

Tierphysiologisches Anfängerpraktikum

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung

1.1. Biomoleküle

1.1.1. Proteine

1.1.2. Kohlenhydrate

1.1.3. Nukleinsäuren

1.1.4. Lipide

1.2. Reservestoffe

1.3. Energiegewinnung der Zelle

1.3.1. Glykolyse

1.3.2. Citratzyklus

1.3.3. Atmungskette und oxidative Phosphorylierung

1.4. Energiefluss im Tier

1.5. Energiegehalt

1.5.1. physikalischer Brennwert

1.5.2. physiologischer Brennwert

1.6. Kalorimetrie

1.7. Respiratorischer Quotient

2. Material und Methoden

2.1. Phillipson-Bombe

2.2. Versuchsdurchführungen

2.2.1. Versuch 1: Bestimmung des Energiegehaltes von Reinsubstanzen

2.2.2. Versuch 2: Quantitative Bestimmung des Proteingehaltes von Fett – und Muskelgewebe vom Rind

2.2.3. Versuch 3: Quantitative Bestimmung des Lipidgehaltes von Fett – und Muskelgewebe vom Rind

3. Ergebnisse

3.1. Versuch 1: Kalorimetrie

3.2. Versuch 2: Bestimmung des Proteingehaltes

3.3. Versuch 3: Bestimmung des Lipidgehaltes

4. Diskussion

5. Quellenangaben

6. Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Biomoleküle

1.1.1. Proteine

Proteine sind in der lebenden Zelle sehr häufig vorhanden und sind komplizierter aufgebaut als andere Biomoleküle. Sie können dadurch eine Reihe sehr unterschiedlicher Funktionen ausüben, nach denen sie klassifiziert werden können:

Strukturproteine sind in der Zelle vor allem beim Aufbau des Cytoskeletts und zur mechanischen Festigung extrazellulärer Strukturen von Bedeutung. Ein Beispiel hierfür ist Keratin, das in Haaren, Nägeln und Federn enthalten ist.

Speicherproteine dienen der Speicherung von Aminosäuren, z.B. wird Ovalbumin im Hühnereiweiß gelagert, um den Embryo mit Aminosäuren zu versorgen.

Transportproteine sind für den Transport unterschiedlicher Stoffe zuständig. Myoglobin zum Beispiel transportiert Sauerstoff in den Muskel und ist dort ebenfalls für die Speicherung zuständig.

Hormonelle Proteine regulieren und steuern den Stoffwechsel eines Organismus. Insulin und Glucagon sind Gegenspieler in der Regulation des Blutzuckerspiegels, indem Insulin Blutzucker senkend wirkt und Glucagon hingegen die Erhöhung des Glucosespiegels bewirkt.

Rezeptorproteine nehmen chemische Signale aus der Umgebung auf, indem Liganden an sie binden und leiten das Signal meist intrazellulär weiter. Die Tyrosinkinase ist ein solcher Rezeptor der Insulin oder bestimmte Wachstumsfaktoren binden kann.

Kontraktile Proteine sind für die Bewegung zuständig. Z.B. sind Actin und Myosin für die Kontraktion in den Muskelzellen verantwortlich.

Abwehrproteine sind Teil des Immunsystems, indem sie den Körper vor Krankheiten schützen. Antikörper binden bei Befall der Zelle durch Bakterien oder Viren an diese und machen diese unwirksam.

Enzyme sind Biokatalysatoren die chemische Reaktionen beschleunigen, indem sie die Aktivierungsenergie herunter setzen. Das Enzym Lactatdehydrogenase zum Beispiel katalysiert die Umwandlung von Pyruvat in Lactat.

Alle Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut. Eine Aminosäure hat im Zentrum ein asymmetrisches Kohlenstoffatom an das eine Carboxylgruppe, eine Aminogruppe, ein Wasserstoffatom und ein Rest gebunden sind (typischer Aufbau siehe Abbildung 1). Der Rest bestimmt die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Aminosäure. Er kann unpolar (hydrophobe Seitenkette, z.B. besteht der Rest beim Glycin aus einem einzelnen H-Atom), polar (hydrophile Seitenkette), geladen oder ungeladen sein.

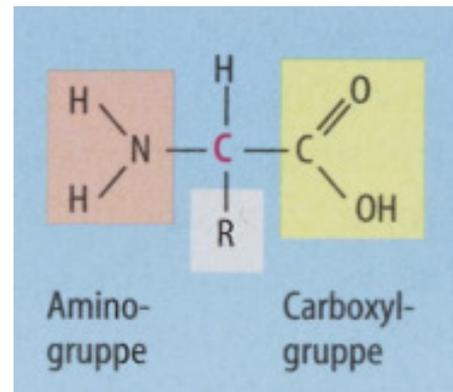


Abb. 1: Aufbau einer Aminosäure
aus: Campbell, Biologie, S.86

Mehrere Aminosäuren werden durch eine Peptidbindung unter Wasserabspaltung miteinander verbunden. Die Abfolge mehrerer Aminosäuren wird als **Primärstruktur** bezeichnet. Sie besitzt Abschnitte, die auf eine bestimmte Art und Weise räumlich gewunden bzw. gefaltet sind, was als **Sekundärstruktur** bezeichnet wird. Vorkommende Strukturen sind hierbei die α -Helix und das β -Faltblatt. Die α -Helix ist durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, die jeweils die Carboxylgruppe des einen Loops und die Aminogruppe des darüber liegenden Loops verbinden. Bei der β -Faltblattstruktur liegen 2 oder mehrere Abschnitte der Polypeptidkette parallel zueinander, die ebenfalls durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammen gehalten werden.

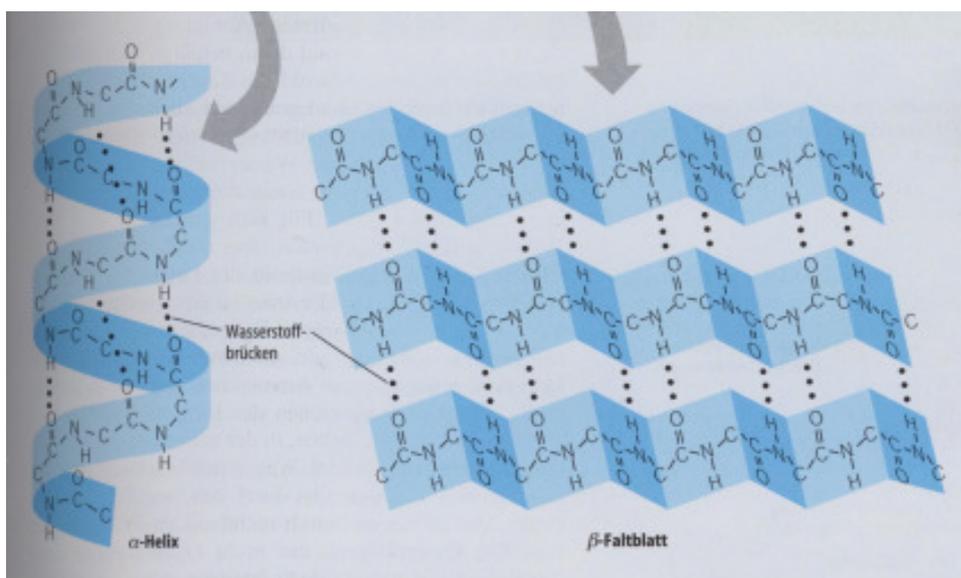


Abb.2: Sekundärstruktur der DNA
aus: Campbell, Biologie, S.91

Die **Tertiärstruktur** ist die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturen, welche entsteht, indem die Reste der Aminosäureketten durch Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Wechselwirkungen, Di-Sulfidbrücken oder Ionenbindungen in Wechselwirkung treten. Die **Quartärstruktur** beschreibt die räumliche Anordnung der verschiedenen Untereinheiten (Polypeptidketten) eines Proteins.

Ein Beispiel für die Quartärstruktur eines Proteins ist das Kollagen, welches drei helikalen Untereinheiten besteht, die zusätzlich noch superspiralisiert sind. Die Quartärstruktur des Kollagens bildet eine seilähnliche Struktur und ist durch diese sehr stabil.

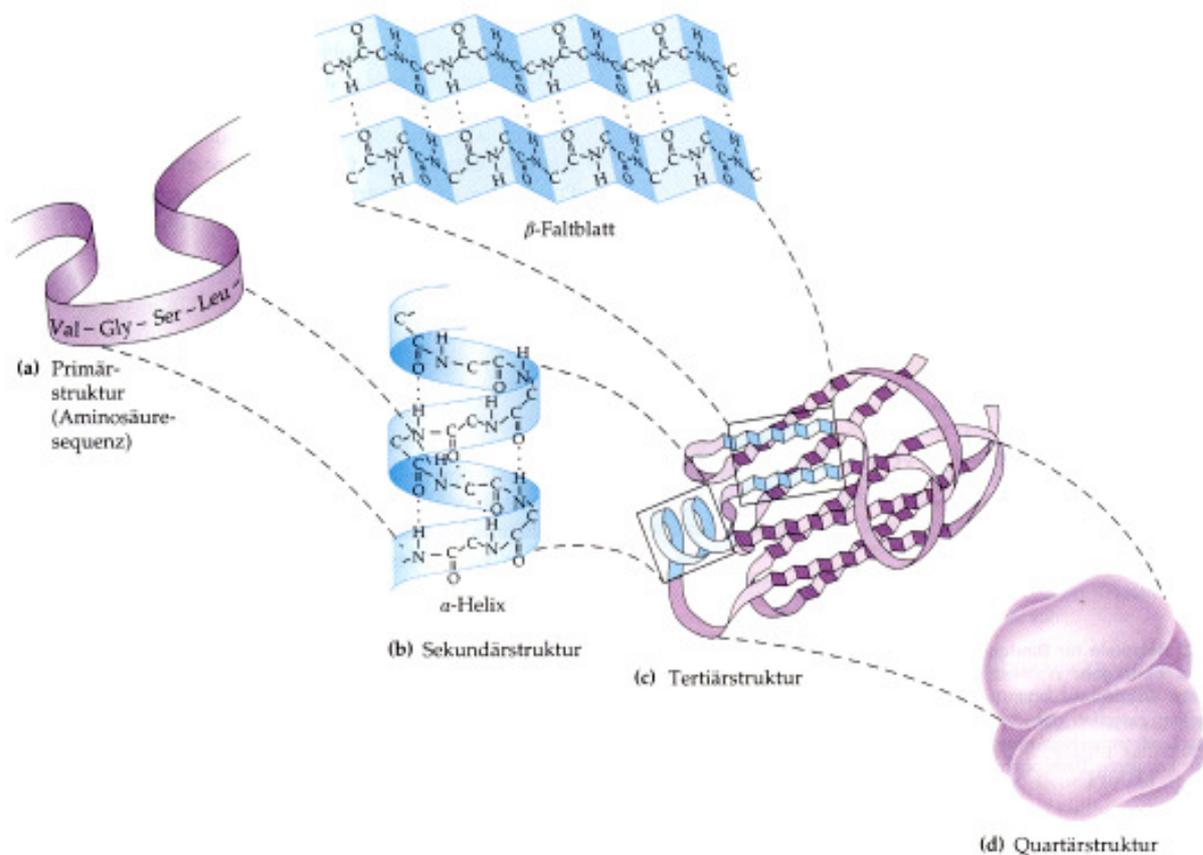


Abb. 3: Übersicht über die vier Ebenen der Proteinstruktur
Campbell, Biologie, S.93

1.1.2. Kohlenhydrate

Zu den Kohlenhydraten zählen die Zucker und ihre Polymere. Sie besitzen die allgemeine Summenformel $C_nH_{2n}O_n$. Sie werden in Monosaccharide, Disaccharide, Oligosaccharide und Polysaccharide unterteilt.

Monosaccharide:

Monosaccharide sind die einfachsten Kohlenhydrate, welche auch als Einfachzucker bezeichnet werden. Sie besitzen eine Carbonylgruppe und werden je nach deren Lage als Aldose (Aldehydgruppe) oder Ketose (Keto-Gruppe) bezeichnet. Sie haben außerdem noch mehrere Hydroxygruppen. Je nach Länge des Kohlenstoffgerüsts (üblicherweise 3-7 C-Atome) werden sie als Triosen, Tetraosen, Pentosen, Hexosen oder Heptosen bezeichnet.

Glucose, eine Aldohexose ist das wichtigste natürliche Monosaccharid. Sie spielt vor allem eine große Rolle bei der

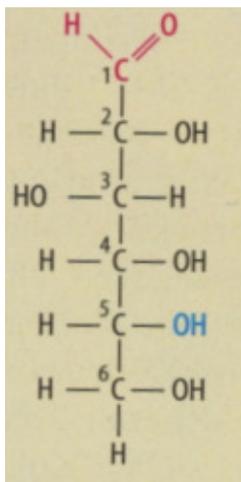


Abb. 4a: lineare Form der Glucose
aus: Campbell, Biologie, S.78

Zellatmung, da aus Glucose fast die gesamte Energie gewonnen wird. In Abbildung 4a ist die lineare Form der Glucose dargestellt. Durch einen Ringschluss (siehe Bild 4b) des C₅-Atoms mit dem Sauerstoff der Aldehydgruppe entsteht die Ringform, in der die Glucose in 99,9% der Fälle vorliegt.

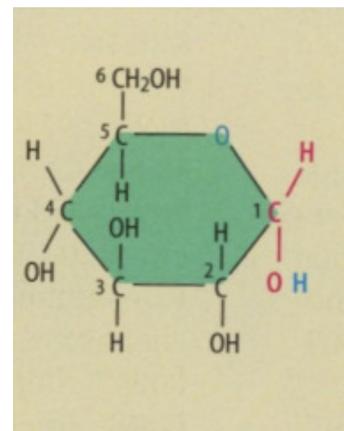


Abb. 4b: Ringform der Glucose
aus: Campbell, Biologie, S.78

Disaccharide:

Ein Disaccharid entsteht, indem die Hydroxygruppe eines Monosaccharids glycosidisch mit einer der OH-Gruppen eines weiteren Zuckers verknüpft wird. Zum Beispiel werden zwei Glucose-Moleküle unter Abspaltung von Wasser glycosidisch zu Maltose (Malzzucker) verbunden. Lactose (Milchzucker) entsteht durch Verknüpfung von Galactose und Glucose.

Polysaccharide:

Polysaccharide sind Polymere aus sehr vielen Monosacchariden, die den Bau und die Funktion des Polysaccharids bestimmen. Polysaccharide, die nur aus einer Art von Monosaccharid aufgebaut sind, nennt man Homoglycane. Wenn sie aus mehreren verschiedenen Einfachzuckern aufgebaut sind, bezeichnet man sie als Heteroglycane. Polysaccharide dienen vor allem der Speicherung und als Strukturbaustein.

Ein Beispiel für ein Strukturpolysaccharid ist die Cellulose in der Zellwand von Pflanzen. Sie ist ein Homoglycan aus β -1,4-glycosidisch verknüpfter Glucose.

Stärke ist das Speicherprotein der Pflanzen. Sie besteht aus Amylose (unverzweigte α -1,4-glycosidische Bindung vieler Glucosemonomere) und Amylopektin (ebenfalls α -1,4-glycosidische Bindungen, die noch durch α -1,6-glycosidische Bindungen verzweigt sind). Bei Tieren ist Glycogen, ein Glucosepolymer das Hauptspeicherpolysaccharid.

1.1.3. Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure ist ein Polymer aus Nukleotiden. Ein Nukleotid besteht aus einer stickstoffhaltigen Base, einer Pentose und einer Phosphatgruppe. DNA (Desoxyribonukleinsäure) besitzt als Pentose Desoxyribose, RNA (Ribonucleinsäure) Ribose. Die Basen der DNA sind die Pyrimidine Cytosin und Thymin und die Purine Adenin und Guanin. Die RNA enthält anstatt Thymin das Pyrimidin Uracil. Die einzelnen Nukleotide werden über Phosphodiesterbindungen, die sich zwischen dem Phosphat des einen Nucleotids und dem Zucker des nächsten ausbilden, miteinander verbunden (Zucker-Phosphat-Backbone). Die RNA liegt in der Zelle meist einzelsträngig vor, wohingegen die DNA als Doppelstrang vorkommt. Bei Doppelsträngen verbinden sich über Wasserstoffbrücken je eine Pyrimidinbase mit einer Purinbase, Cytosin mit Guanin und Thymin mit Adenin. Durch die Drehung des Doppelstrangs um eine imaginäre Achse entstehen gleichmäßige Windungen. Diese Struktur wird als Helix bezeichnet.

1.1.4. Lipide

Die Lipide sind wasserunlösliche Biomoleküle, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen in drei Gruppen eingeteilt werden können: **Fette**, welche hauptsächlich als Energiereserve dienen, **Phospholipide**, aus denen Membranen aufgebaut sind und **Isoprenederivate**, die Grundbaustein für Hormone sind.

Fette:

Jedes Fettmolekül besteht, wie in Abbildung 5 verdeutlicht wird, aus einem Glycerinmolekül, an welches über Esterbindungen (womit eine Wasserabspaltung verbunden ist) drei Fettsäureketten gebunden sind und wird deshalb als Triglycerid bezeichnet. Glycerin ist ein Alkohol mit einem Grundgerüst aus drei C-Atomen, an die jeweils eine Hydroxygruppe gebunden ist. Dies ist entscheidend für den teilweise hydrophilen Charakter der Fette. Fettsäuren sind langkettige Kohlenstoffgerüste, die am einen Ende eine Carboxylgruppe haben. Sie können entweder ungesättigt (mit mindestens eine Doppelbindung) oder gesättigt (nur Einfachbindungen) vorkommen. Der Grund dafür, dass Fette hydrophob sind, sind die unpolaren C-H-Bindungen in den Kohlenwasserstoffketten der Fettsäure.

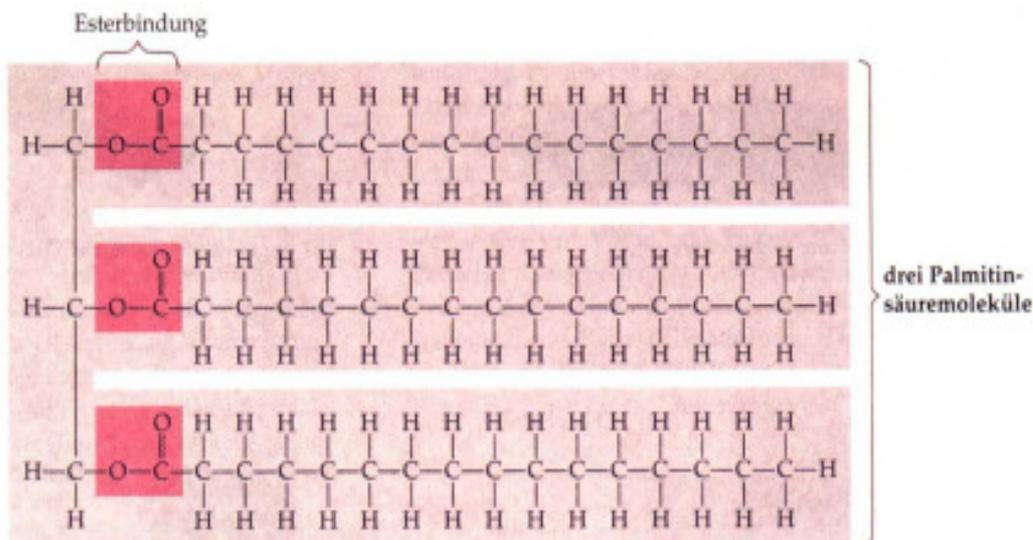


Abb. 5: Aufbau eines Fettmoleküls
aus: Campbell, Biologie, S.83

Phospholipide:

Die Phospholipide sind prinzipiell ähnlich aufgebaut wie die Fette, nur dass eine der äußeren Fettsäureketten des Triglycerids durch eine phosphathaltige Gruppe ersetzt wurde. Phospholipide sind amphothere Moleküle, d.h. ihre aus Kohlenwasserstoff bestehenden Schwänze sind hydrophob, wohingegen der aus der Phosphatgruppe und dem Glycerin bestehende Kopf hydrophilen Charakter hat. Diese Eigenschaften sind bestimmend für ihr Verhalten im Wasser: sie ordnen sich stets so an, dass nur die hydrophilen Köpfe Kontakt zum Außenmilieu haben. Dies führt zu den typischen Strukturen der Phospholipide, die entweder als Micelle oder in einer Doppelschicht angeordnet sind. Die Phospholipid-Doppelschicht ist in der Natur von einzigartiger Bedeutung, da sie der Grundbaustein für nahezu alle biologischen Membranen darstellt.

Isoprenoide:

Isoprenoide sind Moleküle, die aus Isopren (2-Methyl-1,3butadien) aufgebaut sind. Sie werden in die beiden Großgruppen Terpene und Steroide aufgeteilt, von denen hier nur die Steroide betrachtet werden.

Steroide sind grundlegend aus vier aneinander gereihten Kohlenstoffringen, welche als Gonan bezeichnet werden, aufgebaut. Sie lassen sich alle vom Cholesterinmolekül ableiten, welches durch verschiedene Stoffwechselprozesse aus Isoprenbausteinen entsteht. Durch Veränderung der Cholesterinstruktur entstehen Steroide, die durch unterschiedliche Seitenketten verschiedene Funktionen ausüben können. Hierzu gehören zum Beispiel die Sexualhormone Testosteron oder Östradiol.

1.2. Reservestoffe

Reservestoffe sind Verbindungen, die der Körper bildet um sie bei Bedarf (Hunger, Bewegung usw.) wieder zu zerlegen, wobei die gespeicherte Energie frei wird. Den Großteil an Reservestoffen bilden die Kohlenhydrate Glycogen und Stärke. Glycogen ist ein tierisches Speicherpolysaccharid, das aus vielen Glucosemolekülen besteht und das bei Anstrengung oder Stress durch Adrenalin abgebaut wird und von der Zelle in Form von Glucose genutzt werden kann. Stärke ist ein pflanzliches

Speicherpolysaccharid, das aus Amylose und Amylopektin besteht. Es wird hydrolytisch gespalten und dadurch, wie das Glycogen als Glucose für die Zellen nutzbar gemacht. Stärke wird in der Pflanze hauptsächlich in den Samen oder in der Knolle gespeichert.

Weitere Reservestoffe sind die Fette, die sehr energiereich sind. Wenn über die Nahrung zu viele Stoffe aufgenommen werden, werden sie in Fett verwandelt und in die Gewebe eingelagert. Fette dienen als Langzeitspeicher, da sie in großen Mengen angelegt werden können und nicht zum osmotischen Druck beitragen.

1.3. Energiegewinnung der Zelle

Die Zelle kann auf verschiedene Arten Energie gewinnen, durch so genannte katabole (Energie liefernde) Stoffwechselwege. Hierzu zählt die Gärung, ein Weg unter anaeroben Bedingungen Energie zu gewinnen, sowie die Zellatmung. Sie ist der meist genutzte und auch effizienteste Weg der aeroben Energiegewinnung. In den Zellen werden dabei Glucose und Sauerstoff über viele Schritte zu Wasser und Kohlendioxid umgewandelt. Die Reaktion ist stark exergonisch und es entsteht pro Mol Glucose eine freie Energie von $\Delta G = -2870 \text{ kJ}$. Diese freiwerdende Energie wird in Form von ATP (Adenosintriphosphat) gespeichert. Das ATP wird in der Zelle zu ADP+P hydrolysiert, dabei wird Energie frei, die auf über den Phosphatrest als Energiequelle der Zelle zur Verfügung.



Die Zellatmung läuft in der Zelle in den Mitochondrien und außerhalb dieser im Cytosol statt. Die durch die Oxidation der Glucose freiwerdende Energie wird nicht auf einmal freigesetzt, sondern Schrittweise. Deshalb wird die Zellatmung auch in mehrere Schritte unterteilt: die Glykolyse, den Citratzyklus und die Atmungskette (und dabei die oxidative Phosphorylierung) (siehe Abbildung 6).

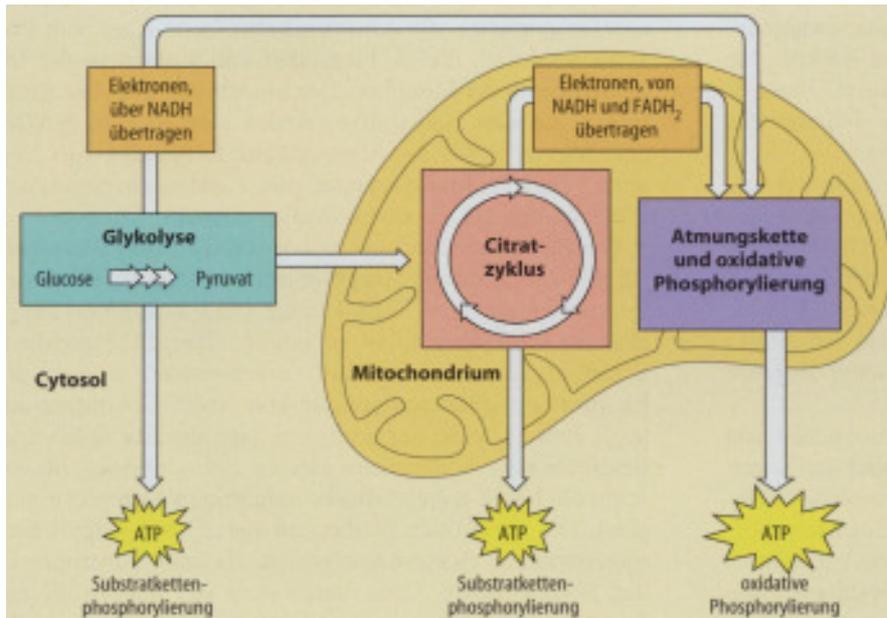


Abb. 6: Zellatmung, aus: Campbell, Biologie, S.190

1.3.1. Glykolyse

Beim ersten Schritt der Zellatmung im Cytosol wird die Glucose oxidiert zu 2 Molekülen Pyruvat (ein C₃-Körper), gleichzeitig wird NADH reduziert zu NADH/H⁺, außerdem entstehen 2ATP. Die Glykolyse kann sowohl anaerob, wie auch aerob ablaufen, ist also Teil der Milchsäuregärung und der Zellatmung.

Die Glykolyse besteht aus zehn Einzelschritten (siehe Abbildung), die alle durch ein Enzym katalysiert werden. Für die ersten fünf Schritte ist Energieaufwand erforderlich, die darauf folgenden Schritte bewirken eine Energiezurückgewinnung:

Die Glucose in der Zelle wird durch eine Hexokinase unter ATP-Verbrauch zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert, welches die Zelle nicht mehr verlassen kann, da die Zelle für Ionen undurchlässig sind.

Glucose-6-Phosphat wird durch eine Phosphoglucosomerase zu Fructose-6-Phosphat isomerisiert.

Fructose-6-Phosphat wird wiederum unter Energieverbrauch (ATP → ADP+P) durch das Enzym Phosphofruktokinase zu Fructose-1,6-Bisphosphat phosphoryliert.

Es wird durch eine Aldolase zu Glyceronphosphat oder Glycerinalphosphat umgewandelt.

Diese beiden Moleküle können durch eine Isomerase ineinander übergehen. Dies ist wichtig, da bei den weiteren Wegen der Glykolyse nur das Glyceralphosphat weiter reagiert und somit trotzdem pro Glucose zwei Glyceralphosphat entstehen.

Glyceralphosphat wird durch die Glyceralphosphatdehydrogenase zu 1,3-Biphosphoglycerat oxidiert. Hierbei wird genauer gesagt die Aldehydgruppe des Glyceralphosphat mit NAD^+ hydriert. Diese Reaktion ist stark exergon, d.h. es wird Energie frei. Diese wird gespeichert, indem ein anorganisches Phosphat an Glyceralphosphat gebunden wird. Wenn wie hier die durch Oxidation gewonnene Energie in ATP gespeichert wird, wird das auch Substratkettenphosphorylierung genannt.

Das entstandene 1,3-Biphosphoglycerat wird durch die Phosphoglyceratkinase zu 3-Phosphatglycerat umgewandelt, das hierbei frei gewordene Phosphat reagiert mit ADP zu ATP. Dies ist der erste Schritt, bei dem Energie frei geworden ist und in Form von ATP gespeichert wurde.

3-Phosphoglycerat wird durch das Enzym Phosphoglyceratmutase zu 2-Phosphoglycerat umgesetzt.

2-Phosphoglycerat wird durch eine Endolase zu Phosphoenolpyruvat hydrolisiert.

Durch die katalytische Reaktion der Pyruvatkinase wird Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat umgesetzt. Die freiwerdende Energie (durch das abgespaltene Phosphat) wird in Form von ATP gespeichert.

1.4.2. Citratzyklus

Die Kopplung zwischen der Glykolyse und dem folgenden Citratzyklus ist die oxidative Decarboxylierung. Das Pyruvat wird aus dem Cytosol in das Mitochondrium eingeschleust und dort durch einen Multienzymkomplex zu Acetyl-Co-A umgesetzt.

Es wird als erstes vom Pyruvat ein CO_2 abgespalten, der Rest wird oxidiert. Dabei wird NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. Als letztes bindet das Coenzym A (Co-A-SH) an das Molekül, dadurch entsteht dann das Acetyl-Co-A, das sehr instabil ist und damit sehr reaktionsfreudig ist.

Das Acetyl-Co-A wird nun in den Citratzyklus (auch Zitronensäurezyklus genannt) eingeschleust, der in der Mitochondrienmatrix abläuft. Es überträgt seine 2 C-Atome unter Addition eines Wassermoleküls an das Oxalacetat, dabei wird das Coenzym A

wieder abgespalten und es entsteht ein Körper, der 6 C-Atome enthält: das Citrat (Zitronensäure). In den darauf folgenden Schritten wird das Citrat (C-6-Körper) wieder zu Oxalacetat (C-4-Körper) oxidiert. Dabei werden 2 C-1-Körper frei gesetzt, in Form von CO_2 . Die freiwerdende Energie wird größtenteils in dem Reduktionsäquivalent NADH/H^+ gespeichert. Es entstehen also pro Acetyl-Co-A 2CO_2 , $3\text{NADH}/\text{H}^+$, $1\text{FADH}/\text{H}^+$ und 1ATP .

1.4.3. Atmungskette und oxidative Phosphorylierung

Bei den vorherigen beiden Schritten wurde Glucose zu Kohlendioxid reduziert, aber es wurde noch kein Sauerstoff gebraucht, ebenso wenig ist bisher Wasser entstanden. Dies passiert erst in der Atmungskette, an die die oxidative Phosphorylierung gekoppelt ist, in der letztendlich dann die Energie in Form von ATP entsteht.

In die stark gefaltete Mitochondrienmembran sind vier Enzymkomplexe eingelagert. Das in der Glycolyse und im Citratzyklus entstandene NADH/H^+ gibt seine Elektronen an den ersten Komplex ab, genauer gesagt an die prosthetische Gruppe des Flavinmononucleotid (FMN), das dadurch reduziert wird. Das FMN gibt dann die Elektronen weiter an das nächste Protein, welches wiederum reduziert wird, somit wird das FMN gleichzeitig oxidiert, d.h. es erlangt seinen Ausgangszustand wieder. Der Vorgang der Reduktion und Oxidation wiederholt sich in allen vier Komplexen, bis die Elektronen auf das letzte Protein im Komplex IV übertragen werden, das Cytochrom a_3 . Dieses überträgt seine Elektronen nicht auf ein weiteres Molekül in der Mitochondrienmembran, sondern auf Sauerstoff der folglich reduziert wird und nun aus der umgebenden Lösung Protonen binden kann und somit Wasser entsteht. Die Atmungskette ist also vor allem dafür da, dass die freie Energie, die bei der Übertragung von Elektronen vom NADH/H^+ auf O_2 nicht auf einmal frei wird, sondern es finden Elektronenübertragungen zwischen Reaktionszentren mit stetig abnehmenden Redoxpotentialen statt (sonst käme es zu einer Knallgasreaktion bei der die Energie durch Wärme frei wird und folglich der Zelle schaden könnte).

Die frei werdende Energie wird in die Transportarbeit bei der Erzeugung eines Protonengradienten investiert. Der Protonentransport verläuft parallel zum Elektronentransport, da einige der Komplexe neben Elektronen auch noch Protonen aufnehmen müssen, was bewirkt, dass Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum gelangen. Durch diesen Vorgang bildet sich ein Protonengradient (und damit unterschiedlicher pH-Wert) aus zwischen der Matrix und dem Intermembranraum, was zur Folge hat, dass die Protonen entlang ihres Gradienten zurück diffundieren wollen. Dies geht aber nur durch das Enzym ATP-Synthase, da die Membran relativ undurchlässig ist für Protonen.

Sie ist aus einem Rotor, einer Achse und einem Kopf aufgebaut und wirkt wie eine Art Wasserrad: Die Protonen diffundieren in den sog. Rotor der ATP-Synthase, der daraufhin beginnt sich zu drehen. Durch die Rotation dreht sich die Achse mit und bewirkt eine Konformationsänderung des Kopfes und aktiviert damit die aktiven Zentren des Komplexes an denen sich ADP und anorganisch gebundenes Phosphat zu ATP verbinden. Diese Energiegewinnung wird auch als Chemiosmose bezeichnet.

Insgesamt entstehen bei der Zellatmung pro mol Glucose 38mol ATP (ein mol ATP liefert eine Energie von ca. 30,5kJ), was einer Energieausbeute von 2870kJ/mol Glucose entspricht.

1.5. Energiefluss im Tier

Der Organismus ist ein offenes System, das bedeutet, dass die Energie zwischen dem Organismus und der Umwelt ausgetauscht werden kann. Tiere nehmen Energie in Form von Nahrung und Nährstoffen auf und geben sie wieder ab als Wärme und Stoffwechselabfallprodukte (CO₂).

Hierbei ist wichtig, dass die Energie zwar umgewandelt werden kann, aber niemals verbraucht oder erzeugt werden kann. Durch jede Energieumwandlung vergrößert sich die Unordnung im Universum, also die Entropie. (Hauptsätze der Thermodynamik).

Tiere nehmen Energie über ihre Nahrung auf, die dann im Körper verdaut wird, wobei Wärme frei wird. Die energiereichen Kohlenstoffgerüste werden dann durch Reabsorption in die Zellen aufgenommen und dort durch die Zellatmung und Gärung

in ATP umgewandelt, so dass es dem Körper für die Zellarbeit zur Verfügung steht. Dadurch wird den einzelnen Organen ermöglicht ihre Funktion auszuüben. Allein hierfür braucht der Körper im Ruhezustand täglich ungefähr 50-65kg ATP, also nur um das Überleben zu sichern. Bei dem Verbrauch von ATP wird die Energie in Form von Wärme freigesetzt, so dass die gesamte Energie erhalten bleibt, sie somit nur umgewandelt wird. Wenn dem Körper dann noch mehr Nahrung und ATP zur Verfügung steht, kann diese bei der Biosynthese verbraucht werden, also für das Wachstum, zur Regeneration, Speicherung usw.

1.5. Energiegehalt

1.5.1. physikalischer Brennwert

Der Gesamtenergiegehalt, den eine Substanz besitzt wird als physikalischer Brennwert bezeichnet. Es ist also diejenige Energie, die frei wird, wenn man eine Substanz vollständig zu CO_2 und H_2O verbrennt. Dieser lässt sich experimentell durch Verbrennung der Substanz im Kalorimeter bestimmen.

1.5.2. physiologischer Brennwert

Der physiologische Brennwert hingegen ist der Energiegehalt, den eine Substanz dem Körper durch Oxidation zur Verfügung stellt.

Bei Fetten und Kohlenhydraten entspricht der physiologische Brennwert dem physikalischen, da beide im Körper ihren gesamten Energiegehalt bei der Verbrennung zur Verfügung stellen und letztendlich die Stoffe zu CO_2 und H_2O oxidiert wurden.

Bei Proteinen jedoch ist der physiologische Brennwert kleiner als der physikalische, da sie stickstoffhaltige Verbindungen besitzen, die in Form von Ammoniak, Harnstoff oder Harnsäure ausgeschieden werden müssen, da sie schädlich für den Körper sind. Der Energiegehalt dieser Exkrete (ca. 1,3 kcal/g(aufgenommenes Protein)) steht dem Körper also nicht zur Verfügung, wird aber beim physikalischen Brennwert mit einberechnet.

1.6. Kalorimetrie

Bei der **direkten Kalorimetrie** wird die freigesetzte Wärme gemessen und daraus die Stoffwechselintensität berechnet. Das Problem der direkten Kalorimetrie liegt darin, dass die unnatürlichen Versuchsbedingungen sich auf das Verhalten und damit auch auf den Stoffwechsel des Tiers auswirken.

Bei der **indirekten Kalorimetrie** wird die Stoffwechselrate aus dem Vergleich von aufgenommener Energie (Nahrung) zu abgegebener Energie (nicht verwertbare Stoffe in Kot und Urin) abgeschätzt.

Eine spezielle Form der indirekten Kalorimetrie ist die **Bombenkalorimetrie**. Hierbei wird der Energiegehalt sowohl der Nahrung als auch der Exkretionsprodukte über die Verbrennungswärme ermittelt.

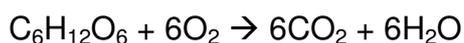
1.7. Respiratorischer Quotient

Der Respiratorische Quotient (RQ) beschreibt das Verhältnis von Volumen an abgegebenem Kohlendioxid zum Volumen an aufgenommenen Sauerstoff, was mit folgender Gleichung bestimmt werden kann:

$$\text{RQ} = \frac{[\text{CO}_2 - \text{Abgabe}]}{[\text{O}_2 - \text{Aufnahme}]}$$

Der Wert des Respiratorischen Quotients ist für jede Substanz charakteristisch.

Für die Oxidation von Kohlenhydraten beträgt der RQ=1. Dies lässt sich am Beispiel von Glucose verdeutlichen:

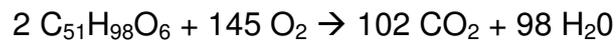


→ 6 Volumenanteile CO₂ werden zu 6 Volumenanteilen O₂

$$\text{RQ} = \frac{6 * \text{CO}_2}{6 * \text{O}_2} = 1$$

Es wird also genauso viel CO₂ abgegeben wie O₂ verbraucht wird.

Bei der Verbrennung von Fetten wird mehr O₂ aufgenommen, als CO₂ abgegeben, was sich anhand von der Oxidation des Tripalmitins darstellen lässt:



$$\rightarrow \text{RQ} = \frac{102 * \text{CO}_2}{145 * \text{O}_2} = 0,70$$

Die RQ-Werte der verschiedenen Fette unterscheiden sich leicht, da diese eine unterschiedliche Anzahl an Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Wasserstoffatomen besitzen.

Bei den Proteinen ergibt sich das Problem, dass der physiologische Brennwert kleiner ist wie der physikalische, deshalb muss man die Menge an aufgenommenem Protein kennen, sowie die Menge und Art der stickstoffhaltigen Exkretstoffe kennen, um den RQ zu berechnen. Er liegt normalerweise bei ungefähr 0,8.

2. Material und Methoden

2.1. Phillipson-Bombe

Bei einer kalorimetrischen Bombe wird die Verbrennungswärme einer Substanz durch Verbrennen im Sauerstoffüberschuss (30 bar) bei konstantem Volumen gemessen. Die abgegebene Wärme, die nach der Verbrennung in der Bombe frei wird, entspricht der Abnahme der inneren Energie der reagierenden Substanzen.

Die zu messende Substanz (in Form einer Tablette) wird mit einem Platindraht umwickelt, der das Ganze zum Zünden bringt. Nach der Verbrennung misst das Peltierelement die Wärmedifferenz zwischen der Verbrennungsbombe und dem isolierten Aluminiumreferenzblock. Die Temperaturänderung wird vom Peltierelement in eine Spannungsänderung umgesetzt und vom Schreiber zu Papier gebracht.

2.2. Versuchsdurchführungen

2.2.1. Versuch 1: Bestimmung des Energiegehaltes von Reinsubstanzen

Zu Beginn werden die einzelnen Proben abgewogen und mit einem Platindraht auf dem Probenteller befestigt. Nach dem Schließen der Bombe wird sie mit Sauerstoff bei einem Druck von 30 bar gefüllt. Anschließend wird die Bombe in das Kalorimeter eingesetzt und der Schreiber eingeschaltet. Die Bombe wird daraufhin mit einer Ladung von 36 Volt gezündet. Sobald der Schreiber die Kurve aufgezeichnet hat, kann die Bombe entnommen und gereinigt werden.

2.2.2. Versuch 2: Quantitative Bestimmung des Proteingehaltes von Fett – und Muskelgewebe vom Rind

Es werden zuerst jeweils zwei Muskel – und Fettproben von ca. 0,5 g abgewogen. Anschließend wird das Gewebe zerkleinert und mit 10 ml einer 2 molaren KOH-Lösung versetzt. Danach werden die Proben eine Stunde ins Wasserbad bei 90 °C gestellt und 15 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird nun wie in Tabelle 1 in Reagenzgläser pipettiert:

Tabelle 1: Pipettierschema der Proteinbestimmung

	Analysen	Standard	Blindprobe
Probe	0,1 ml	—	—
Protein-Standard	—	0,1 ml	—
Wasser	—	—	0,1 ml
Biuret-Reagenz	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml

Anschließend werden die Proben gut gemischt und 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Dabei reagieren die Proteine mit den Kupferionen aus der Biuret-Reagenz zu einem violetten Farbkomplex. Dieser kann nun mit Hilfe des Spektralphotometers als Extinktion der Proben (E_A) und des Standards (E_{ST}) bei 546 nm gemessen werden.

2.2.3. Versuch 3: Quantitative Bestimmung des Lipidgehaltes von Fett – und Muskelgewebe vom Rind

Anfangs werden je zwei Muskelproben (0,5g) und Fettproben (0,25g) abgewogen, mit 20 ml Isopropanol versetzt und kurz homogenisiert. Die Proben werden zentrifugiert, der Überstand wird wie in Tabelle 2 in Reagenzgläser pipettiert:

Tabelle 2: Pipettierschema der Lipidbestimmung

	Isopropanol	Fettextrakt	Standard
Probe Muskel	2,4 ml	0,1 ml	—
Probe Fett	2,475 ml	0,025 ml	—
Standard	2,4 ml	—	0,1 ml
Leerwert	2,5 ml	—	—

Triglyceride + KOH → Glycerin + Fettsäuren

Glycerin + Perjodid → Formaldehyd

Formaldehyd + NH_4^+ + Acetylaceton → Diacetyldihydrolutidin

Nachdem die Proben kurz gemischt wurden, gibt man im Abstand von 10 Minuten jeweils 0,5 ml einer 1 molaren KOH-Lösung und dann 0,5 ml einer 2 molaren Natriumperjodidlösung dazu, wodurch sich die Triglyceride in Glycerin und Fettsäuren auftrennen und sich die Lösung gelblich färbt, da das freigesetzte Glycerin mit dem Perjodid reagiert. Dieser Farbumschlag kann mit Hilfe des Photometers bei 410 nm bestimmt werden.

3. Ergebnisse:

3.1. Versuch 1: Kalorimetrie

Als Eichsubstanz wird die Benzoesäure mit dem bekannten Energiegehalt von 6320 cal/g benutzt.

Anhand dieser wird der Wert für m folgendermaßen berechnet:

$$m = \frac{6,32 \text{ cal / mg} * \Delta A * \frac{\text{Empfindlichkeit}}{\text{Papierbreite}}}{6320 \text{ cal / g} * g_{\text{Tablette}}} = \frac{\text{mV}}{\text{mg}}$$

ΔA ist ein graphisch ermittelter Ausschlag. Dieser wird für die erste Tablette Benzoesäure mit 17,7 cm aus dem Ausdruck ermittelt. Das Gewicht der Tablette beträgt 0,033 g.

Für das ΔA der zweiten Tablette Benzoesäure wird 20,7 cm eingesetzt und für das Gewicht der Tablette 0,049 g.

Nun ermittelt man den Durchschnitt von m (0,385 mV/mg) und setzt ihn in die folgende Gleichung ein:

$$E \text{ (kcal/g)} = \frac{\frac{1}{m} * 6320 \text{ cal / g} * \Delta A * \frac{\text{Empfindlichkeit}}{\text{Papierbreite}}}{g_{\text{Tablette}}} = \frac{\text{cal}}{\text{g}} \text{ (Brennwert)}$$

Empfindlichkeit bzw. Spannungsdifferenz beträgt 20 mV

Die Papierbreite wird mit 25 cm berechnet

Zur Berechnung des Brennwertes E (J/g) wird mit 4,186 multipliziert.

In Tabelle 3 sind nun alle Ergebnisse aufgelistet.

Tabelle 3: Berechnung des Kaloriengehalts

	Masse (g)	Δ A (cm)	m (mV/mg) Ø					Literatur (aus: Skript)
Benzoessäure	0,033	17,7	0,43					
	0,049	20,7	0,34	0,385				0,32 mV/mg
					E (kcal/g) Ø		E(kJ/g)	
Cellulose	0,032	8,1			3,3			
	0,033	10,1			4	3,65	15,28	17,2 kJ/g
Albumin	0,0254	10,6			5,5			
	0,033	12,5			4,9	5,2	21,77	23,4 kJ/g
Muskelgewebe	0,031	8,7			3,8			
	0,035	10,5			4	3,9	16,3	

3.2. Versuch 2: Bestimmung des Proteingehaltes

Durch die Messung des Gewichts der Proben und durch photometrische Bestimmungen der Lösung ergeben sich die in Tabelle 4 dargestellten Messergebnisse:

Tabelle 4: Messergebnisse für Versuch2

		Gewicht [g]	Extinktion A	Extinktion B	Ø Extinktionen
1	Muskelprobe	0,515	0,321	0,394	0,3575
2	Muskelprobe	0,5042	0,374	0,39	0,3685
3	Fettprobe	0,4904	0,054	0,028	0,041
4	Fettprobe	0,5072	0,094	0,044	0,069
	Protein-Standard		0,939		

Daraus lassen sich die Werte für den Proteingehalt der verschiedenen Gewebe und den Brennwert bestimmen.

Der Proteingehalt wird mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\frac{E_A * c_{ST} * 10}{E_{ST} * g_{TGW}} = \frac{mg}{g} TGW$$

E_A: Ø Extinktion der Proben

c_{ST}: Konzentration der Standardlösung, hier: 80 mg/ml

E_{ST}: Extinktion der Standardlösung

g_{TGW}: Gewicht der Probe

TGW: Trockengewicht

Um den physikalischen Brennwert zu errechnen muss man den Wert für den Proteingehalt mit dem Faktor 5,5 multiplizieren.

Beispielrechnung für Muskelprobe 1:

$$\frac{0,3575 * 80 \text{ mg / ml} * 10}{0,939 * 0,515 \text{ g}} = 591,42 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ TGW (Proteingehalt)}$$

Daraus ergibt sich für den Brennwert:

$$\text{Brennwert} = 591,42 \frac{\text{mg}}{\text{g}} * \frac{5,5}{1000} = 3,25 \text{ kcal/g}$$

Tabelle 5: Bestimmung des Proteingehaltes und der Brennwerte

		Proteingehalt [mg/g]	Brennwert [kcal/g]
1	Muskelprobe	591,42	3,25
2	Muskelprobe	622,67	3,4
3	Fettprobe	71,23	0,4
4	Fettprobe	115,9	0,64

3.3. Versuch 3: Bestimmung des Lipidgehaltes

Die Messergebnisse von Gewichtsbestimmung und Photometrie sind in Tabelle 6 dargestellt:

Tabelle 6: Messergebnisse für Versuch 3

		Gewicht [g]	Extinktion A	Extinktion B	Ø Extinktionen
5	Muskelprobe	0,5095	0,29	0,443	0,367
6	Muskelprobe	0,5108	0,095	0,177	0,136
7	Fettprobe	0,2583	0,245	0,233	0,239
8	Fettprobe	0,2644	0,324	0,289	0,3065
	Standard		0,418		

Mit Hilfe dieser Werte kann man den Lipidgehalt und den Brennwert der Gewebe bestimmen.

Für den Lipidgehalt gilt die Formel:

$$\frac{E_A * c_{ST} * 20}{E_{ST} * g_{TGW}} = \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ TGW}$$

Bei der Fettgewebeprobe muss die Formel etwas abgewandelt werden:

$$\frac{E_A * c_{ST} * 20 * 4}{E_{ST} * g_{TGW}} = \frac{mg}{g} \text{ TGW}$$

E_A : Ø Extinktion der Probe

c_{ST} : Konzentration der Standardlösung, hier: 2,5 mg/ml

E_{ST} : Extinktion der Standardlösung

g_{TGW} : Gewicht der Probe

Der Brennwert ergibt sich dann, indem der Lipidgehalt mit dem Faktor 9 multipliziert wird.

Beispielrechnung für Fettprobe 7:

$$\frac{0,239 * 2,5 \text{ mg / ml} * 20 * 4}{0,418 * 0,2583} = 442,72 \frac{mg}{g} \text{ TGW}$$

Für den Brennwert ergibt sich:

$$\text{Brennwert} = 442,72 \frac{mg}{g} * \frac{9}{1000} = 3,98 \text{ kcal/g}$$

Alle Werte ausgerechnet ergeben dann die Tabelle 7:

Tabelle 7: Bestimmung des Lipidgehaltes und der Brennwerte

		Lipidgehalt [mg/g]	Brennwert [kcal/g]
5	Muskelprobe	86,16	0,8
6	Muskelprobe	31,9	0,3
7	Fettprobe	442,72	3,98
8	Fettprobe	554,65	4,99

4. Diskussion

Auswertung der Ergebnisse

Bei Versuch 1 (Bestimmung des Energiegehaltes mit Hilfe der Bombenkalorimetrie) liegen alle Werte der Doppelbestimmungen erwartungsgemäß dicht beieinander. Dagegen kann man zwischen den einzelnen Stoffgruppen eine gewisse Staffelung erkennen, nämlich dass Cellulose von den drei zu testenden Substanzen den niedrigsten Brennwert aufweist (15,28kJ/g), gefolgt vom Muskelfleisch (16,3 kJ/g). Den höchsten Brennwert findet man beim Protein Albumin (21,77 kJ/g). Leider liegen die Ergebnisse etwas unterhalb der Literaturwerte. Eine sehr wahrscheinliche Fehlerquelle ist bei unserer Versuchsdurchführung eine zu warme Bombe. Ebenso können Fehler beim Auswerten der graphischen Ausdrücke passieren oder es war vielleicht ein zu geringer Sauerstoffanteil in der Bombe.

Bei den Photometrieversuchen entsprechen die Ergebnisse auch unseren Erwartungen. Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, ist der Lipidanteil in den Fettproben deutlich höher als in den Muskelproben, wodurch sich auch ein viel höherer Brennwert einstellt. Dies kommt dadurch zustande, dass Muskelgewebe im Normalfall einen sehr viel niedrigeren Anteil an Lipiden enthält als Fettgewebe. Dagegen war im Muskelfleisch der Proteingehalt höher als im Fettgewebe, was auch nicht weiter überraschend ist, da Fettgewebe weniger Proteine enthält als Muskeln. Muskelgewebe besteht nämlich hauptsächlich aus den Proteinfilamenten Actin und Myosin.

Konkrete Literaturwerte für den Protein- bzw. Lipidgehalt von Muskel- und Fettgewebe sind leider nicht möglich, da die Werte von Tier zu Tier variieren.

Vergleich Kalorimetrie - Photometrie

Die Bombenkalorimetrie ist besser für die Bestimmung des tatsächlichen Energiegehalts von Stoffgemischen und Reinstoffen geeignet, da sie den eigentlichen physikalischen Brennwert bestimmt. Dabei kann man nicht direkt auf den physiologischen Brennwert schließen, wie schon im theoretischen Teil erläutert wurde.

Dagegen benutzt man die Photometrie hauptsächlich zur Analyse von Stoffzusammensetzungen, denn man kann die einzelnen Konzentrationen der enthaltenen Komponenten direkt bestimmen. Bei dieser Methode wird der Brennwert aus den Konzentrationen errechnet.

Vor – und Nachteile von Kalorimetrie und Photometrie

Ein entscheidender Nachteil der Kalorimetrie besteht darin, dass sie sehr aufwendig ist und eine hohe Fehlerwahrscheinlichkeit besitzt. Umweltfaktoren, wie ein Wärmeaustausch mit der Umgebung, können nicht unterbunden werden und so das Ergebnis beeinflussen.

Dafür besteht der Vorteil dieser Methode darin, dass man auch Brennwerte von Substanzgemischen bestimmen kann. Bei Reinsubstanzen ist ein Vorteil gegenüber der Photometrie, dass genauere Werte geliefert werden.

Bei der Photometrie erhält man eine quantitative Analyse über den Anteil der einzelnen Komponenten in einem Gewebe, so dass man Informationen über dessen Zusammensetzung erhält.

Jedoch bekommt man keine Aussage über den Gesamtenergiegehalt. Den Brennwert erhält man erst dann, wenn man die Einzelkonzentrationen mit einem für jedes Gewebe unterschiedlichen Faktor multipliziert. Ein zusätzlicher Nachteil der Photometrie ist eventuell die Verwendung von Farbreagenzien, die nicht immer optimal an die zu untersuchenden Substanzen binden und somit das Ergebnis verfälschen.

5. Quellenangaben

1. Versuchsskript „Kurs Energiegehalt“, Anfängerpraktikum Tierphysiologie, WS 2004/5
2. Zoologie Wehner Gering, Thieme Verlag, 23.Auflage, 1995
3. Biologie, Campbell, Spektrum Akademischer Verlag, 3.Auflage, 2003
4. Tierphysiologie, Eckert, Thieme Verlag, 4.Auflage, 2002
5. Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Karlson, Thieme Verlag, 14.Auflage, 1994
6. Taschenatlas der Biochemie, Koolman, 3.Auflage, 1994

6. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Aufbau einer Aminosäure, Biologie, Campbell, Spektrum Akademischer Verlag, 3.Auflage, 2003, S.86
- Abbildung 2: Die Sekundärstruktur eines Proteins, Biologie, Campbell, Spektrum Akademischer Verlag, 3.Auflage, 2003, S.91
- Abbildung 3: Die vier Ebenen der Proteinstruktur, Biologie, Campbell, Spektrum Akademischer Verlag, 3.Auflage, 2003, S.93
- Abbildung 4a und 4b: Lineare Form und Ringform, Biologie, Campbell, Spektrum Akademischer Verlag, 3.Auflage, 2003, S.78
- Abbildung 5: Aufbau eines Fettmoleküls, Biologie, Campbell, Spektrum Akademischer Verlag, 2.Auflage, 2003, S.83
- Abbildung 6: Die Zellatmung im Überblick, Biologie, Campbell, Spektrum Akademischer Verlag, 3.Auflage, 2003, S.190