



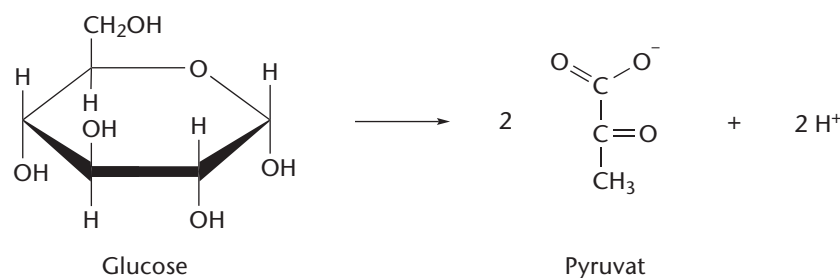
Påvisning af glycolysens slutprodukt pyruvat

Baseret på side 239-247

Teori

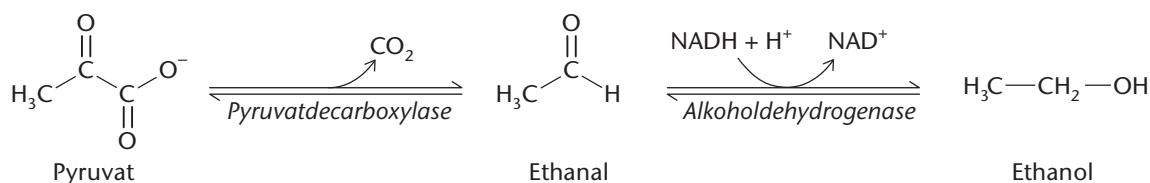
Carbohydratet glucose spiller en central rolle i alle levende organismers stofskifte da der er bundet energi i de kemiske bindinger i molekylet. Nedbrydningen af glucose starter med glycolysen som er vist i figur 334, side 241 i Bind 3.

I nedenstående bruttoreaktion ses det at et glucos molekyle omdannes til to pyruvat, der således er glycolysens slutprodukt:



Figur 1. Glucose omdannes til to pyruvat.

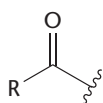
I gærceller omdannes pyruvat under anaerobe forhold videre til ethanol:



Figur 2. Pyruvats omdannelse til ethanol. Figur 328, Bioteknologi A Bind 3 side 237.

Første trin af denne omdannelse hvor der fraspaltes carbondioxid (CO_2), katalyseres af enzymet pyruvatdecarboxylase. Ved at gøre gærcellernes vækstmedium svagt basisk er det muligt at hæmme dette enzym, så der i stedet sker en ophobning af pyruvat.

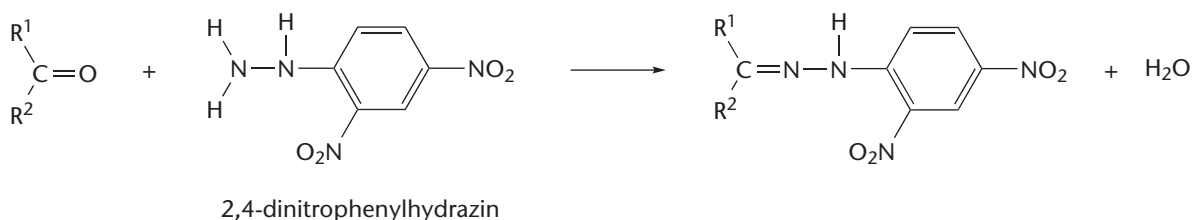
Derefter kan pyruvat påvises ved en kemisk test med stoffet 2,4-dinitrophenylhydrazin (2,4-DNPH) der i sur opløsning anvendes til påvisning af stoffer, som indeholder en carbonylgruppe:



Figur 3. Strukturen for en carbonylgruppe. Figur 250, Bioteknologi A Bind 2 side 174.



Carbonylforbindelser danner normalt gule eller orange bundfald med 2,4-DNPH i sur opløsning. Reaktionen kaldes Bradys test:



Til påvisning af pyruvat kan opløsningen efterfølgende gøres basisk hvorved dannes et rødbrunt bundfald.

Formål

At påvise pyruvat som glycolysens slutprodukt.

Materialer

Fælles:

- Tørgær
- 0,5 M kaliumdihydrogenphosphat - $\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{aq})$ (til reagensglas 1)
- 0,5 M kaliumhydrogenphosphat – $\text{K}_2\text{HPO}_4(\text{aq})$ (til reagensglas 2)
- 10 % glucose – $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{aq})$
- 10 % trichlorethansyre – $\text{CCl}_3\text{COOH}(\text{aq})$
- 2,4-dinitrophenylhydrazinreagens - $\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_4(\text{aq})$ (2 g/L i 2 M HCl)
- 2 M natriumhydroxid – $\text{NaOH}(\text{aq})$
- Evt. demineraliseret vand i sprøjteflaske
- Vandbad (37 °C)
- Centrifuge til reagensglas
- Vægt

Desuden pr. gruppe:

- 2 lange reagensglas med tilhørende propper
- 2 reagensglas der passer til centrifuge (centrifugeglas)
- 4 almindelige reagensglas
- Reagensglasstativer
- Mikropipetter med tilhørende spidser eller fuldpipetter (2 mL og 5 mL)
- Engangspipetter



Sikkerhed

10 % trichlorethansyre kan forårsage øjenskader og svære forbrændinger af huden. Det kan desuden forårsage irritation af luftvejene. Derfor skal stoffet håndteres i stinksab, og der skal anvendes briller, handsker og kittel. Undersøg selv H- og P-sætninger for stoffet.

Fremgangsmåde

1. Mærk to lange reagensglas 1 og 2.
2. Afvej i hvert reagensglas 0,5 g tørgær.
3. Tilsæt 5 mL 0,5 M KH_2PO_4 til reagensglas 1, og tilsæt 5 mL 0,5 M K_2HPO_4 til reagensglas 2. Sæt prop på og vend glassene op og ned til al tørgæren er opslæmmet.
4. Tilsæt 5 mL 10 % glucose til hvert reagensglas, sæt prop på og bland igen.
5. Inkubér gæropløsningen i et varmebad ved 37 °C i ca. en halv time. lagttag om der er gasudvikling i glassene.
6. I ventetiden formuleres en hypotese for hvad der forventes at ske i de to glas.
7. Anbring reagensglassene i stinksab når de har inkuberet i varmebad i ca. en halv time.
8. I stinksabet tilsættes 2 mL 10 % trichlorethansyre til hvert reagensglas.
9. Overfør 5 mL fra reagensglas 1 til et centrifugeglas. Overfør 5 mL fra reagensglas 2 til et andet centrifugeglas. Afvej de to glas mod hinanden ved at fjerne lidt væske fra det tungeste glas med en engangspipette.
10. Placer reagensglassene i centrifugen sammen med de øvrige holds reagensglas. Vær ved placering meget opmærksom på hvilket glas der er nr. 1 og hvilket der er nr. 2. Centrifuger ved max hastighed i 10 minutter.
11. Mærk fire reagensglas 1s og 1 b og 2s og 2b.
12. Overfør 1 mL 2,4-dinitrophenylhydrazinreagens til hvert af reagensglassene 1s og 2s.
13. Overfør 1 mL 2 M NaOH til hvert af reagensglassene 1b og 2b.
14. Overfør efter centrifugering 2 mL supernatant fra centrifugeglas 1 til reagensglas 1s. Overfør tilsvarende 2 mL supernatant fra centrifugeglas 2 til reagensglas 2s. lagttag og notér hvad der sker.
15. Overfør med en engangspipette nogle dråber af blandingen i reagensglas 1s til reagensglas 1b. Overfør tilsvarende nogle dråber af blandingen i reagensglas 2s til reagensglas 2b. lagttag og notér hvad der sker. Hvis det er svært at skelne farverne i de to glas kan der tilsættes 2-3 mL demineraliseret vand.



Efterbehandling

1. Forklar ideen med at tilsætte hhv. kaliumdihydrogenphosphat og kaliumhydrogenphosphat til hvert af de to reagensglas (punkt 3). Inddrag beregninger af pH i opløsninger af hhv. 0,5 M KH_2PO_4 og 0,5 M K_2HPO_4 i forklaringen. $\text{pK}_s(\text{H}_2\text{PO}_4^-) = 7,21$ og $\text{pK}_B(\text{HPO}_4^{2-}) = 6,79$.
2. Forklar hvorfor der tilsættes glucose til glassene (punkt 4), og hvad en gasudvikling betyder (punkt 5).
3. Argumentér for at pyruvat er en carbonylforbindelse.
4. Hvorfor tilsættes der trichlorethansyre i punkt 8?
5. Forklar formålet med at centrifugere blandingen (punkt 10).
6. Hvorfor tilsættes base i punkt 13?
7. Diskutér resultaterne. Stemmer de overens med hypotesen? Inddrag fejkilder i diskussionen.
8. Udarbejd en konklusion hvor der tages stilling til om forsøgets formål er opfyldt, og hypotesen kunne bekræftes.