

Cíle

Založení kvasné kultury a sledování změn obsahu látek v průběhu kvasného procesu.

Podrobnější rozbor cílů

- Praktické seznámení se s procesem fermentace (kvašení vs. aerobní mikrobiální procesy).
- Odvození podmínek pro průběh kvasného procesu.
- Sledování změn koncentrace látek v průběhu kvašení.
- Zařazení fermentace v rámci metabolických drah.

Zadání úlohy

Založte experiment s kvasnou kulturou pekařského droždí a sledujte změny v obsahu látek v průběhu kvašení.

Technická úskalí, tipy a triky

Pokud chcete, aby experiment probíhal dostatečně rychle, použijte alespoň celou kostku droždí (tj. 42 g, např. čerstvé droždí FALA) a 0,5l roztoku sacharózy. Při těchto podmínkách postačí sledovat změny v koncentraci látek pouze 5–10 minut.

Pomůcky

PASCO senzory: plyný oxid uhličitý (PS-2110), plyný kyslík (PS-2126A), ethanol (PS-2194), teploměr (PS-2135), PASCO SPARK datalogger a počítač se SW PASCO Capstone, popř. datalogger Xplorer GLX, PASCO USB link (PS-2100A), kádinka 1000 ml, magnetická míchačka a velké magnetické míchadlo, stojan a držáky na dvě čidla, latexová rukavice, chemikálie (dest. voda, roztok 0,5M sacharózy, 1% roztok ethanolu), biologický materiál – pekařské droždí (např. FALA, 1 kostka tj. 42 g), popisovač (lihový fix), pracovní návod, pracovní list

Zařazení do výuky

Experiment je koncipován jako demonstrační. Je ho vhodné zařadit v rámci učiva o přeměně látek v živých organizmech, popř. konkrétněji v rámci metabolismu sacharidů. Stejně tak je možné experiment použít v rámci učiva o enzymech a vitamínech. Úloha najde své uplatnění také v oblasti analytické chemie (použití čidel pro sledování koncentrace plynů).
ZŠ: demonstrace; SŠ: demonstrace, lab. cvičení

Časová náročnost

Část hodiny (do 20 min).

Návaznost experimentů

Tomuto experimentu je vhodné předřadit úlohu č. 16 (Kdy je enzymu zima a kdy teplo).

Mezipředmětové vztahy

biologie (mikroorganizmy – bakterie, kvasinky; metabolismus, kvašení)

Teoretický úvod

Termínem **fermentace** označujeme jak klasické anaerobní kvašení, tak ostatní aerobní mikrobiální procesy. Jde o běžné procesy, při kterých dochází k přeměně látek, nejčastěji činností mikroorganismů. Typicky se jedná o metabolické (katabolické) reakce, při nichž vznikají ze složitějších látek jednodušší. Studium kvašení stálo u zrodu **biochemie** a následně biochemického oboru – **enzymologie**. Biochemie je tak jako vědní obor nedílně svázána se jménem **Eduarda Buchnera**, který získal za svůj objev „nebuněčného kvašení“ v roce 1907 Nobelovu cenu.

Výroba určitých látek s **využitím fermentace** je historicky velice starou záležitostí. Např. nálezy kvasných nádob na víno pochází již z neolitu (dnešní Irán, Hajji Firuz Tepe, 8500–4000 let př. n. l.). Kvasné procesy jsou velice intenzivně využívány v potravinářství i dnes (při výrobě lihovin, piva, vína, kyselého zelí, octa, kynutého těsta, ...).

Kvasinky jsou eukaryotické organizmy, které se při kultivaci rozmnožují nepohlavním (vegetativním) způsobem. Drožděnské kvasinky mají typický tvar vejčitý až kulovitý, podobně jako kvasinky pivovarské či lihovarské. Kvasinky se používají v celé řadě dalších odvětví od přípravy krmiv, hnojiv, ke kompostování, výrobě bioplynu až třeba po výrobu léčiv (např. inzulin produkováný kvasinkami).

V našem experimentu si založíme kvasnou kulturu a budeme sledovat změny obsahu látek v průběhu kvasného procesu s využitím běžných pekařských kvasnic, které obsahují kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae* (viz obr. 1).

Zdrojem energie pro naši kulturu bude sacharóza. Z této organické, energeticky bohaté, látky získávají naše kvasinky energii. Sacharóza se tím pádem musí přeměnit na nějaké jednodušší látky. Konkrétně se jedná o ethanol a oxid uhličitý. Souhrnně můžeme tedy probíhající reakci zapsat:

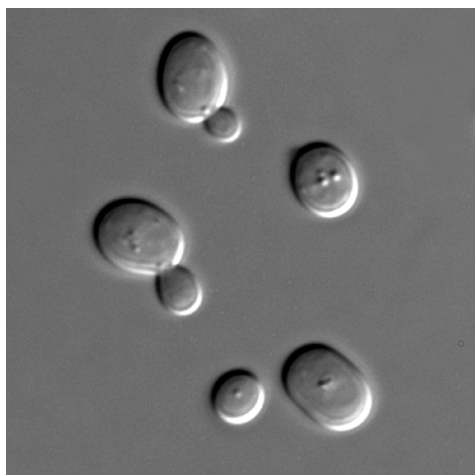


Podrobněji se na **metabolické procesy** podíváme na následujícím schématu (viz obr. 2). Prvním krokem je štěpení sacharózy na dva monosacharidy. Glukóza se následně odbourává procesem glykolýzy. V průběhu glykolýzy získáme určité množství energie ve formě ATP a pyruvát (kys. pyrohroznovou). V případě **anaerobní** cesty se v prvním kroku pyruvát dekarboxyluje na acetaldehyd, což obstará enzym pyruvátdekarboxyláza. Druhým krokem je pak redukce acetaldehydu na ethanol, která se neobejde bez enzymu alkoholdehydrogenázy a redoxního koenzymu NADH.

Kvasinky mají ale ještě druhou možnost, protože jsou takzvané „**fakultativně anaerobní**“. To znamená, že v podmínkách s dostatkem kyslíku mohou získávat energii podstatně efektivněji (metabolismus probíhá **aerobně**). V tomto případě se pyruvát mění na **acetyl koenzym A**, který vstupuje do **Krebsova cyklu** (cyklu kyseliny citrónové, CKC). Zde vzniká opět určitý ekvivalent energie ATP a díky dekarboxylačním procesům také odpadní CO_2 . Hlavním produktem, z pohledu získání energie, jsou ale molekuly NADH, které dále vstupují do **dýchacího řetězce**. Právě zde vstupuje do reakce kyslík a vzniká ATP a voda.

Motivace

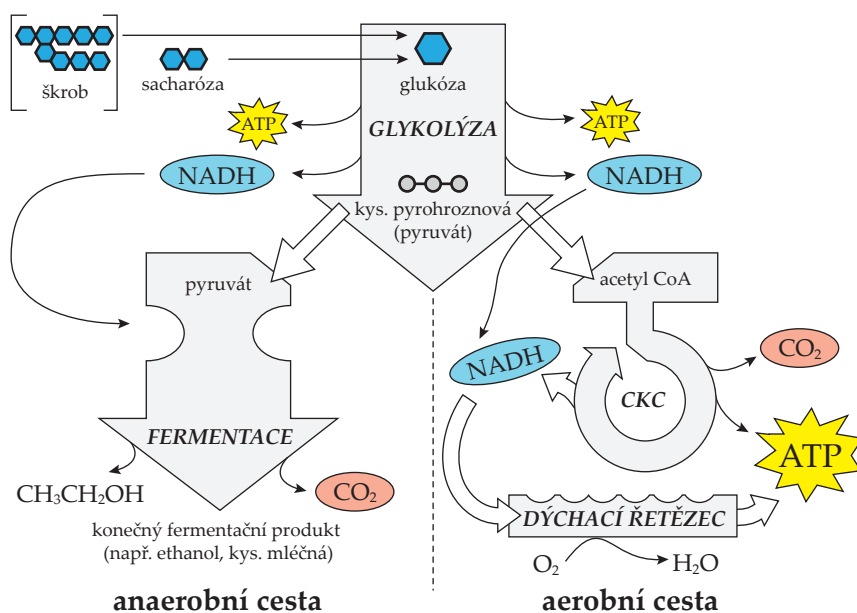
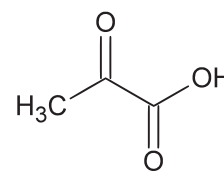
Hodinu můžeme začít tak, že ukážeme: krajíc chleba či housku, láhev piva, láhev vína, láhev octa a láhev destilátu. Zeptáme se, co mají tyto věci společné. Žáci jistě najdou společných věcí celou řadu. My je budeme směř-



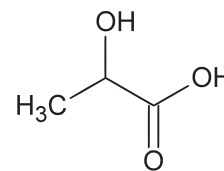
Obr. 1: Kvasinky rodu *Saccharomyces* (zdroj en.wikipedia.org)

Proč se mění koncentrace kyslíku?

Vzhledem k tomu, že je v našem systému poměrně hodně kyslíku, projeví se i aerobní metabolismus kvasinek. Právě tím můžeme zdůvodnit pokles množství kyslíku v průběhu našeho experimentu – kvasinky ho spotřebovávají.

**Důležité molekuly**

kys. pyrohroznová (pyruvát)



kys. mléčná (laktát)

Obr. 2: Zjednodušené schéma metabolismu sacharidů, aerobní a anaerobní cesta

řovat k problematice využití nějakých organismů při výrobě donesených „pomůcek“. Nakonec dojdeme k faktu, že při výrobě všech donesených věcí se používá nějaký mikroorganismus – kvasinka nebo bakterie. Pokračovat můžeme otázkou jak takový mikroorganismus „pracuje“ a jaký z produktů jeho „práce“ se v konkrétních výrobcích používá. Celou motivační část ukončíme konstatováním, že se zaměříme na studium pekařského droždí.

Bezpečnost práce

Pracujte pečlivě a v souladu s pracovním návodem. Dbejte zvýšené opatrnosti a s chemikáliemi zacházejte vždy v souladu s instrukcemi na obalu. Nikdy nepipetujte ústy. V laboratoři používejte ochranné brýle, plášť a případně další pomůcky v souladu se správnou laboratorní praxí.

Příprava úlohy

Před vlastní demonstrací je třeba připravit alespoň 500 ml 0,5 M roztoku sacharózy.

Dále je třeba připravit fermentační „komoru“. Je možné použít přímo příslušenství dodávané firmou PASCO – metabolickou komoru. Problém ale nastane při požadavku velkého objemu a připojení tří a více čidel. Tuto konfiguraci zvládá až poměrně nákladný systém PASCO EcoZone. My si pomůžeme velkou 1 l kádinkou a latexovou rukavicí. Tři prsty rukavice na koncích odstříhnete a do vzniklých otvorů nasuňte jednotlivá čidla. Vše musí dobře těsnit. Čidla pak upevníte na stojan a vše posuňte do takové výšky, aby bylo možné rukavicí „přetáhnout“ přes okraj kádinky a tím kádinku neprodyšně uzavřít (viz obr. 3 na následující straně).

Postup práce

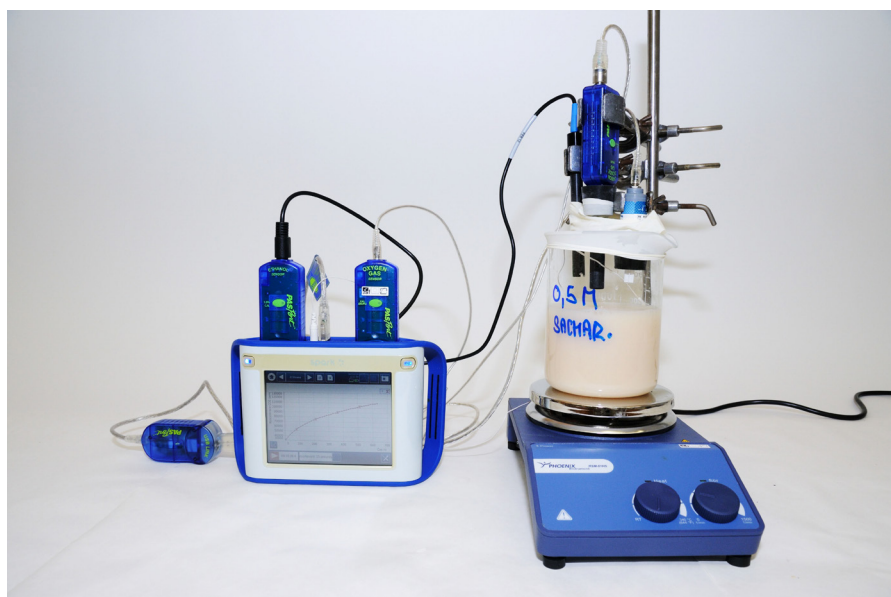
Úlohu můžeme rozdělit do dvou hlavních částí:

- 1) Příprava roztoků a fermentační komory (viz „Příprava úlohy“)
- 2) Sledování průběhu fermentace

Kalibrace senzorů

Vhodné je zkalibrovat ethanolové čidlo. Toto čidlo je sice kalibrováno výrobcem, ale v našem případě ukazovalo značně vyšší hodnoty. Kalibraci provedeme tak, že do nádoby nalijeme vrstvu 1% vodného roztoku ethanolu a nad ní umístíme ethanolové čidlo. Čidlo se nesmí ponořit do roztoku! Měří se pouze koncentrace ethanolu v parách. Hrdlo kolem čidla je nutné důkladně utěsnit. Spustíme záznam dat a po ustálení rovnováhy (cca po 3 min) dlouze podržíme zelené tlačítko. Tím je kalibrace provedena.

Obdobným způsobem je vhodné zkalibrovat čidlo kyslíku a čidlo oxidu uhličitého. Zde se kalibruje na „prostředí“ kolem nás, tedy koncentraci sledovaných plynů v atmosféře. Použijeme k tomu opět zelená tlačítka na těle připojovacího modulu čidel.



Obr. 3: Sestavená aparatura (varianta s dataloggerem SPARK)

Počet připojených čidel

Pokud budete pracovat s dataloggerem PASCO Xplorer GLX, je možné připojit i čtvrté čidlo. Výborným kandidátem je pH elektroda.

Nastavení HW a SW

- 1) Ke svému počítači propojte pomocí USB kabelu datalogger PASCO SPARK.
- 2) Datalogger obsahuje ještě druhý USB port. Na ten připojte ještě PASCO USB link. (To není nutné, pokud použijete PASCO Xplorer GLX, který má, na rozdíl od SPARKu, čtyři nezávislé vstupy.)
- 3) Do vstupů připojte ethanolové čidlo, čidlo kyslíku a čidlo oxidu uhličitého.
- 4) Teplotní čidlo připojte přímo do malého vstupu na dataloggeru.
- 5) Tím máme připojená všechna čtyři čidla, která budeme používat.

Příprava měření

- 1) Na počítači spusťte aplikaci PASCO *Capstone*.
- 2) Otevřete soubor **ch18-fermentace_sablona.cap**. (Soubor je dostupný na portálu www.expoz.cz.)
- 3) Ve spodní části okna SW *Capstone* nastavte parametr vzorkovací frekvence *Common Rate* na 5 s.
- 4) Do kádinky nalijte 500 ml roztoku sacharózy, vhodte míchadlo a kádinku postavte na magnetickou míchačku.
- 5) Do kádinky rozdrobte balíček pekařského droždí a spusťte magnetickou míchačku. Zpočátku mohou být otáčky vyšší, jakmile vznikne suspenze kvasinek, otáčky snižte.
- 6) Ke kádince přisuňte stojan s čidly umístěnými v latexové rukavici a posuňte je do správné výšky. **Pozor!** Až na teplotní čidlo musí být všechna čidla alespoň 5 cm nad hladinou. Teplotní čidlo by naopak mělo být ponořeno.
- 7) Zkontrolujte těsné umístění čidel a přetáhněte okraj latexové rukavice přes horní okraj kádinky.

Pozor na těsnost

Latexová rukavice musí těsnit kolem jednotlivých čidel i kolem hrdla kádinky. Před demonstrací ve třídě je vhodné experiment předem vyzkoušet.

Vlastní měření a záznam dat

- 1) V levém dolním rohu SW *Capstone* klikněte na tlačítko *Record*.
- 2) Sledujte změny na záznamu v grafech (horní obsah kyslíku a oxidu uhličitého, dolní obsah ethanolu a teplota).

- 3) Pokud nevyhovuje nastavení měřítka os y , můžete použít ikonku automatického nastavení měřítka v levém horním rohu grafu.
 - a) V případě, že výše uvedený postup nevyhovuje, použijte k manuální úpravě os myš. Najedte na osu, chytněte ji a táhnutím posuňte (nahoru nebo dolů) na požadovanou pozici hodnot y . Měřítka upravíte obdobně chycením a táhnutím za číselné hodnoty na ose.
- 4) Po deseti minutách ukončete záznam dat stiskem tlačítka *Stop* v levé dolní části.

Analýza naměřených dat

Analýza dat spočívá v prozkoumání změn a jejich trendů v rámci hodnot zaznamenaných jednotlivými čidly. Do vzájemného vztahu je třeba dát především změny v koncentraci oxidu uhličitého a ethanolu. Zajímavý je také pohled na koncentraci kyslíku anebo průběh změn teploty.

Hodnocení práce žáků

- Nastudovali si žáci teorii předem?
- Sestavili a použili žáci měřicí aparaturu správně?
- Postupovali žáci korektně podle pracovního návodu?
- Porozuměli žáci uvedené problematice?
- Vypracovali žáci správně své pracovní listy?
- Získali žáci předpokládané výsledky?
- Interpretovali žáci výsledky správně?
- Shrnuli žáci nové poznatky v závěru?

Informační zdroje

- <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kva%C5%A1en%C3%AD>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Fermentation_%28biochemistry%29
- <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kvasinky>
- http://cs.wikipedia.org/wiki/Alkoholov%C3%A9_kva%C5%A1en%C3%AD
- VOET, Donald a Judith G VOET. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2011, xxv, 1428, 53 p. ISBN 04-709-1745-8.
- KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Color atlas of biochemistry*. 2nd ed., rev. and enl. New York: Thieme, c2005, x, 467 p. Thieme flexibook. ISBN 15-889-0247-1.

Hodnocení výsledků

K hodnocení výsledků je vhodné zobrazit schéma metabolismu a najít místa, kde vznikají námi sledované látky. To můžeme porovnat s velikostí nárůstu či poklesu koncentrací sledovaných látek a pokusit se rozdíly vysvětlit.

Syntéza a závěr

Na závěr je vhodné žákům shrnout:

- U kterých organismů se můžeme setkat s fermentací.
- Co je podstatou fermentace a jak probíhá.
- Proč dáváme kvasnice do roztoku sacharózy a ne třeba pouze do vody.
- Jaké metabolické dráhy jsou při našem experimentu používány.
- Jaké je praktické využití fermentace.