

Imię

Data

Nazwisko

Kierunek studiów

Ćwiczenie B40: Wpływ temperatury na intensywność oddychania komórkowego w drożdżach

Tabela 1. Zależność szybkości zużycia tlenu od temperatury.

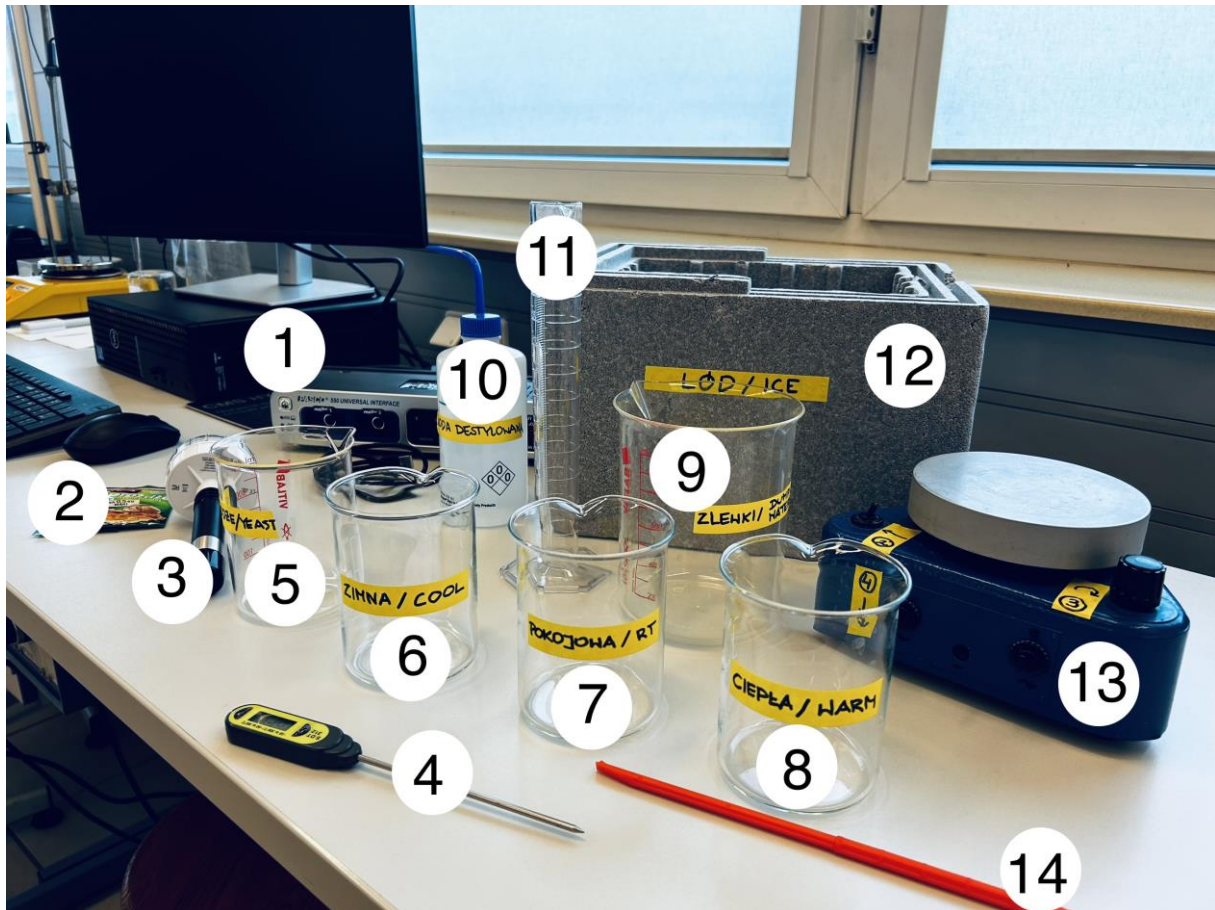
Warunki	Temperatura wody (°C)	Początkowe stężenie tlenu (mg/l)	Końcowe stężenie tlenu (mg/l)	Czas (s)	Zmiana stężenia tlenu (mg/l)	Intensywność oddychania komórkowego ($\mu\text{g}/(\text{l}\cdot\text{s})$)
Woda o temperaturze pokojowej						
Woda ciepła						
Woda zimna						

Tabela 2. Zmiany stężenia tlenu w czasie.

Czas	0s	20s	40s	60s	80s	100s	120s
	Stężenie tlenu (ml/l)						
Woda o temperaturze pokojowej							
Woda ciepła							
Woda zimna							

Stanowisko pomiarowe (opis do zdjęcia poniżej):

1. Komputer z interfejsem.
2. Drożdże typu instant 7g
3. Czujnik tlenu rozpuszczonego PASCO
4. Termometr elektroniczny
5. Zlewka o pojemności 400 ml na zawiesinę drożdży
6. Zlewka o pojemności 400 ml na wodę zimną
7. Zlewka o pojemności 400 ml na wodę o temperaturze pokojowej
8. Zlewka o pojemności 400 ml na wodę ciepłą
9. Zlewka o pojemności 1 l na brudną wodę
10. Butelka tryskawka
11. Cylinder miarowy
12. Styropianowy pojemnik na lód
13. Płyta grzejna
14. Bagietka do mieszania

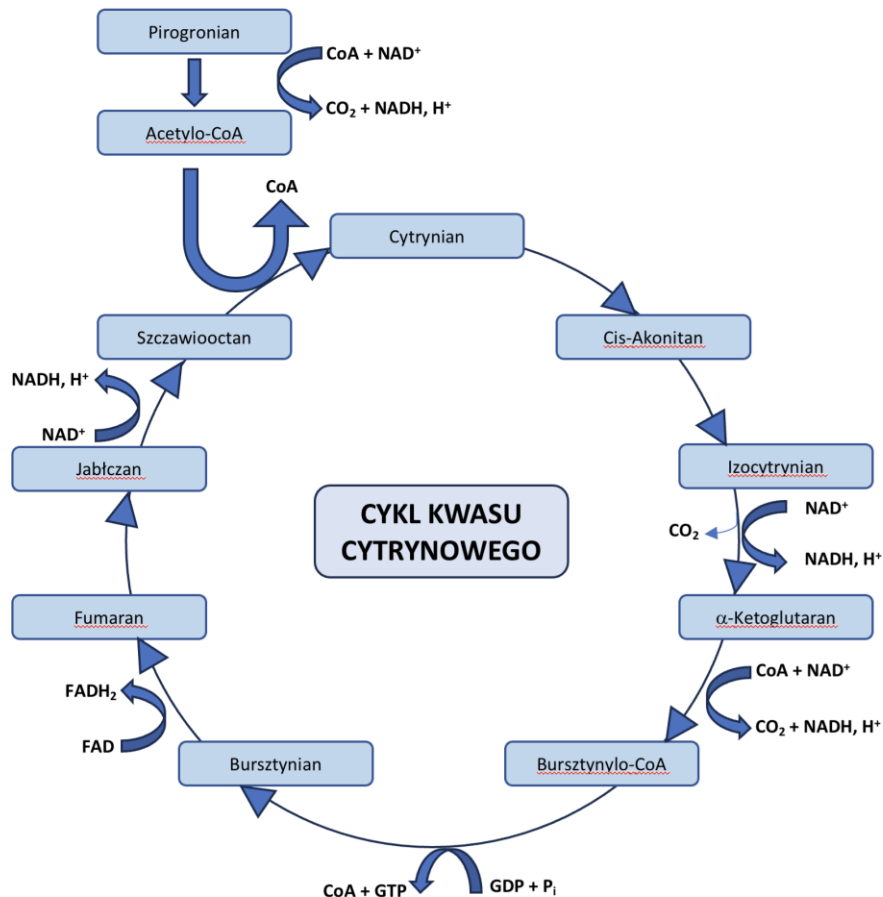
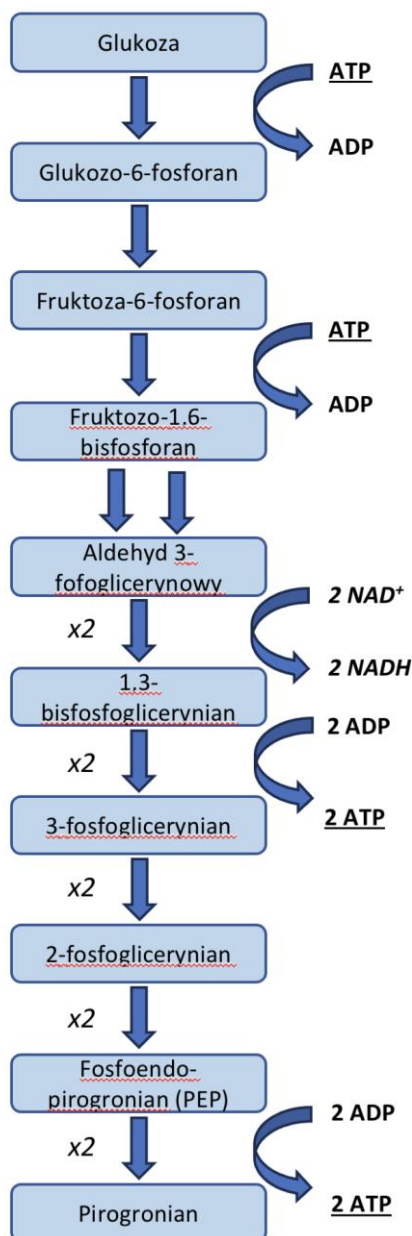


Wstęp teoretyczny

Każdy organizm żywy potrzebuje energii użytecznej biologicznie (w postaci ATP) do prawidłowego funkcjonowania i wzrostu. Energia ta może być wytwarzana z udziałem tlenu w mitochondriach lub bez udziału tlenu, np., w procesie fermentacji. Organizmy żywe mogą wykorzystywać różne związki organiczne do wytwarzania energii, z których najważniejsze to węglowodany (najłatwiej dostępne źródło energii), tłuszcze (główny materiał zapasowy u zwierząt) oraz białka (wykorzystywane w ostatniej kolejności).

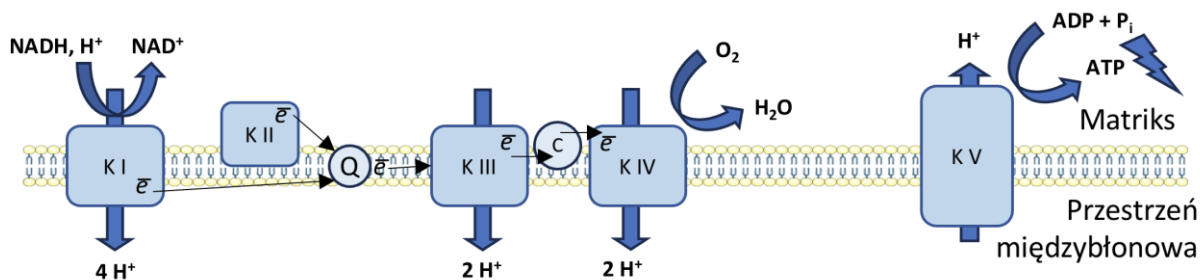
Oddychanie wewnątrzkomórkowe możemy podzielić na kilka etapów:

1. *Glikoliza*, która zachodzi w cytoplazmie. Podczas tego procesu glukoza zostaje utleniona do pirogronianu (rys. 1). Zyskiem energetycznym są 2 cząsteczki ATP. Powstające podczas glikolizy ATP jest efektem przenoszenia reszty fosforanowej z substratu na ADP i nosi nazwę *fosforylacji substratowej*. Glikoliza może zachodzić w warunkach beztlenowych.
2. *Reakcja pomostowa* zachodząca w macierzy mitochondrialnej. Podczas reakcji pomostowej następuje oksydacyjna dekarboksylacja pirogronianu. Pirogronian ulega degradacji i łączy się z koenzymem A tworząc acetylo-CoA. Podczas tej przemiany uwalnia się dwutlenek węgla.
3. *Cykl Krebsa*, inaczej cykl kwasu cytrynowego lub cykl kwasów trójkarboksylowych, zachodzący w macierzy mitochondrialnej. Podczas szeregu przemian w tym procesie powstaje NADH i FADH₂ niezbędne do fosforylacji oksydacyjnej. Podczas cyklu Krebsa zachodzi również fosforylacja substratowa, podczas której wytwarzany jest GTP. Grupa acetylowa z acetylo-CoA jest degradowana do dwutlenku węgla.
4. *Fosforylacja oksydacyjna*, zachodząca w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, w której NADH i FADH₂ są wykorzystywane do syntezy ATP. Wodór z tych związków tworzy gradient protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. ATP powstaje w wyniku ruchu protonów zgodnie z ich gradientem stężenia. Jednocześnie wzdłuż łańcucha przenoszone są elektrony. Końcowym akceptorem wodoru jest tlen.



Rys. 2. Cykl kwasu cytrynowego. Pirogronian pochodzący z glikolizy ulega dekarboksylacji do acetylo-CoA. Ten z kolei wchodzi do cyklu kwasu cytrynowego. W kolejnych etapach tego cyklu ze związków organicznych wytwarzany jest CO_2 oraz związki wysokoenergetyczne w postaci NADH , FADH_2 oraz GTP .

Rys. 1. Schemat glikolizy. W pierwszym etapie glukoza ulega fosforylacji przez heksokinazę zużywając 1 cząsteczkę ATP (adenozynotrójfosforan). Powstała cząsteczka glukozo-6-fosforanu jest przekształcana do fruktozo-6-fosforanu przez izomerazę heksozofosforanową, a następnie fosforylowana do fruktoza-1,6-bisfosforanu z użyciem kolejnej cząsteczki ATP . Powstały fruktoza-1,6-bisfosforan jest rozkładany na dwie cząsteczki aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Aldehyd 3-fosfoglicerynowy zostaje ufosforylowany i utleniony do 1,3-bisfosfoglicerynianu z wytworzeniem cząsteczki NADH . Przekształcenie do 3-fosfoglicerynianu powoduje wytworzenie cząsteczki ATP . Kolejna cząsteczka ATP zostaje wytworzona na ostatnim etapie glikolizy- wytworzeniu pirogronianu.



Rys. 3. Fosforylacja oksydacyjna. Powstałe w cyklu Krebsa zredukowane nukleotydy NADH i FADH_2 mogą zostać utlenione na kompleksach enzymatycznych wchodzących w skład łańcucha oddechowego znajdującego się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. W wyniku fosforylacji oksydacyjnej powstaje gradient elektrochemiczny, który służy do syntezy ATP. W efekcie utleniania NADH i FADH_2 protony z matryks mitochondrialnej przenoszone są do przestrzeni międzybłonowej^[20]. Energia zgromadzona w postaci gradientu stężeń protonów i różnicy potencjału, określana nazwą potencjału elektrochemicznego, wykorzystana jest do wytwarzania ATP.

Kompleks I nazywany jest dehydrogenazą NADH. Podczas utleniania NADH protony z matryks mitochondrialnej przenoszone są do przestrzeni międzybłonowej. Przejściu dwóch elektronów z NADH na ubichinon towarzyszy przeniesienie czterech protonów z matryks do przestrzeni międzybłonowej.

Kompleks II to jeden z enzymów cyklu Krebsa – dehydrogenaza bursztynianowa zawierająca kilka centrów żelazo-siarkowych oraz dinukleotyd flawinoadeninowy. Elektrony ze zredukowanego FADH_2 podobnie jak w przypadku kompleksu I przekazywane są za pośrednictwem centrów żelazo-siarkowych. Kompleks II nie jest białkiem transbłonowym i nie posiada zdolności do przenoszenia protonów przez wewnętrzną błonę.

Zredukowany na kompleksie I lub II ubichinon przemieszcza się w błonie mitochondrialnej do kompleksu III łańcucha oddechowego nazywanego kompleksem bc_1 . Na kompleksie III zachodzi cykl Q, w wyniku którego dodatkowe protony przemieszczane są z matryks do przestrzeni międzybłonowej. Elektrony ze zredukowanego ubichinonu przenoszone są na cytochrom c – niewielkie hydrofilowe białko znajdujące się po stronie przestrzeni międzybłonowej, które po zredukowaniu na kompleksie III przenosi elektrony na kompleks IV.

Kompleks IV to oksydaza cytochromowa, która odbiera elektrony od cytochromu c i przekazuje je na cząsteczkę O_2 . Kompleks IV przenosi protony do przestrzeni międzybłonowej z matryks mitochondrialnej. Równocześnie powstaje cząsteczka H_2O .

W wyniku przenoszenia elektronów pomiędzy kompleksami I-IV jony H^+ przenoszone są z matryks mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej. Zgromadzoną w tej postaci energię wykorzystuje kompleks V czyli syntaza ATP. Syntaza ATP składa się z podjednostki F_0 stanowiącej kanał jonowy oraz podjednostki F_1 znajdującej się po stronie matryks przyłączającej do cząsteczki ADP fosforan nieorganiczny, wykorzystując energię potencjału elektrochemicznego. Wytworzenie jednej cząsteczki ATP wymaga przejścia do matryks 3,33 protonów.

Czujnik tlenu rozpuszczonego

Do oceny szybkości oddychania komórkowego wykorzystuje się pomiary stężenia tlenu rozpuszczonego, prowadzone w czasie. Na podstawie zmian stężenia tlenu można oznaczyć szybkość zużycia tlenu, a co za tym idzie, ocenić szybkość oddychania komórkowego. Do oceny zmian stężenia tlenu wykorzystuje się czujniki tlenu rozpuszczonego. Czujniki te można podzielić na dwa rodzaje: elektrochemiczne i optyczne.

Podczas wykonywania tego ćwiczenia wykorzystywany będzie czujnik optyczny tlenu rozpuszczonego. Optyczne czujniki tlenu rozpuszczonego (nazywane luminescencyjnymi) mierzą stężenie tlenu rozpuszczonego w oparciu o wygaszanie luminescencji w obecności tlenu. Czujniki te zbudowane są z diod elektroluminescencyjnych, barwnika luminescencyjnego oraz fotodetektora. Metoda pomiaru opiera się na fizycznym zjawisku luminescencji. Luminescencja to emitowanie światła przez luminofory wskutek oddziaływania impulsu świetlnego. Podczas pracy czujnika, impuls świetlny jest wysyłany przez diodę LED, która umieszczona jest w obudowie czujnika. Wskutek działania impulsu świetlnego luminofor emituje światło czerwone. Intensywność tej emisji zależy od stężenia tlenu rozpuszczonego. W celu ustalenia stężenia tlenu obliczany jest czas emisji światła czerwonego.

*Celem ćwiczenia jest porównanie intensywności oddychania komórkowego *Saccharomyces cerevisiae* w różnych warunkach temperaturowych z użyciem optycznego czujnika tlenu rozpuszczonego.*

Przebieg doświadczenia:

Przygotowanie stanowiska i odczynników:

1. Włącz zasilanie stanowiska przekręcając czerwone pokrętkę pod blatem w prawą stronę, a następnie przekręcając kluczyk. Na listwie powinna zaświecić się zielona dioda.
2. Włącz komputer i uruchom program zbierający dane „B40_Respiration in yeast” znajdujący się na pulpicie komputera.
3. Włącz interfejs znajdujący się obok komputera (guzik powinien zaświecić się na niebiesko).
4. Włącz czujnik tlenu rozpuszczonego przyciskiem znajdującym się na białej części obudowy czujnika.
5. Upewnij się, że pomiar stężenia DO_2 z czujnika tlenu rozpuszczonego jest zaznaczony wraz z pomiarem temperatury.
6. Oznacz cztery zlewki o pojemności 400 ml: temperatura „Pokojowa”, „Chłodna”, „Ciepła” i „Drożdże”.
7. Dodaj 200 ml wody destylowanej o temperaturze pokojowej do każdej zlewki o pojemności 400 ml.
8. Napełnij styropianowy pojemnik do 1/3 jej objętości lodem i wodą. Umieść „Chłodną” zlewkę w łaźni lodowej, tak aby całe 200 ml wody destylowanej wewnątrz chłodnej zlewki stykało się z lodem, ale nie pozwól, aby woda z lodem z zewnątrz dostała się do zlewki.
9. Umieść „Ciepłą” zlewkę na płycie grzejnej. Włącz płytę grzejną na niskie ustawienie. Aby włączyć płytę grzejną przełącz przełączniki tak jak pokazano na obudowie płyty. Wrzuć mieszadło magnetyczne i włóż termometr elektroniczny. Poczekaj aż woda nagrzej się do temperatury około $35^{\circ}C$.
10. Do zlewki „Drożdże” dodaj 7g drożdży suszonych instant i wymieszaj do utworzenia jednorodnej zawiesiny.
11. Zdejmij gumową nasadkę z czujnika tlenu rozpuszczonego (DO_2). Unikaj dotykania dolnej części czujnika.

Wykonanie pomiarów:

1. Umieść końcówkę termometru elektronicznego w wodzie w zlewce o temperaturze pokojowej. Gdy odczyt ustabilizuje się, zapisz temperaturę wody w tabeli 1. Wyjmij termometr, opłucz na dużej zlewce i odłóż go na bok.
2. Przytrzymaj sondę DO_2 w zlewce z wodą o temperaturze pokojowej, jak pokazano na rysunku 4. Nie pozwól, aby sonda zetknęła się ze zlewką i utrzymuj metalową część na końcu sondy całkowicie zanurzoną. Nie dopuść do zamoczenia obudowy czujnika.
3. Delikatnie mieszaj wodę sondą DO_2 przez 30 sekund.
4. Wymieszaj zawiesinę aktywowanych drożdży bagietką. Odmierz 50 ml zawiesiny za pomocą cylindra miarowego i wlej ją do zlewki o temperaturze pokojowej. Delikatnie zamieszaj (czujnik DO_2 cały czas powinien znajdować się w badanej zlewce).



Rys. 4. Czujnik stężenia tlenu zanurzony w wodzie wraz z metalową częścią.

5. Na komputerze, w zakładce „Room temperature”, wybierz START, aby rozpocząć zbieranie danych. Zapisz początkowe stężenie DO₂ w tabeli 1. Kontynuuj mieszanie i zapisywanie danych przez 2 minuty (120 sekund).
6. Zatrzymaj zbieranie danych przyciskiem STOP. Zapisz początkowe oraz końcowe stężenie DO₂ i dokładny czas, jaki upłynął w Tabeli 1.
7. Przepłucz czujnik DO₂ nad dużą zlewką i odłóż go na bok.
8. Z tabeli w komputerze wybierz 7 odczytów stężenia tlenu, co 20s, i zapisz je w tabeli 2.
9. Powtórz kroki 1-8 z „Ciepłą” zlewką, przełączając kartę w programie zbierającym dane za pomocą strzałki na kartę „Warm”. Pozostaw zlewkę na płycie grzejnej podczas wykonywania procedury.
10. Wyłącz płytę grzejną zaraz po wykonaniu pomiarów, postępując według wskazówek na obudowie płyty w odwrotnej kolejności.
11. Powtórz kroki 1-8 z „Zimną” zlewką, przełączając kartę w programie zbierającym dane za pomocą strzałki na kartę „Cool”. Pozostaw zlewkę na lodzie podczas wykonywania procedury.
12. Załóż gumową nasadkę na sondę DO₂.
13. Użyj następującego równania, aby obliczyć zmianę DO₂ dla każdego przebiegu; zapisz wynik w tabeli 1.

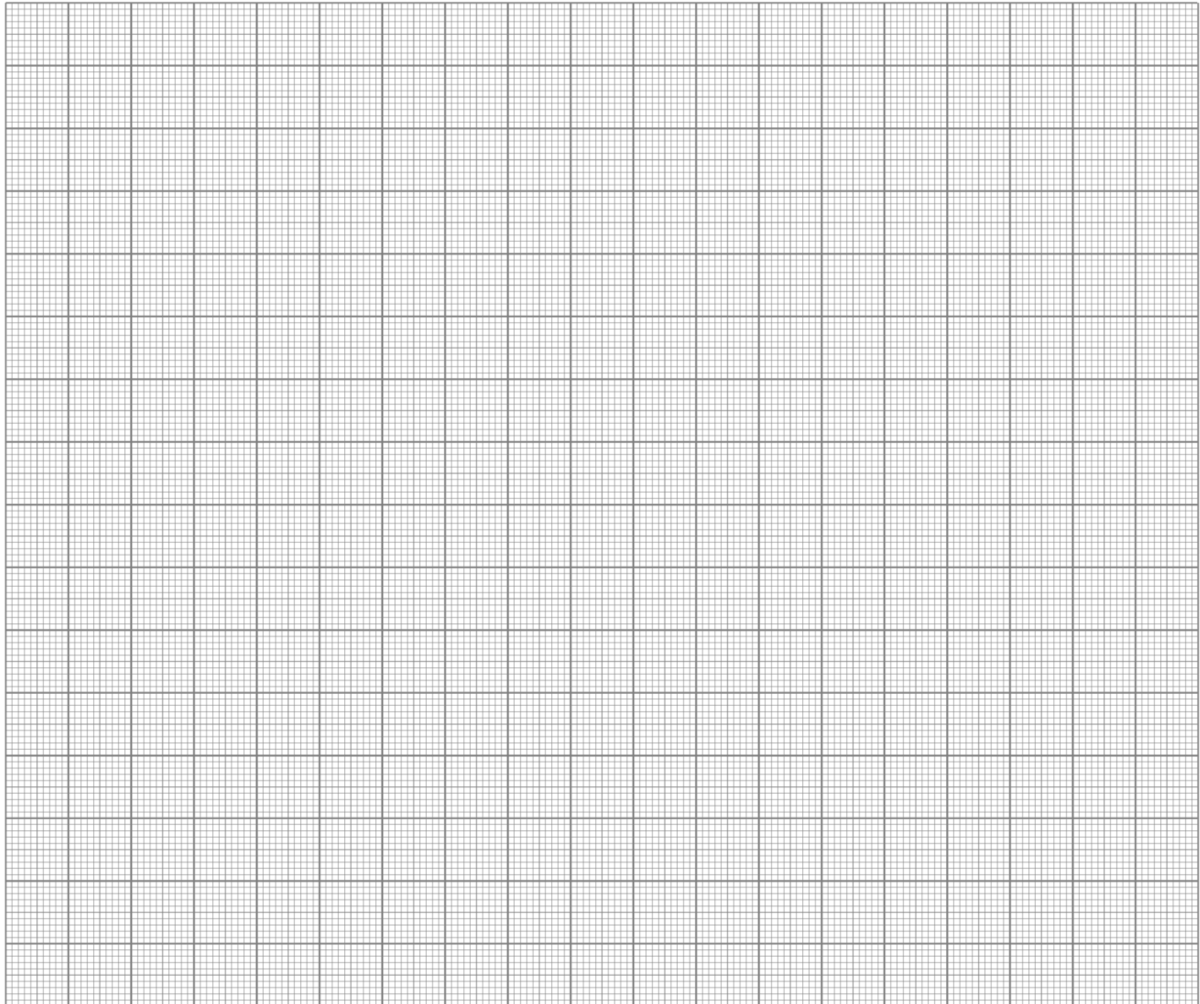
$$\text{Zmiana DO}_2 = \text{Końcowa DO}_2 - \text{Początkowa DO}_2$$

14. Za pomocą poniższego równania oblicz tempo zużycia tlenu przez drożdże i zapisz wynik w tabeli 1. Pamiętaj o zamianie jednostek!

$$\text{Szybkość zużycia DO}_2 = \text{Zmiana DO}_2 \div \text{Czas}$$

Analiza danych:

1. W celu analizy danych przedstaw dane z tabeli 2 na wykresie $c(t)$ wykorzystując papier milimetrowy poniżej. Pamiętaj o odpowiednim dobraniu skali.
2. Nanieś błąd pomiarowy stężenia tlenu, który wynosi 0,5mg/ml.
3. Różnice między wykresami w różnych warunkach temperaturowych przedyskutuj we wnioskach.



Pytania dodatkowe do dyskusji we wnioskach:

1. W której temperaturze poziom DO_2 spadał najszybciej? Co to wskazuje na potrzeby środowiskowe drożdży? Poprzyj swoją odpowiedź danymi.
2. Dlaczego zużycie tlenu jest dobrą miarą szybkości oddychania u drożdży? Dołącz opis, w jaki sposób cząsteczki tlenu są zużywane i jaki produkt powstaje podczas oddychania komórkowego.
3. Jeśli tlen nie jest obecny, oddychanie może nadal zachodzić. Jak nazywa się ten proces? Jakie dodatkowe produkty końcowe są wytwarzane?
4. Wyjaśnij różnicę w ilości energii wytwarzanej w procesie oddychania tlenowego i beztlenowego.

Literatura

Alberts B., Hopkin K, Johnson A.D., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. „Podstawy biologii komórki”, PWN 2019

Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S.A. „Biologia Campbella”, Rebis 2019

pl.wikipedia.org