

■ Indirekter Nachweis der Alkoholdehydrogenase (ADH)

Hefen sind einzellige Pilze. Sie gehören zu den Eukaryoten. Viele ihrer Enzyme wie z. B. ADH sind identisch mit denen in tierischen Zellen. Das Enzym ADH mit seinem Coenym NAD^+ katalysiert u. a. die Reaktion von Ethanol zu Azetaldehyd, NADH^+ und Wasserstoffionen (Protonen, H^+). Hefen spielen eine wichtige Rolle als Modellorganismen bei der Erforschung von Stoffwechselfvorgängen. Sie lassen sich leicht im Labor kultivieren, da sie sich rasch und problemlos durch Teilung vermehren. Die meisten Hefen sind nicht zwingend auf Sauerstoff für ihren Stoffwechsel angewiesen. Ihre Energiegewinnung erfolgt jedoch mit Sauerstoff effizienter als ohne.

Methylenblau ist ein Farbstoff, der in den Naturwissenschaften z. B. für das Färben von Zellstrukturen oder DNA verwendet wird. Schon geringste Mengen Methylenblau rufen in Wasser gelöst eine intensive Blaufärbung hervor. Methylenblau ist ein guter Wasserstoffionen-Akzeptor. Die bei der Verstoffwechselung von Ethanol freigesetzten Wasserstoffionen können von Methylenblau gebunden werden. Durch die Aufnahme von H^+ entfärbt sich die blaue Methylenblau-Lösung. Es entsteht das farblose Leuko-Methylenblau. Diese Entfärbung kann durch Sauerstoff in der Luft rückgängig gemacht werden. Der Luftsauerstoff reagiert mit den an Methylenblau gebundenen Protonen zu Wasser. Die Abgabe der Protonen wandelt die farblose Leukoform in die blaue Form des Methylenblaus um.

Alkoholabbau in Hefezellen

Beachten Sie bei der Durchführung des Experimentes alle geltenden Sicherheitsvorschriften!

Material

- | | |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Schutzhandschuhe | Frischhefe |
| Schutzbrille | 20 ml Methylenblau-Lösung (0,5%ig) |
| 4 Reagenzgläser mit Kappe | 10 ml Brennspritze (Ethanol-Lösung) |
| Reagenzglaständer | dest. Wasser |
| 2 Pipetten, 5 ml (für dest. Wasser bzw. Ethanol) | ggf. 10 ml Methanol bzw. 10 ml Ethylenglykol |
| 2 Messzylinder, 10 ml (für Hefesuspension bzw. Methylenblau) | |
| Pipettierhilfen | |
| kleiner Löffel | |
| Glasstab | |
| Wasserbad, 37 °C | |
| wasserfester Stift | |
| Kurzzeitwecker | |

Durchführung

- Nummerieren Sie die vier Reagenzgläser.
- Verrühren Sie sorgfältig einen halben Löffel Frischhefe in 20 ml dest. Wasser.
- Stellen Sie die folgenden Versuchsansätze her:

Reagenzglas	1	2	3	4
Hefesuspension	5 ml	5 ml	5 ml	0 ml
dest. Wasser	3 ml	5 ml	0 ml	5 ml
Methylenblau	5 ml	0 ml	5 ml	5 ml
Ethanol	0 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Farbe nach Herstellung des Ansatzes				
Zeit für die Reaktion (s. u.)				
Farbe nach 10 min. im Wasserbad				
nach dem Schütteln				

- Schütteln Sie die Proben gut durch und stellen Sie sie in das Wasserbad.
- Stopfen Sie die Zeit, die für die Entfärbung der fünf Proben benötigt wird. Die Beobachtungszeit wird auf 10 Minuten beschränkt. Notieren Sie Ihre Beobachtungen.
- Schütteln Sie die Proben in den Reagenzgläsern. Notieren Sie Ihre Beobachtungen.

Aufgaben

1. Stellen Sie die im Informationstext ‚Methylenblau‘ angegebenen Reaktionen (3) schematisch dar!
2. Führen Sie das Experiment durch und ergänzen Sie die Angaben in der Tabelle!
3. Deuten Sie die Ergebnisse der fünf Versuchsansätze! Nutzen Sie für die Interpretation der Ergebnisse die Informationen zu Hefen und Methylenblau! Veranschaulichen Sie Ihre Deutung mithilfe der Modellvorstellung zur Enzymwirkung!

Für Interessierte: Überprüfen Sie, ob dieser Versuch auch mit Methanol und Ethylenglykol funktioniert! Verlängern Sie die Beobachtungszeit.