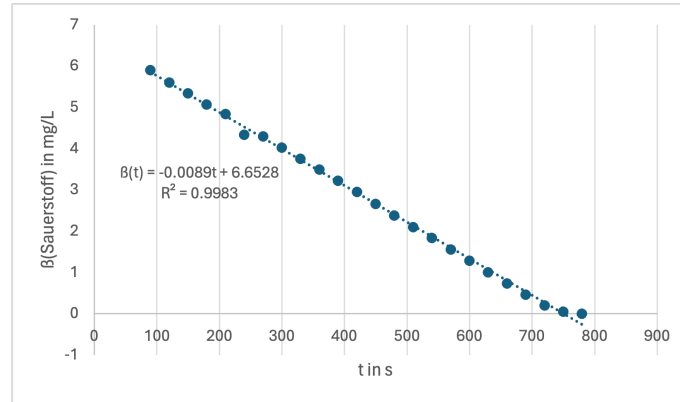
$$a(Glucose) = \frac{\frac{a(O_2)}{M(O_2)}}{6} = \frac{\frac{0.534 \cdot 10^{-3} g / L \cdot min}{15.99 g / mol}}{6} = 5.566 \cdot 10^{-6} mol / L \cdot min \quad (5)$$

$$\frac{a(Glucose)}{\beta(Hefe)} = \frac{5.566 \cdot 10^{-6} mol / L \cdot min}{\frac{0.52g}{0.3L}} = 3.21 \cdot 10^{-6} mol / g(Frischgewicht) \cdot min$$

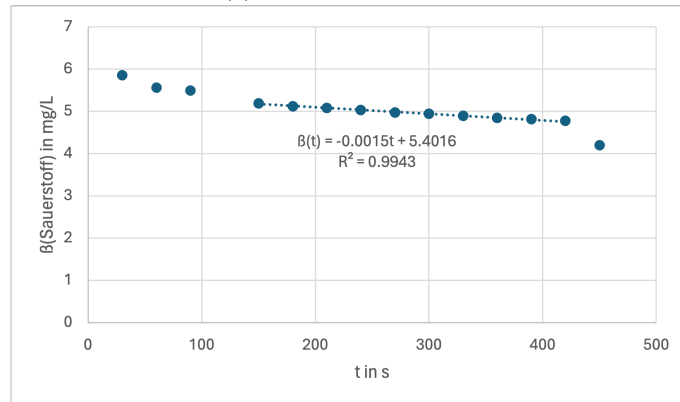
$$\hat{=} \underline{3.21 \cdot 10^{-3} mmol / g(Frischgewicht) \cdot min}$$

Table 3: Sauerstoff- und Glucoseverbrauch von Backhefe und BY2-Pflanzenzellen in aeroben Bedingungen mit und ohne Zugabe von Kaliumcyanid.

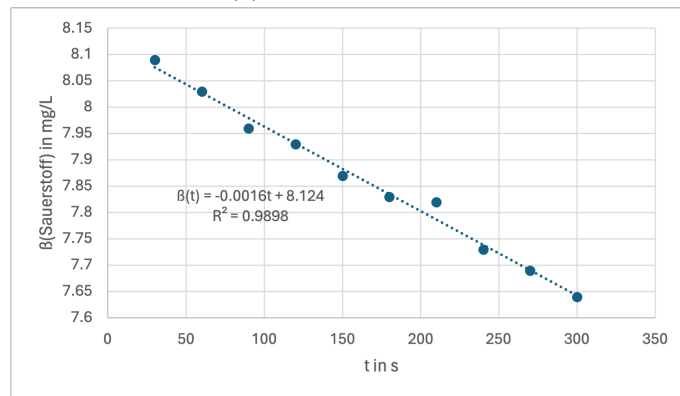
	O_2 -Verbrauch in $\mu g / L \cdot min$	O_2 -Verbrauch in $\mu g / min \cdot g \text{ Cells}$	Glucose-Verbrauch in $mmol / min \cdot g \text{ Cells}$
Hefe ohne KCN	534	308	$3.21 \cdot 10^{-3}$
Hefe mit KCN	90	51.9	$3.12 \cdot 10^{-4}$
BY2 ohne KCN	96	5.49	$5.72 \cdot 10^{-5}$
BY2 mit KCN	132	7.5	$4.72 \cdot 10^{-4}$



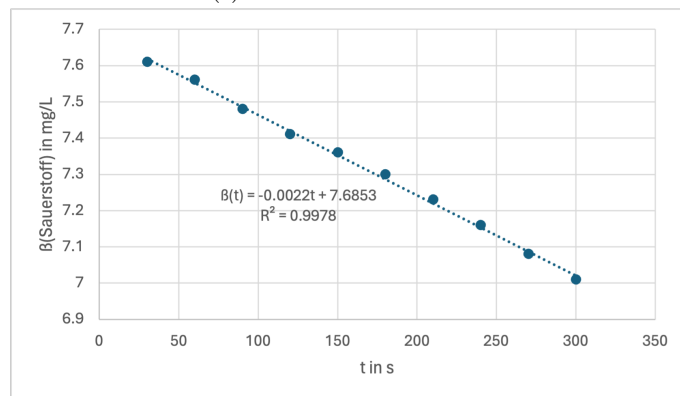
(a) Backhefe ohne KCN



(b) Backhefe mit KCN



(c) BY2-Zellen ohne KCN



(d) BY2-Zellen mit KCN

Figure 3: Sauerstoffkonzentration im Medium von Backhefe bzw BY2-Pflanzenzellen in Abhängigkeit der Zeit in Sekunden. Sauerstoffkonzentration wurde in anaerobe Bedingung bestimmt und einmal mit und ohne Zugabe von 2.4mL KCN.

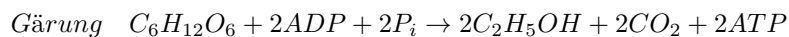
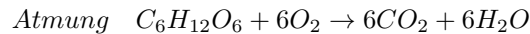
4 Diskussion

4.1 Backhefe bei aerobe und anerobe Bedingungen

Wie in Table 1 zu sehen, verbraucht Hefe unter anaeroben Bedingungen 1.15x mehr Glucose, als die unter aeroben Bedingungen. Dieser Effekt wird auch als Pasteur-Effekt bezeichnet, wo unter anaeroben Bedingungen Hefen und andere Mikroorganismen verstärkt Zucker abbauen, um den Energiegehalt innerhalb der Zelle aufrecht zu erhalten.

Der Crabtree-Effekt beschreibt das Betreiben von Gärung, selbst wenn Sauerstoff vorhanden ist. Das Betreiben von beiden Prozessen, sowohl Gärung als auch Atmung hilft der Hefe noch schneller Energie produzieren zu können und gleichzeitig andere Mikroorganismen wie konkurrierende Bakterien durch die Gärungsendprodukte wie Ethanol abtöten zu können. Dies erklärt möglicherweise den geringen Unterschied des Glukoseverbrauchs zwischen der aerob und anaerob gehaltenen Hefe während des Versuchs 1A. Laut Reaktionsgleichung wäre dieser nämlich, unter anaeroben Bedingungen, ca. 18 mal so hoch, wie unter aeroben. Bestätigen kann dies den Effekt aber nicht. Um den Crabtree-Effekt nachzuweisen, müsste der Ethanolgehalt im Medium gemessen werden.

Die aerobe Atmung produziert circa 30-36 ATP-Moleküle/Glucose durch die Glycolysis, Citratzyklus und Atmungskette, während die anaerobe Atmung (Gärung) nur 2 ATP-Moleküle/Glucose produziert.



Der Glucoseverbrauch der gemessen wurde, kann von den realen Werten abweichen, da bei der Durchführung das Gefäß für die anaerobe Bedingung nicht komplett verschlossen war. Zudem wurden die Werte der Glucoseteststreifen zu Beginn nicht sofort abgelesen, weswegen die Farben über die Zeit dunkler wurden.

4.1.1 anaerobe Gärung

Bei der Gärung unter anaeroben Bedingungen wird laut dem Pasteur-Effekt mehr Glukose verbraucht als während der Zellatmung unter aeroben Bedingungen. Laut dem Crabtree-Effekt nutzt *Saccharomyces cerevisiae* unter aeroben Bedingungen sowohl die Zellatmung als auch die Gärung, um möglichst viel Energie zu gewinnen. Dennoch ist zu erwarten, dass bei der Gärung unter anaeroben Bedingungen mehr Glukose verbraucht wird als unter aeroben Bedingungen. Wenn 1 mmol Glukose vergoren werden würde, so würde man eine Gewichtsabnahme von 88 mg erwarten können. Das lässt sich durch umstellen der Gleichung 3 nach dem Gewichtsverlust ermitteln (siehe Gleichung 6). Die gravimetrische Messung zeigt im Vergleich zu den ersten Teil des Versuches, einen deutlich geringeren Verbrauch von Glukose. Während der Glukoseverbrauch bei Versuch "Aerobe und anaerobe Glukoseverbrauch" bei 1,6 mmol/l/min lag, so lag er bei der gravimetrischen Bestimmung bei nur 0,1686 mmol/g/min. Wie im vorherigen Teil bereits erläutert, kann es durch den Versuchsaufbau im Teil A zu Ungenauigkeiten kommen. Ergänzend dazu, ist die Farbe der Teststreifen nicht ganz genau bestimmbar und auch die vom Hersteller bereitgestellte Farbskala enthält nicht alle Farbnuancen.

Dementsprechend ist die Ermittlung der Glukose-Konzentration durch die Teststreifen eine eher ungenaue Messmethode und dient nur zur Schätzung. Eine gravimetrische Bestimmung mithilfe einer Feinwaage, welche bis auf ein tausendstel Gramm messen kann, ist im Vergleich dazu eine deutlich genauere Messmethode. Jedoch kann es auch hier zu Fehlern kommen. Zum einen befand sich in dem für den Versuch verwendeten Kunststoffschlauch Wasserrückstände, die durch die Veränderung des Gasvolumen bewegt wurden. Durch diese Gewichtsverlagerung kann die Messung verfälscht sein. Zum anderen ist der Zustand der Waage anzumerken. Die Waage zeigte in regelmäßigen Abständen Fehlermeldungen, wodurch begründete Zweifel an der Funktionstüchtigkeit dieser Waage nicht ausgeschlossen werden können. Da die berechneten Werte des Glukoseverbrauchs in Versuch 1A und Versuch 1B eine Abweichung um den Faktor 10 zeigten, lassen sich die Werte nur schwer miteinander vergleichen. Bei der Verlässlichkeit der Testmethoden würde, mit Blick auf die evtl.

defekte Waage, eher die Nutzung der Glukose-Teststreifen sinnvoll erscheinen. Wenn es um die Genauigkeit der Messung geht, würde jedoch ganz klar die gravimetrische Bestimmung das Mittel der Wahl sein.

$$\text{Abnahme des Gewichts}[mg] = \frac{\text{Verbrauch von } 1mmol\text{Glucose}}{1mmol\text{Glucose}} \cdot 88mg \quad (6)$$

4.2 Sauerstoffverbrauch und cyanidresistente Atmung

Der Glucoseverbrauch im Medium ist bei der Backhefe deutlich höher als bei der Pflanzenzelle BY2. Die Verbrauchsrate von ungehemmte Hefe beträgt $534 \mu\text{g/L} \cdot \text{min}$ und die von BY2-Zellen $96 \mu\text{g/L} \cdot \text{min}$. Anders als die Hefe besitzen Pflanzenzellen Vakuolen, die 80-90% der Zelle ausmachen, wodurch für anderen Zellorgane. Somit besitzen Pflanzenzellen weniger Mitochondrien als die Hefezellen und können pro g weniger Sauerstoff verstoffwechseln.

Wird Kalziumcyanid (KCN) zugegeben, dann ist der Sauerstoffverbrauch von Hefe auf $90 \mu\text{g/L} \cdot \text{min}$ gesunken und die von BY2- Zelle auf $132 \mu\text{g/L} \cdot \text{min}$ gestiegen.

In den Mitochondrien ist Cytochrom-C-Oxidase ein Enzym das in der Atmungskette bei der Elektronentransport beteiligt ist. Cyanid bindet an die Oxidase und inhibiert somit die ATP-Gewinnung durch die aerobe Atmung. Die Hefezelle musst dann von der aerobe Atmung auf die anaerobe Gärung wechseln, um die Energiegewinnung aufrecht zu erhalten. Das die Hefezelle in der Lage ist auch bei anaerobe Bedingung Glucose zu verstoffwechseln, kann im Versuchsteil 1 beobachtet werden. Hier im Versuchsteil 2 ist dies nicht möglich, da das Messinstrument (Clark-Elektrode) nur den Sauerstoffgehalt in der Lösung messen kann.

Im Versuchsteil 1 wurde der Glucosegehalt in der Lösung mithilfe von Diastix-Teststreifen, welches ein Konzentrations-Farbindikator für Glucose ist, gemessen. Dadurch ist es möglich die aerobe Atmung und anaerobe Gärung zu testen, was hier in diesen Versuchsteil 2 nicht möglich ist, da die Clark-Elektrode nur den aeroben Stoffwechselweg quantifizieren kann.

Der Nachteil der Diastix-Teststreifen jedoch ist, dass das zeitliche Abschätzen der Farbveränderung mit dem Farbskala auf der Verpackung bei jede Probetestung gleich sein muss und zeitnah passieren muss, da die Enzym in den Teststreifen nachdunkeln und somit die Werte verfälschen.

Bei der Zugabe von KCN zu den Hefeproben wäre die Teststreifen aber ein Vorteil, da es den anaeroben Stoffwechselweg der Hefezellen zeigen würde.

BY2-Zellen gehört zu den höheren Pflanzen (Zellen von der Nicotiana tobacum Pflanze) und besitzen eine alternative Oxidase-Weg, welches nicht durch Cyanid gehemmt werden kann, um ATP zu synthetisieren. So ist den Pflanzen auch bei einer Inhibition von Cytochrom-C-Oxidase ATP zu produzieren.

Da bei der alternative Oxidase -Stoffwechselweg weniger ATP produziert, musst die Pflanzenzelle mehr Sauerstoff verbrauchen, um die gleiche ATP-Produktion in der Zelle aufrecht zu halten.

5 Anhang

5.1 Rohdaten

Table 4: Sauerstoffkonzentration von 0.52g Backhefe in einer anaeroben Bedingung.

t in min	$\beta(O_2)$ in mg/L
1.30	5.90
2.00	5.0
2.30	5.34
3.00	5.07
3.30	4.84
4.00	4.54
4.30	4.30
5.00	4.03
6.00	3.50
6.30	3.23
7.00	2.95
7.30	2.66
8.00	2.38
8.30	2.10
9.00	1.84
9.30	1.56
10.00	1.29
10.30	1.01
11.00	0.74
11.30	0.47
12.00	0.21
12.30	0.05
13.00	0.00

Table 5: Sauerstoffkonzentration von 0.52g Backhefe in einer anaeroben Bedingung und Zugabe von 2.4mL 10mM Kaliumcyanid.

t in min	$\beta(O_2)$ in mg/L
0.30	5.85
1.00	5.56
1.30	5.49
2.00	5.49
2.30	5.19
3.00	5.12
3.30	5.08
4.00	5.03
4.30	4.97
5.00	4.94
5.30	4.89
6.00	4.84
6.30	4.81
7.00	4.77
7.30	4.72

Table 6: Sauerstoffkonzentration von 5.25g BY2-Zellen in einer anaeroben Bedingung.

t in min	$\beta(O_2)$ in mg/L
0.30	8.09
1.00	8.03
1.30	7.96
2.00	7.93
2.30	7.87
3.00	7.83
3.30	7.82
4.00	7.73
4.30	7.69
5.00	7.64

Table 7: Sauerstoffkonzentration von 5.25g BY2-Zellen in einer anaeroben Bedingung und Zugabe von 2.4mL 10mM Kaliumcyanid.

t in min	$\beta(O_2)$ in mg/L
0.30	7.61
1.00	7.56
1.30	7.48
2.00	7.41
2.30	7.36
3.00	7.30
3.30	7.23
4.00	7.16
4.30	7.08
5.00	7.01