

8. ročník (2023/24)



**IBIS**

Interaktivní Biologický Seminář

## Experimentální bonus

Autorské řešení

**MUNI | RECETOX**

**MUNI** Ústav experimentální  
**SCI** biologie

Daniel Pluskal (e-mail: [daniel.pluskal@recetox.muni.cz](mailto:daniel.pluskal@recetox.muni.cz))

## Rychlokvašky

50 bodů

Kvašení, nabývání, kysání, kypění, bunzírování – anebo odborně – **fermentace**. Všechny tyto výrazy označují různé podoby, obměny a provedení procesu, se kterým se setkáváte dnes i denně, byť si to třeba neuvědomujete. Kvašení je tradičně důležitým způsobem uchovávání či přípravy některých potravin, které tím získávají svou charakteristickou chuť: ať už si dáte jogurt nebo čokoládu, chleba či housku, tvaroh, zakysanou smetanu, či kefir, ať už si pochutnáte na kvašené okurce, salámu, sýru s plísní nebo kyselém zelí... Užíváte si delikátní chuť fermentačních produktů všemožných bakterií, kvasinek a plísní. To stejné platí pro ocet, sójovou či rybí omáčku a další dochucovadla a neopomenutelně – všelikteré možné druhy alkoholických nápojů, v našich končinách nejprominentněji pivo a víno.

Pojem „fermentace“ zahrnuje a umožňuje i mnoho procesů, se kterými byste si ji na první pokus nespojili: fermentace se využívá při výrobě průmyslových chemikálií, například kyseliny citronové, vitaminů či léčiv, a stejně tak stojí fermentace za „bio-„ procesy a produkty, jako biologickou produkcí vodíku, bioethanolu, bioplynu či bioelektřiny, biotěžbou kovů anebo za procesem bioremediace – odstraňování škodlivin či skleníkových plynů z prostředí.

**Obecně** – pojem fermentace je velice široký a označuje soubor metabolických procesů, které způsobují látkovou přeměnu = chemické změny v organických i anorganických látkách skrze činnost enzymů.

1. Z úvodních odstavců jste již nejspíše pochopili, že **není kvašení jako kvašení**. Různé typy fermentace zahrnují zpracování různých látek na různé produkty. Pro každý z následujících výrobků

### PIVO, KYSANÉ ZELÍ, KYSELINA CITRONOVÁ, OCET a BĚŽNÝ CHLÉB

uved'te:

- i. který **mechanismus fermentace** při jejich výrobě hraje hlavní roli (alkoholová, máselná, mléčná, aj.),
- ii. který **organismus** při jejich výrobě hraje hlavní roli (bakterie/kvasinka/plíseň, příp. konkrétní druh, pokud je znám),
- iii. **úhrnnou/bilanční rovnici** daného typu kvašení, ze které bude patrné, co jsou při daném typu fermentace zpracováváné látky a co fermentační produkty, a
- iv. zda je daný typ fermentace **aerobní** či **anaerobní**. [2 b]

Pivo:

- i. alkoholová fermentace,
- ii. organismus *Saccharomyces cerevisiae*,
- iii.  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$ ,
- iv. anaerobní.

Kysané zelí:

- i. mléčná fermentace,

- ii. bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus* aj.),
- iii.  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH(OH)COOH$ ,
- iv. anaerobní.

Kyselina citronová:

- i. citronová fermentace,
- ii. veskrze plísně (technologicky významný *Aspergillus niger*),
- iii. rovnice složitější, bilance závisí na podmínkách, typu metabolismu: uznány budou všechny smysluplné odpovědi, např.  $3 C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2$  citrát +  $6 CO_2$  nebo acetyl-CoA + oxalacetátu +  $H_2O \rightarrow$  citrát + CoA,a
- iv. aerobní

Ocet:

- i. octová fermentace,
- ii. bakterie octového kvašení (*Acetobacter* aj.),
- iii.  $C_6H_{12}O_6 + 2 O_2 \rightarrow 2 CH_3COOH + 2 CO_2 + 2 H_2O$ ,
- iv. aerobní.

Běžný chléb:

- i. alkoholová fermentace,
- ii. organismus *Saccharomyces cerevisiae*,
- iii.  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$ ,
- iv. anaerobní.

V této experimentální úloze se podíváme na zoubek různým aspektům fermentace – jak to všechno probíhá, a jaký mají na průběh fermentace vliv vnější faktory. Jako modelový organismus budeme využívat kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* – aneb kuchyňské droždí či prostě kvasnice. Tato kvasinka, když ji vhodně nakrmíte, během kvasného procesu vytváří množství plynu, který můžeme jímat a měřit a pomocí něhož tak můžeme skvěle zjišťovat, co se při kvašení děje. A pro tento účel nám poslouží podomácké miniaturní bioreaktůrky, tvořené balónkem navlečeným přes hrdlo lahve.

Seznam potřebných pomůcek, chemikálií atd. včetně tipů a rad naleznete v příloze na konci tohoto dokumentu. **Pokud by pro vás příprava úlohy / nákup materiálu byly obtížné z finančního hlediska, dejte nám vědět a situaci spolu operativně vyřešíme.**

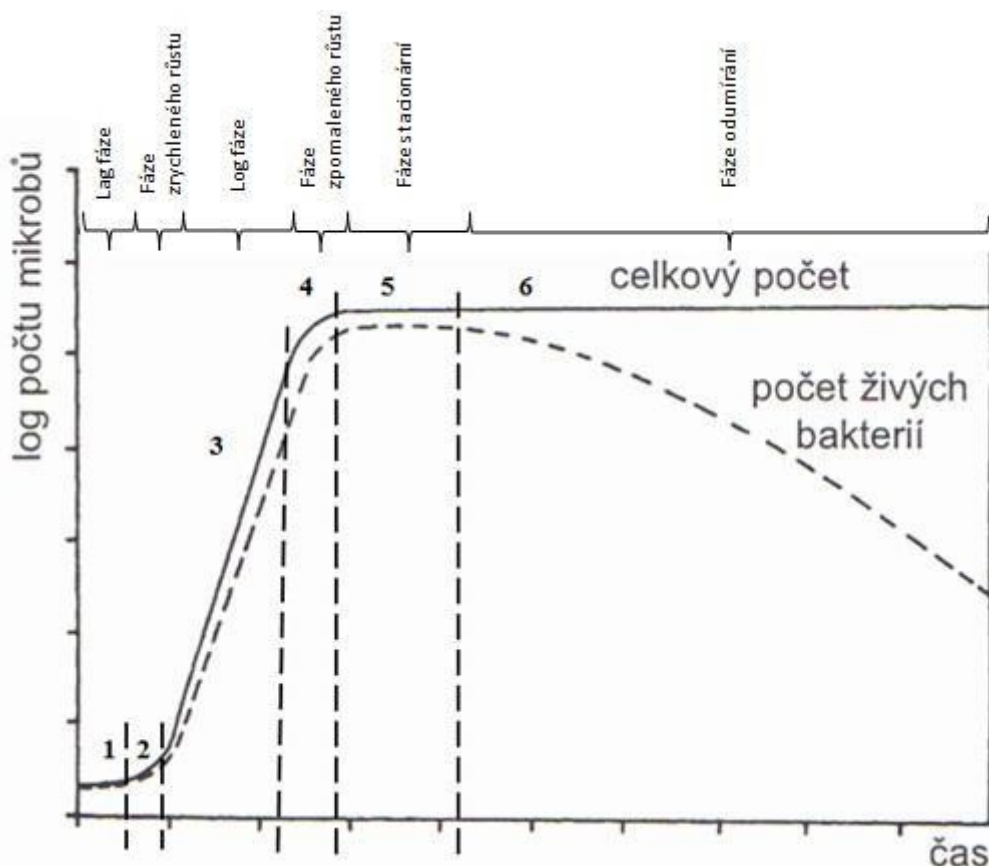
## Část první: Balónková párty (se špetkou počtů)

aneb měření a matematický popis průběhu fermentace v čase

V první části úlohy se podíváme podrobně na to, co a jak rychle se při fermentaci kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* děje. Provedeme pilotní, minimální experiment, čímž si náš systém prakticky vyzkoušíme, zjistíme, jestli nám vše funguje, a naučíme se náš experimentální postup, protože ten bude s malými obměnami napříč celou úlohou stejný – tedy pokud vám něco nebude fungovat TEĎ, později se to nespraví a je potřeba hledat, kde nastala chyba. Zároveň si při tom průběh fermentace podrobně popíšeme a získaná data si vyzkoušíme vlastnoručně proložit matematickým modelem – speciálním případem logistické funkce, takzvanou sigmoidou, s obecnou rovnicí:

$$f(A, B, t) = \frac{f(A, B, t)_{max}}{1 + e^{A - Bt}} \quad (1)$$

Sigmoida v biologii obecně popisuje růstové procesy, které se projevují nějakým pozorovaným parametrem  $f(A, B, t)$ , který se vyvíjí v čase  $t$  podle parametrů  $A$  a  $B$  (například růstová křivka na obrázku níže). Růstu chvíli trvá, než nastartuje (1, tzv. **lag fáze**), pak zrychluje (2, **fáze zrychleného růstu**) až do fáze **exponenciálního růstu** (3, také nazývaná jako **log fáze**) avšak protože je růst něčím omezen (např. maximální populací, množstvím živin apod.), postupně zpomaluje (4, **fáze zpomaleného růstu**) až dosáhne maxima –  $f(A, B, t)_{max}$  (5, tzv. **stacionární fáze**). Pak už nastává jen **fáze odumírání** (6) – tu ale často nepozorujeme, poněvadž pro nás, v mikrobiologickém světě obry, vypadá mrtvá buňka stejně jako živá.



Úpravou logistického modelu pro náš konkrétní biologický fermentační pokus získáme následující sigmoidní model:

$$V = \frac{V_{max}}{1 + e^{\ln\left(\frac{V_{max}-V_0}{V_0}\right) - k_{max}t}} \quad (2)$$

kde  $V$  je objem plynu v čase  $t$ ,  $V_{max}$  je maximální dosažitelný objem plynu při dané fermentaci,  $V_0$  je počáteční objem plynu, který je pro nás blízký nule, a  $k_{max}$  je maximální hodnota rychlostní konstanty našeho fermentačního procesu, kdyby měl možnost probíhat bez jakýchkoliv omezení – čím větší hodnota, tím rychlejší daný proces je. Význam parametru  $V_{max}$  je docela jasný, zkrátka, tohle je maximální množství plynu, které se při daném procesu vytvoří, a přes to nejede vlak. Co ale s tou záhadnou „rychlostní konstanta“ tentononc? Co z toho usoudit, jak si to představit, k čemu to přirovnat? Naštěstí pro nás můžeme  $k_{max}$  jednoduše přepočíst na něco, co chápeme lépe – tzv. ideální dobu zdvojení  $T_{id}$ :

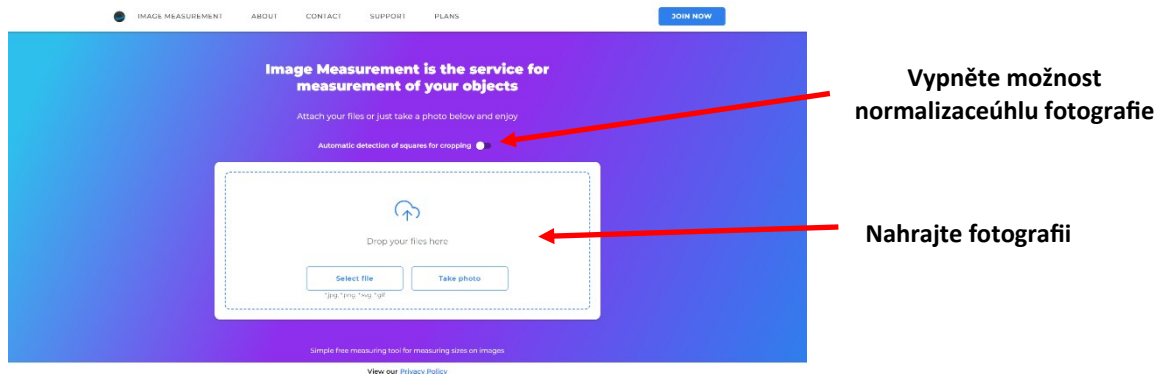
$$T_{id} = \frac{\ln(2)}{k_{max}} \quad (3)$$

Pokud si pak představíme naši fermentaci, která za ideálních podmínek probíhá nejvyšší možnou rychlostí, není ničím omezená, nijak zpomalovaná atd., hodnota  $T_{id}$  nám udává čas, který musí uplynout, aby se objem plynu v našem balónku zdvojnásobil.

Jakém balónku, říkáte si? Dost už ošklivé teorie a jdeme si zašpinit ruce a kuchyňské linky.

1. Připravte si jednu skleněnou lahev, trychtýř, balonek, pytlík (7 g) droždí, 150 ml odstáté vody, 15 g kuchyňského cukru, fotoaparát a stopky.
2. Před prvním použitím balonek párkrát ústy nafoukněte a nechte vyfouknout, aby se uvolnila tenze pryže a balonek se mohl nafukovat rovnoměrně a reprodukovatelně.
3. Pomocí trychtýře do lahve nasypete 15 g cukru a přilejte odstátou vodu o pokojové teplotě (20–25 °C). Lahví míchejte/třepejte, dokud se cukr zcela nerozpustí.
4. Pomocí trychtýře do lahve přisypte pytlík (7 g) droždí. Lahví opatrně míchejte/třepejte, dokud se veškeré sušené droždí ve vodě zcela nerozpptýlí (výsledek musí být rovnoměrně zbarvená suspenze bez hrudek či viditelných granulek droždí).
5. Na hrdlo lahve opatrně nasadte vyfouknutý balonek, aby se do balónku nedostala žádná tekutina z lahve. Lahev postavte na klidné, přístupné místo bez výkyvů teploty a **zapněte stopky**.
6. Vyfoťte lahev s balónkem tak, aby na fotce byla z boku vyfocená celá lahev, celý balonek a pokud si chcete usnadnit pozdější vyhodnocování, pak také něco, u čeho znáte přesný rozměr a budete to moci použít jako měřítko (pokud nic takového nemáte, pak jako měřítko použijete např. průměr vaší lahve). **Toto je váš datový bod pro čas 0.**
7. Stejnou fotografii lahve s balónkem poříďte v časech od začátku experimentu: 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 240 min, 300 min, 360 min, 420 min, 480 min a 600 min (experiment tedy poběží celkem 10 hodin, během kterých uděláte celkem 17 fotografií).
8. Obsah lahve zlikvidujte, lahev i balonek vymyjte a nechte vysušit.
9. Podle fotografií zjistěte průměr balónku v jednotlivých časech. Použijte např. webový nástroj [Image Measurement](#).

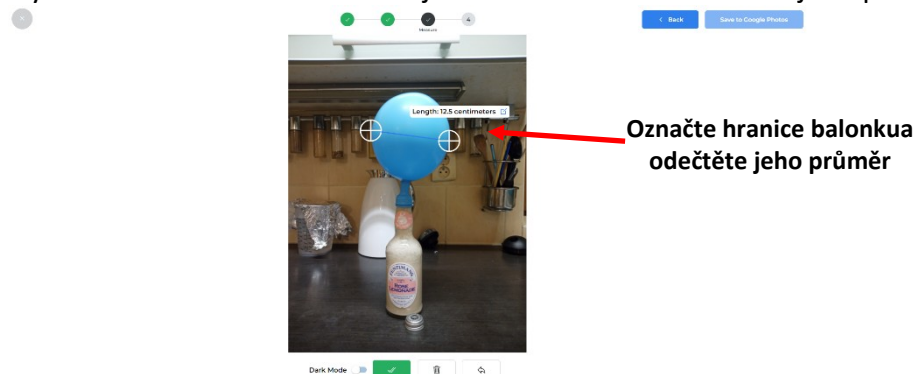
9.1. V prvním kroku vypněte možnost „Automatic detection of squares for cropping“ (normalizace tvaru/úhlu fotky, tuto nebudeme potřebovat) a nahrajte fotografii lahve s balonkem.



9.2. Ve druhém kroku nastavte měřítko. Na fotografii označte rozměr, který znáte, a tento rozměr zadejte také do pole pod fotografií. Pak klikněte na tlačítko „Next“ v pravé horní části obrazovky.



9.3. Nyní označte hranice balonku v jeho střední části a odečtěte jeho průměr.



9.4. Stejný proces proveďte pro všechny pořízené fotografie.

- Ze zjištěných průměrů balonku v různém čase vypočtete objem balonku. Předpokládejte, že balónek je dokonalá koule (pro zjednodušení, byť tomu tak není). Pokud se Vám data budou velmi výrazně odchylovat od sigmoidy, zkuste pro každý balonek změřit dva rozměry (např. průměr a výšku) a z těchto udělat průměr, aby se vyhladila případná nerovnoměrnost nárůstu balonků co do jednotlivých os.
- Stanovenou závislost objemu balonku na čase experimentu proložte sigmoidou a odečtěte její parametry. Použijte např. webový nástroj [Curve Fit](#). Pohlídejte si, aby vám

křivka prokládala data – pokud namísto sigmoidy vidíte pouze vodorovnou čáru či naopak nevidíte křivku žádnou, něco je špatně.

11.1. Do sloupce „x“ vložte **čas od začátku experimentu v hodinách**, do sloupce „y“ vložte příslušný **objem balónku v litrech**. V pravém horním poli se vám zobrazí výnos vaší závislosti, který by měl mít sigmoidní tvar s různými fázemi růstu, podobný grafu na začátku kapitoly.

11.2. V kolonce „Fit Type“ zvolte možnost „Custom Function“. Do pole rovnice zadejte následující výraz (bez „y =“):

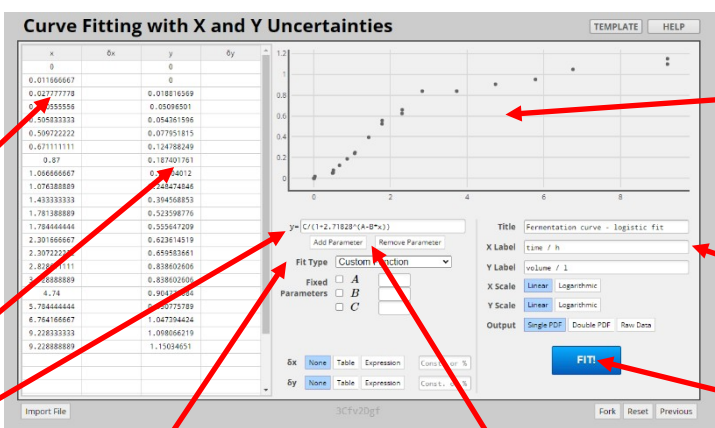
$$y = C/(1+2.71828^{(A-B*x)}) \quad (4)$$

Výraz (4) odpovídá rovnici (2) transformované tak, aby mu aplikace rozuměla.

11.3. Trojím kliknutím na tlačítko „Add Parameter“ přidejte parametry modelu (A, B, C).

11.4. Vyplňte pole „Title“, „X Label“ a „Y Label“ (název grafu a popisky os).

11.5. Klikněte na tlačítko „Fit“. Tímto se vám vygeneruje .pdf soubor s vaším proložením. V pravé horní části naleznete nalezené hodnoty parametrů A, B a C a jejich chybu stanovení, v grafu uprostřed stránky naleznete výnos vašich dat včetně jejich proložení a ve spodní části stránky je výnos reziduálů po proložení dat modelem.



**Čas od začátku experimentu v hodinách**

**Objem balónku v litrech**

**Naše sigmoida  $C/(1+2.71828^{(A-B*x)})$**

**Volba modelu pro proložení (Custom Function)**

**Přidávání/odebírání proměnných (potřebujeme tři - A, B, C)**

**Výnos vašich dat**

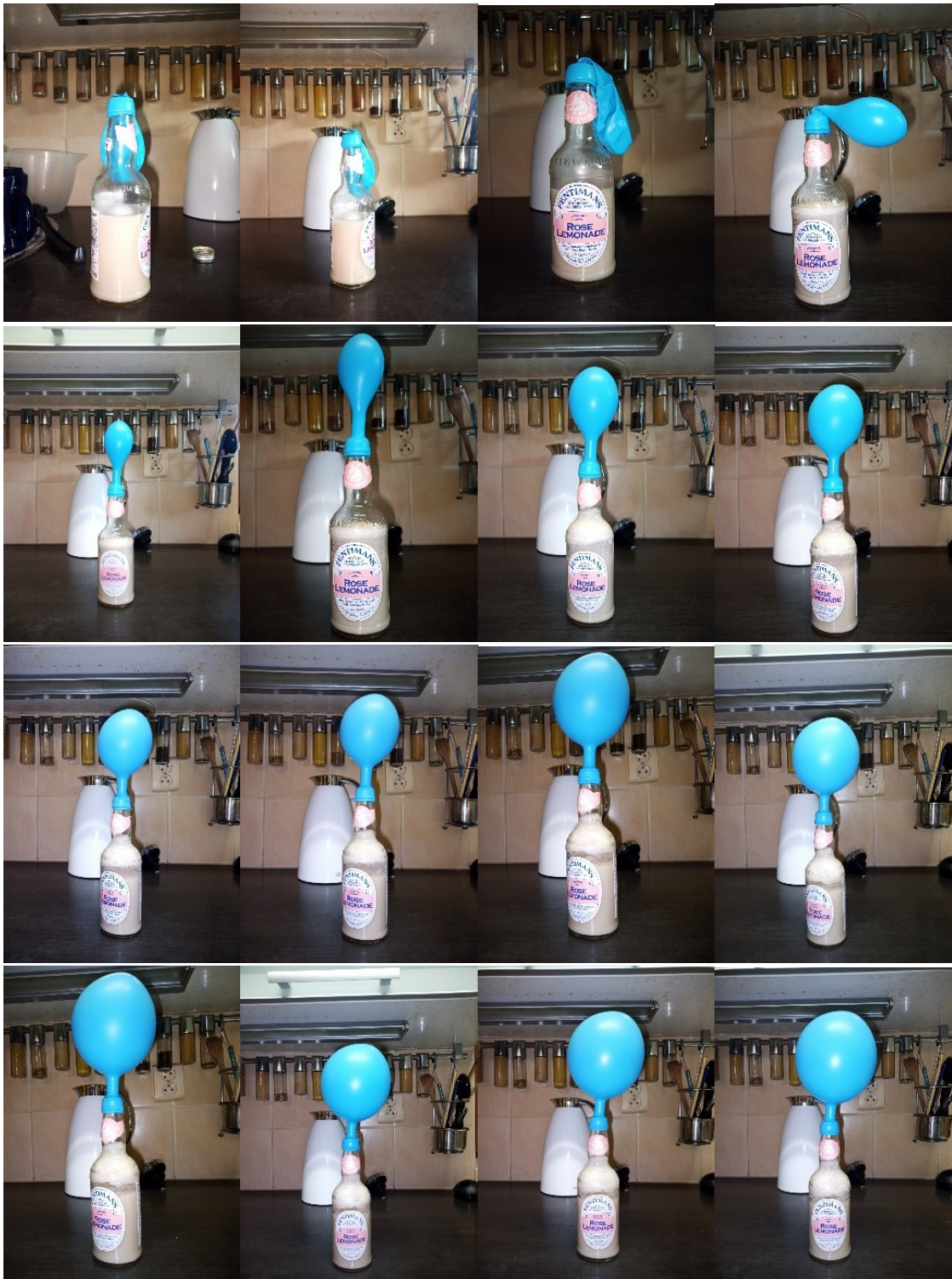
**Popisky grafu**

**Start proložení**

## 2. Přílože:

i. Vašich 17 fotografií (popište každou časem od začátku experimentu)

[5 b]





ii. Tabulku s naměřenou závislostí objemu balónku na čase od začátku experimentu [1 b]

Viz obrázek v zadání úlohy.

iii. Proložení vašich dat pomocí modelu sigmoidy (např. pdf soubor či snímek obrazovky vygenerovaný aplikací Curve Fit) – výstup musí obsahovat rovnici modelu, kterým jste data prokládali, hodnotu parametrů proložení (A, B, C) včetně jejich chyby/odchylky, a správně popsany graf obsahující výnos vašich naměřených dat včetně jejich proložení. Pokud splníte tyto požadavky, můžete využít i jakýkoliv jiný program dle své volby, pdf soubor vygenerovaný aplikací CurveFit toto vše (mimo popisky grafu, které musíte zadat správně v prvním kroku) obsahuje automaticky. [2 b]

Viz obrázek na další straně.

3. Pro proložení svých naměřených dat jste použili rovnici (4), tedy  $y = C / (1 + 2.71828^{(A-B \cdot x)})$ , která odpovídá rovnici (2) – původní rovnici sigmoidy ze začátku této kapitoly, přizpůsobené pro náš účel. Porovnejte rovnice (2) a (4) a uveďte, kterým výrazům z rovnice (2) odpovídají parametry  $y$ ,  $x$ ,  $A$ ,  $B$  a  $C$  v rovnici (4). [1 b]

$$y = V, x = t, A = (V_{\max} - V_0) / V_0, B = k_{\max}, C = V_{\max}$$

aIHxtFuy

85.163.139.40

11:43 Fri Jan 26 2024

**Custom Function**

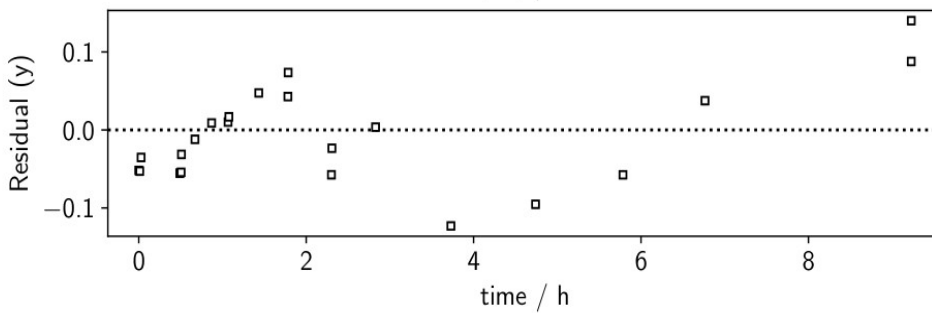
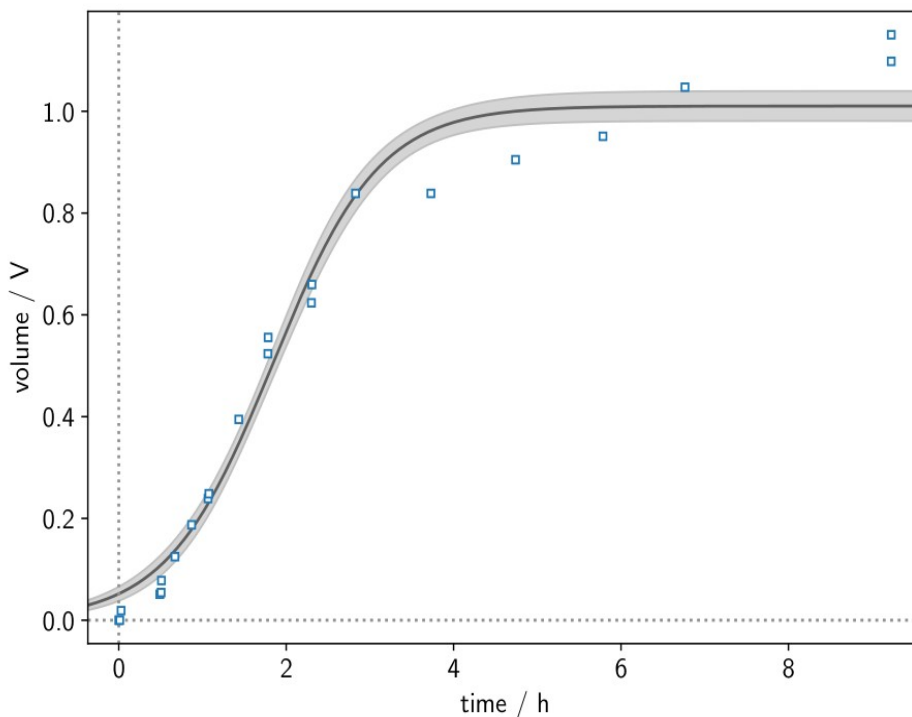
$$C / (1 + 2.71828^{(A - B * x)})$$

$\delta x$

$\delta y$

Parameter	Value	Uncertainty
A	2.916e+00	2.685e-01
B	1.583e+00	1.627e-01
C	1.010e+00	2.865e-02

SSR = 8.40e-02



NOTE: Periods assumed to be decimal points despite user locale cs.CZ

4. Jakou jednotku, resp. fyzikální rozměr má v našem modelu parametr  $k_{max}$ ? (Pokud nevíte, kde začít, pomoci Vám může tzv. rozměrová analýza rovnice (3), příp. (2) – dávejte ale přitom pozor, jaké jednotky dosazujete, viz bod 10.1 této kapitoly). [1 b]  
Jednotkou  $k_{max}$  je reciproký čas (obvykle  $s^{-1}$ , v našem případě  $h^{-1}$  – pro pomalé procesy můžeme sice použít  $min^{-1}$  či  $h^{-1}$ , tyto jednotky se ale obvykle nedoporučuje používat, protože přepočítání mezi sekundami, minutami a hodinami se neslučuje s převody SI a špatně se tak s nimi počítá).
5. Ze získané hodnoty  $k_{max}$  vypočítejte hodnotu ideální doby zdvojení  $T_{id}$ . [0.5 b]  
Hodnotu  $T_{id}$  získáme triviálním dosazením  $k_{max}$  (získané při proložení) do rovnice 3. V našem případě tedy  $T_{id} = \ln(2)/1.583 = 0.44$  h, tedy cca 26 min.
6. V úvodu kapitoly jsme si pověděli, že logistický model se používá, když potřebujeme modelovat růst, který je nějakým způsobem omezen a nemůže probíhat do nekonečna. V praxi to znamená, že při našem experimentu získáme pouze určité množství plynu a ani o kousek víc – dosahujeme nějakého limitu, něco nás omezuje. Co je tímto omezujícím faktorem při naší fermentaci? [1 b]  
V našem případě je limitujícím množstvím dostupného cukru, případně kapacita balonku (při určitém tlaku plynu uvnitř lahve balonek nasazený na hrdle lahve už netěsní a plyn uniká, čímž vzniká zdánlivé maximum objemu plynu v balonku).
7. Jaký plyn se vyvíjí při našem fermentačním experimentu? Jak je možné přítomnost tohoto plynu ve směsi plynů experimentálně dokázat? [1 b]

Vyvíjející se plyn je samozřejmě oxid uhličitý. Důkaz oxidu uhličitého se provádí tzv. vápennou vodou, roztokem hydroxidu vápenatého, který při kontaktu s oxidem uhličitým tvoří nerozpustný uhličitán vápenatý, tedy mléčný zákal roztoku.

První, nejtěžší a nejpracnější část úlohy je za námi, bravo! Vyzkoušeli jsme si, jak naše experimenty budou probíhat a vypadat, představili jsme si typický průběh fermentace a popsali ho sigmoidní růstovou křivkou. Obecně, dovednost záznamu, analýzy a prokládání dat různými modely se vám v životě bude hodit v každém případě, kdy pozorujete nějaký proces a chcete zjistit, o co v něm jde, co jej všechno ovlivňuje anebo třeba předpovídat, jak se daný proces bude chovat v budoucnu či jak se mohl chovat v minulosti. Podobné růstové modely se využívají nejen ke studiu šíření nemocí v populaci, prognostickým předpovědím typu „kolik lidí bude na světě třeba roku 2050“, jiné modely využívají nejen přírodovědci ke studiu inflace, nabídky a poptávky, pohybu vesmírných těles či jaké kdy bude počasí. Modelování je prostě všude.

## Část druhá: Ani sníh, ani déšť, ani vedro, ani tma noci...

aneb vliv počáteční teploty na růst a činnost kvasinky pekařské

Mnohé děje nejsou vytesané v kameni – můžeme si myslet, že je známe, ale pak se \*něco\* změní, a vše se najednou začne ubírat neočekávanými směry. A o biologických procesech tohle platí tisíckrát. Proto je při studiu jakéhokoliv procesu extrémně důležité to prchavé \*něco\* znát a moci s tím dále počítat a uvažovat. Občas se takové \*něco\* velmi špatně chytá, a proto je nezbytně nutné dobře a vhodně nastavit podmínky daného experimentu, aby se, pokud možno, mezi jednotlivými experimenty neměnilo nic, jenom to naše studované \*něco\*. Všimněte si, že budeme používat pět STEJNÝCH lahví, pět STEJNÝCH balónků, pětkrát STEJNÉ množství kvasinek, vody a cukru, to vše stojící společně na STEJNÉM místě a zachycované na STEJNOU fotografii. Snažíme se eliminovat vše, co by náš experiment mohlo narušit, či zastínit efekt našeho záhadného \*něco\*, abychom to mohli co nejlépe pochopit.

V této části úlohy, jak už vám mohl její název napovědět, bude naším \*něco\* teplota – přesněji počáteční teplota vody, ve které kvasinky rozmícháme. Teplota je všeobecně parametrem, který má prsty úplně ve všem – a pro biologii a chemii tohle zase platí tisíckrát.

Rychlost chemických i jiných dějů se s teplotou obecně zvyšuje, a toto se nejjednodušeji popisuje tzv. Arrheniovou rovnicí:

$$k = A e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (5)$$

Kde  $k$  je rychlostní konstanta daného procesu, přímo určující jeho rychlost,  $A$  je srážkový faktor, také závislý na teplotě,  $E_a$  je aktivační energie daného procesu (tedy určuje jak snadno nebo naopak těžce daný proces probíhá),  $R$  je univerzální plynová konstanta a  $T$  je absolutní teplota. Všimněte si, že teplota se nachází v *exponentu* výrazu – jinak řečeno, při zvyšující se teplotě stoupá rychlost procesů velmi, velmi strmě. Pro většinu chemických a biologických procesů platí tzv. **van't Hoffovo pravidlo**: zvýšení teploty systému o 10 °C se rychlost reakce zvýší 1,5× až 3×. To opravdu není málo.

Proto jídlo vaříme, namísto toho, abychom ho míchali za studena, čaj louhujeme v horké, a ne studené vodě, proto se prádlo lépe pere a nádobí lépe umývá při vyšších teplotách, a také proto je naše tělesná teplota 37 °C a ne pod nulou. Samozřejmě, vždy existují výjimky. Zmrzlinu vařit nebudete, ledový čaj jakbysmet, skvrny od mléka či čokolády budete umývat ve studené vodě a leckterá ryba, byť studenokrevná, je stejně či víc čilá než člověk. Vše záleží na okolnostech a výjimky paradoxně nejsou výjimečné. A v biologii to, a řeknu to už potřetí, platí tisíckrát.

1. Den či večer předem si připravte 150 ml vody, kterou dejte do ledničky, aby se stihla vychladit.
2. V den experimentu si připravte čtyři stejné skleněné lahve, trychtýř, čtyři balonky, čtyři pytlíky (4×7 g) droždí, 4×15 g kuchyňského cukru, odstátou vodu, teploměr, rychlovarnou konvici a fotoaparát.
3. Před prvním použitím balonky párkrát ústy nafoukněte a nechte vyfouknout, aby se uvolnila tenze pryže a balonky se mohly nafukovat rovnoměrně a reprodukovatelně.
4. Do každé z lahví nasypete 15 g cukru a jeden pytlík (7 g) kvasinek.

5. V rychlovarné konvici dejte ohřívat cca 500 ml vody.
6. Přichystejte si 150 ml vody z lednice, 150 ml vody o pokojové teplotě (20–25 °C), 150 ml vody a tělesné teplotě (cca 37 °C) a 150 ml velmi horké vody (cca 80 °C). **Na horkou vodu dávejte velký pozor či případně poproste o pomoc další osobu, popálení či opaření není legrace!**
  - 6.1. Vodu o tělesné teplotě připravte tak, že v nějaké jiné nádobě budete do vody o pokojové teplotě postupně přilívat vodu z konvice. To, že má voda 37 °C zjistíte buďto teploměrem, anebo tak, že do vody ponoříte prst – pokud na prstu nepoznáte teplotní rozdíl, voda má stejnou teplotu, jako vy. Voda prst nezahřívá ani nechladí; když necháte prst v klidu, a nemícháte jím, neměli byste poznat, že je ponořený ve vodě.
  - 6.2. Velmi horkou vodu připravte tak, že ji uvaříte v rychlovarné konvici, necháte chvíli stát (třeba 5 minut) a pak odměříte objem. Zde na přesné teplotě nezáleží, to, že je voda velmi horká, poznáte. Teplotu neměřte ani teploměrem, ani nedej bože prstem.
7. Připravte čtyři kvasné směsi o odlišné startovní teplotě. Následující kroky je potřeba provést co nejrychleji, ideálně v daném pořadí.
  - 7.1. Do první z lahví přilejte trychtýřem 150 ml vody z lednice (4–8 °C), lahvi míchejte/třepejte, dokud nezískáte rovnoměrnou směs, a na hrdlo lahve nasadíte balonek.
  - 7.2. Do druhé z lahví přilejte trychtýřem 150 ml odstáté vody o pokojové teplotě (20–25 °C), lahvi míchejte/třepejte, dokud nezískáte rovnoměrnou směs, a na hrdlo lahve nasadíte balonek.
  - 7.3. Do třetí z lahví přilejte trychtýřem 150 ml vody o tělesné teplotě (cca 37 °C). Lahvi míchejte/třepejte, dokud nezískáte rovnoměrnou směs, a na hrdlo lahve nasadíte balonek.
  - 7.4. Do čtvrté z lahví přilejte trychtýřem 150 ml velmi horké vody (cca 80 °C). Lahvi míchejte/třepejte, dokud nezískáte rovnoměrnou směs, a na hrdlo lahve nasadíte balonek. **Zde opět dávejte velký pozor, obzvláště pokud vaše lahev není skleněná!**
8. Všechny čtyři lahve s balonky postavte na klidné, přístupné místo bez výkyvů teploty. Lahve postavte vedle sebe tak, aby se o sebe balonky nemohly otírat, a všechny čtyři lahve zachyťte v jedné fotografii z boku tak, aby na fotce byly všechny lahve celé včetně celého balónku.
9. Stejnou fotografii lahví pořizujte co chvíli, abyste později mohli pozorovat rozdíly. Fotografii stačí udělat cca šest – jednu ihned při začátku experimentu, další po 10, 20, 30 a 60 minutách experimentu a poslední cca 3 hodiny po začátku experimentu. Četnost fotek i délka experimentu záleží na vašem úsudku, podle toho, jak rychle se vám balonky budou nafukovat. Měli byste pozorovat, že počáteční teplota ovlivňuje, jak rychle se jednotlivé balonky nafukují.
10. Po třech hodinách můžete experiment ukončit, obsah lahví zlikvidujte, lahve i balonky vymyjte a nechte vysušit.

8. Přiložte šest fotografií pořízených dle návodu v této části úlohy.

[5 b]



9. Porovnejte a seřadte jednotlivé podmínky vstupní teploty experimentu (teplota lednice = 4–8 °C, pokojová teplota = 20–25 °C, teplota těla = 37 °C a velmi vysoká teplota = cca 80 °C) podle toho, jak rychle se dané balónek nafukovaly. Svá pozorování vysvětlete (tento balonek se nafukoval nejrychleji protože..., tento balonek nejpomaleji protože..., tento se nenafouknul vůbec protože...). [2 b]

Nejrychleji se nafukoval balonek při 37 °C – tato teplota je pro růst a činnost kvasinek optimální. Druhý nejrychlejší byl nárůst objemu plynu v balonku při 20-25 °C – při této teplotě jsou kvasinky aktivní, ale nepracují optimálně. Třetí nejrychlejší nárůst byl při 4-8 °C – kvasinky při nízké teplotě nepracují prakticky vůbec, jakmile se roztok postupně ohřival, kvasinky začaly pracovat, ale měly zpoždění a pomalejší start než předchozí dvě podmínky. Balonek při 80 °C se nenafouknul vůbec, a dokonce se „nasál“ dovnitř do lahve, poněvadž kvasinky při kontaktu s horkou vodou zahynuly a postupným snížením teploty uvnitř lahve vevnitř vzniknul podtlak, který nasál balonek.

10. Na základě výsledků vašich experimentů usudte:

i. Při jaké teplotě byste nechali nakynout těsto, aby to šlo co nejlépe? [0.5 b]  
37 °C

ii. Při jaké teplotě byste uchovávali čerstvé (ne sušené) kvasinky, aby vám vydržely co nejdéle živé a čilé? [0.5 b]  
4-8 °C

iii. Při jaké teplotě byste ošetřili např. ovocnou šťávu, mléko, pivo či víno, aby zůstaly nečinné, nekvasily a bylo je možné dlouhodobě skladovat při pokojové teplotě? Jak se tento proces ošetření potravin nazývá? [0.5 b]  
Cca 80 °C; pasterizace.

11. Co je v biologii obecně příčinami toho, že Arrheniova rovnice tak úplně neplatí, resp. toho, že rychlost biologických procesů (např. enzymových reakcí, růstu rostlin...) se s rostoucí teplotou nejprve zvyšuje, ale s více rostoucí teplotou zase snižuje? Je toto snížení rychlosti procesů při vysokých teplotách vratný či nevratný proces? [1 b]

Příčinou je to, že proti sobě jdou dva procesy – obecné zvýšení rychlosti chemických reakcí při vyšší teplotě (toto popisuje zmíněná Arrheniova rovnice) a fakt, že biologické reakce jsou katalyzovány enzymy, které se při určité teplotě začínají „rozbíjet“, denaturovat, jako když uvaříte vajíčko; k tomu dochází až při určité teplotě, kdy vlivem teploty dochází k porušení terciární struktury enzymů a proteinů, čímž dochází k narušení jejich funkce. Proto má většina biologických reakcí či jevů, které jsou na biologických reakcích závislé, zdánlivé teplotní optimum.

## Část třetí: To kyselo je moc kyselý a kvasinka moc kvasinková...

aneb vliv pH prostředí a přítomnosti aditiv na růst a činnost kvasinky pekařské

Další \*něco\*, co se v biologii skrývá prakticky úplně všude, a nelze na něj zapomenout, je slavná *potentia hydrogenii* – česky „potenciál vodíku“, a lidským jazykem řečeno: **pH**. Tato bezrozměrná logaritmická stupnice, nabývající hodnot od 0 do 14, nám jednoduchým číslem říká, jestli roztok reaguje kyselé (pH < 7), neutrálně (pH ≈ 7), či zásaditě/alkalicky (pH > 7). pH daného roztoku je definováno vztahem:

$$pH = -\log(a_{H^+}) \approx -\log[H^+] \quad (6)$$

Kde  $a_{H^+}$  je tzv. *aktivita* (laicky řečeno „aktivní koncentrace“) vodíkových kationtů v roztoku, kterou lze za normálních, neextrémních okolností nahradit koncentrací volných vodíkových kationtů  $[H^+]$ . A proč se tedy plácát s nějakou aktivitou? Odpověď je nasnadě. Zkuste si v takovém zjednodušení vypočítat například pH koncentrované (12 M) kyseliny chlorovodíkové. Vyjde vám hodnota pH -1,07; tedy nesmyslné, záporné číslo. Jak je vidět, extrémní podmínky (např. koncentrovaná kyselina) zjednodušením nesvědčí: zjednodušený vzorec s koncentrací  $[H^+]$  lze použít pouze pro orientační výpočet pH zředěných silných kyselin a zásad, protože lze *předpokládat* (hle, opět zjednodušení!), že silné kyseliny a zásady v roztocích zcela disociují, a tedy se koncentrace vodíkových kationtů rovná koncentraci samotné kyseliny.

12. Stejně, jako je výše uvedený vzoreček zjednodušením výpočtů pH pro mírné podmínky, je zjednodušením i zdánlivé dogma, a také častá mýlka, že rozsah pH je vždy 0–14. Toto totiž platí pouze ve vodných roztocích a je dáno vlastnostmi vody jako takové (resp. hodnotou tzv. iontového součinu vody). Jaký by byl rozsah stupnice pH, pokud byste pracovali v prostředí kapalného amoniaku? (Není myšleno pH roztoku amoniaku ve vodě, ale rozsah pH stupnice, pokud by byl rozpouštědlem kapalným amoniak, který může existovat při normálním tlaku při teplotách pod  $-33\text{ }^\circ\text{C}$ . Nápovědou vám budiž výše zmíněná hodnota iontového součinu.) [1 b]

Rozsah stupnice pH v kapalném amoniaku by byl 0-32, poněvadž iontový součin amoniaku je  $10^{-32}$ .

Extrémy jsou ale v biologii v drtivé většině případů špatné – zejména proto, že je běžné živé organismy jen velmi těžko snášejí, pokud je vůbec přežijí. Proto budeme pracovat s roztoky slabých kyselin a zásad, kterých pH je ale o něco těžší předpovědět. Stále pracujeme s výše uvedeným vzorečkem (6) s koncentrací vodíkových kationtů, ale přichází mírná komplikace: slabé kyseliny a zásady ve vodě nedisociují úplně, ale pouze částečně. Tím přicházíme o možnost předpokladu  $c_{\text{kyselina}} = c_{H^+}$ : toto už prostě neplatí, a tak si musíme vypomoci jinak. Ke slovu pak přichází tzv. disociační konstanta kyseliny  $K_a$  resp. disociační konstanta zásady  $K_b$ :

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}; K_b = \frac{[B^+][OH^-]}{[BOH]} \quad (7)$$

vyjadřující sílu kyseliny.  $[H^+]$  je skutečná koncentrace vodíkových kationtů,  $[A^-]$  je skutečná koncentrace aniontu kyseliny (např. pro kyselinu octovou je toto koncentrace volného iontu  $CH_3COO^-$ ) a  $[HA]$  je skutečná koncentrace volné nedisociované kyseliny (pro kys. octovou by toto byla koncentrace její neutrální formy  $CH_3COOH$ ; pozor, toto není CELKOVÁ koncentrace kyseliny – ta se rovná  $[A^-]+[HA]$ ). Obdobně pro zásady jsou  $[B^+]$ ,  $[OH^-]$  a  $[BOH]$  skutečně koncentrace volného kationtu zásady, hydroxylového aniontu a nedisociované zásady; celková koncentrace zásady se pak rovná  $[B^+]+[BOH]$ .

**Ve zkratce:**  $K_a$  nám udává, když přidáme slabou kyselinu do vody, jaký její díl disociuje na vodíkový kationt a aniont kyseliny – protože pouze tento díl se pak v roztoku chová jako kyselina a zbytek si tam prostě jen tak plave. Stejně tak si můžeme představit i částečnou disociaci slabé báze na hydroxylový aniont a kationt zásady, zatímco zbytek zásady zůstává v roztoku neaktivní. Čím VYŠŠÍ hodnota  $K_a$  resp.  $K_b$ , tím SILNĚJŠÍ je daná kyselina resp. zásada.

Háček je, že hodnoty skutečné koncentrace  $A^-$ ,  $HA$ ,  $B^+$  či  $BOH$  se měří jen obtížně. My v praxi využíváme toho, že hodnota  $K_a$  resp.  $K_b$  je pro každou kyselinu resp. bázi **konstanta a její hodnota se nemění**. Nám tedy stačí, když už její hodnotu pro danou kyselinu či zásadu změřil někdo před námi a my si ji jen jednoduše dohledáme v tabulkách, často jako její logaritmus, tzv.  $pK_a$  či  $pK_b$ :

$$pK_a = -\log(K_a); pK_b = -\log(K_b) \quad (8)$$

Za využití zmíněných předpokladů, odvození a definic pak lze *konečně* z rovnice (6) dosazením rovnic (7) a (8) odvodit vzorečky pro **výpočet pH roztoku slabé kyseliny (9) a slabé zásady (10)** z CELKOVÉ koncentrace kyseliny ( $c_{\text{kyselina}}$ ) nebo zásady ( $c_{\text{zásada}}$ ):

$$pH = \frac{1}{2}(pK_a - \log(c_{\text{kyselina}})) \quad (9)$$

$$pH = 14 - \frac{1}{2}(pK_b - \log(c_{\text{zásada}})) \quad (10)$$

Hlavu jsme si pěkně zamotali. Pojdme nechat vzorce vzorci a raději místo toho společně potrápít naše kvasinky: ve třetí části naší experimentální úlohy se totiž podíváme, jak si s extrémny poradí ony.

1. Připravte si čtyři stejné skleněné lahve, trychtýř, čtyři balonky, čtyři pytlíky (4×7 g) droždí, 4×15 g kuchyňského cukru, odstátou vodu, 5 g kyseliny citronové, 5 g jedlé sody, 5 ml kuchyňského octa (8 %; cca 1 čajová lžička) a fotoaparát.
2. Před prvním použitím balonky párkrát ústy nafoukněte a nechte vyfouknout, aby se uvolnila tenze pryže a balonky se mohly nafukovat rovnoměrně a reprodukovatelně.
3. Připravte do lahví aditiva: do první z lahví nasypete 5 g kyseliny citronové, do druhé z lahví 5 g jedlé sody, do třetí z lahví přilijte 5 ml kuchyňského octa (8 %, cca 1 čajová lžička) a do čtvrté z lahví nepřidávejte nic.
4. Do každé z lahví přilijte 150 ml odstáté vody o pokojové teplotě (20–25 °C). Lahvemi míchejte/třepejte, dokud se obsah zcela nerozpustí.
5. Pomocí trychtýře do každé z lahví přisypte pytlík (7 g) droždí. Lahvemi opatrně míchejte/třepejte, dokud se veškeré sušené droždí v roztocích zcela nerozpptílí (výsledek musí být rovnoměrně zbarvená suspenze bez hrudek či viditelných granulek droždí).

6. Na hrdlo každé z lahví opatrně nasadte vyfouknutý balonek, aby se do balónku nedostala žádná tekutina z lahve. Lahve postavte na klidné, přístupné místo bez výkyvů teploty. Lahve postavte vedle sebe tak, aby se o sebe balonky nemohly otírat, a všechny čtyři lahve zachyťte v jedné fotografii z boku tak, aby na fotce byly všechny lahve celé včetně celého balónku.
7. Stejnou fotografii lahví pořizujte co chvíli, abyste později mohli pozorovat rozdíly. Fotografii stačí udělat cca pět – jednu ihned při začátku experimentu, další po 30, 60 a 120 minutách experimentu a poslední cca 3 hodiny po začátku experimentu. Četnost fotek i délka experimentu záleží na vašem úsudku, podle toho, jak rychle se vám balonky budou nafukovat. Měli byste pozorovat, že aditiva ovlivňují, jak rychle se jednotlivé balonky nafukují.
8. Po cca třech hodinách můžete experiment ukončit, obsah lahví zlikvidujte, lahve i balonky vymyjte a nechte vysušit.

13. Vypočítejte teoretické pH roztoků, které jste připravovali:

i. 5 g kyseliny citronové ve 150 ml vody [0.5 b]  
 $pK_a = 3.13$ ;  $c = 0,17 \text{ M}$ ; **pH = 1,9**

ii. 5 g jedlé sody ve 150 ml vody [0.5 b]  
 $pK_a = 6,3$ ;  $pK_b = 7.66$ ,  $c = 0,39 \text{ M}$ ; **pH = 10,4**

iii. 5 ml octa (8 %) ve 150 ml vody [0.5 b]  
 $pK_a = 4,76$ ;  $c = 0,043 \text{ M}$ , **pH = 3,1**

Pracujte s předpoklady, že látky jsou čisté, že cukr je látka zcela neutrální a neúčastní se žádných acidobazických procesů, že roztok existuje za standardní teploty, že navážená kyselina citronová je bezvodá (ne monohydrát) a disociuje pouze do prvního stupně (použijte nejnižší hodnotu  $pK_a^1$  a ostatní hodnoty  $pK_a^2$  a  $pK_a^3$  při výpočtu zanedbejte), že ocet je 8 % (w/w) roztok kyseliny octové ve vodě a že přídatkem daného množství aditiv se nemění hustota roztoku (pracujte s hodnotou  $1 \text{ g cm}^{-3}$ ).

14. Přiložte pět fotografií pořízených dle návodu v této části úlohy. [5 b]

Viz fotografie na další straně

15. Porovnejte a seřadte jednotlivé podmínky experimentu (kyselina citronová, jedlá soda, ocet, bez přídatku aditiv) podle toho, jak rychle se dané balonky nafukovaly. Svá pozorování vysvětlete (tento balonek se nafukoval nejrychleji protože..., tento balonek nejpomaleji protože..., tento se nenafoukl vůbec protože...). Která z podmínek, resp. jaké pH kvasinkám svědčilo nejlépe? [2 b]

Nejrychleji se nafukovaly balonky s kyselým prostředím, nafukovaly se zhruba stejně rychle, z toho důvodu, že kvasinkám kyselé prostředí svědčí. Pomaleji se nafukovala kontrola a nejpomaleji experiment se zásaditým roztokem, protože v tomto případě se nacházíme výrazně mimo pH optimum růstové/metabolické aktivity kvasinek.



## Část čtvrtá: Cukry necukry

aneb vliv druhu kvašeného materiálu na růst a činnost kvasinky pekařské

Poslední \*něco\*, kterému se podíváme na zoubek, bude samotná esence našeho experimentu, samotný cukr a sůl našich (a kvasinčích) životů – ale spíš tedy ten cukr. V této části úlohy totiž budeme řešit to, čím budeme naše kvasinky krmit.

Není cukr jako cukr. Jistě víte, že termín „cukr“ neoznačuje jen jedinou sloučeninu, ale celou řadu jednoduchých sacharidů, které mají společného jen to, že jsou po chuti sladké – glukosa, fruktosa, galaktosa, sacharosa, laktosa, trehalosa... A každý se v metabolismu zpracovává trošičku jinak. Rozdílů v počtu metabolických reakcí, který daný cukr musí podstoupit, aby byl zpracován na energii, vůbec nemusí být velké, ale mohou mít významný vliv na energetickou bilanci procesu, či jeho regulaci. Nuance se sčítají a každá molekula ATP se počítá.

16. Mnoho druhů kvasinek, včetně naší *Saccharomyces cerevisiae*, si za určitých okolností volí zajímavý a na první pohled ne úplně logicky vypadající strategii zpracování živin. Běžný oxidativní metabolismus glukosy je energeticky mnohem, mnohem efektivnější, než anaerobní fermentace (v přepočtu na zpracování 1 molekuly glukosy by kvasinka aerobně získala mnohem více energie, než její anaerobní fermentací). Přesto, pokud se kvasinky ocitnou v prostředí, kde je velká koncentrace glukosy, nehlídají na to, jestli v prostředí je nebo není kyslík a glukosu vždy nejprve zpracovávají neefektivně, anaerobně, a až po téměř úplném vyčerpání zásob glukosy přeseďlají na efektivní, aerobní metabolismus. Proč tomu tak je a jakou má tato na první pohled nelogická strategie pro kvasinku význam, resp. jakou jí poskytuje výhodu? (Nápověda: tento efekt byl poprvé pozorován a nese jméno po anglickém biochemikovi Herbertu G. Crabtree.)

[1.5 b]

Tzv. Crabtreeho efekt je jev, kdy kvasinky při vysoké koncentraci dostupné glukosy produkují alkohol (tedy provádějí anaerobní zpracování cukru), přestože mají k dispozici kyslík a prioritizují tak rychlou spotřebu cukrů namísto vlastního růstu (který by byl efektivnější při pomalejším aerobním procesu). Kvasinky si takto „brání své teritorium“ – glukosu rychle zpracují na něco, co nemůžou dobře využít ostatní organismy v okolí (ethanol) – přitom sice získají nějakou energii, ale primární je „sebrat“ energii konkurenčním organismům – zároveň vyprodukovaným ethanolem konkurenci i poškozují. Jakmile glukosa dojde (a konkurence nemá co žrát či už je po smrti), kvasinky se mohou k ethanolu vrátit, poněvadž kvasinky ethanol umí dále zpracovat, a efektivně prorespirovat, když už je netlačí čas ani konkurence.

A teď se pojďme společně podívat, co tedy kvasinkám chutná nejméně.

1. Připravte si čtyři stejné skleněné lahve, trychtýř, čtyři balonky, čtyři pytlíky (4×7 g) droždí, 15 g kuchyňského cukru, 15 g dextrosy, 15 g **JEDNÉ** z látek ze seznamu v příloze (xylytol, sorbitol, erythritol, mannitol, laktosa, příp. maltodextrin či isomalt), 15 g **JEDNOHO** sladidla či jiné pro vás zajímavé látky dle vlastní volby, odstátou vodou a fotoaparát.

2. Před prvním použitím balonky párkrát ústy nafoukněte a nechte vyfouknout, aby se uvolnila tenze pryže a balonky se mohly nafukovat rovnoměrně a reprodukovatelně.
  3. Do první z lahví nasypete 15 g kuchyňského cukru, do druhé z lahví 15 g dextrosy, do třetí z lahví 15 g **JEDNÉ** z látek v seznamu v příloze či výše a do čtvrté z lahví 15 g sladidla či jiné látky dle vaší volby.
  4. Do každé z lahví přilijte 150 ml odstáté vody o pokojové teplotě (20–25 °C). Lahvemi míchejte/třepejte, dokud se obsah zcela nerozpustí.
  5. Pomocí trychtýře do každé z lahví přisypte pytlík (7 g) droždí. Lahvemi opatrně míchejte/třepejte, dokud se veškeré sušené droždí v roztocích zcela nerozptýlí (výsledek musí být rovnoměrně zbarvená suspenze bez hrudek či viditelných granulek droždí).
  6. Na hrdlo každé z lahví opatrně nasadte vyfouknutý balonek, aby se do balónku nedostala žádná tekutina z lahve. Lahve postavte na klidné, přístupné místo bez výkyvů teploty. Lahve postavte vedle sebe tak, aby se o sebe balonky nemohly otírat, a všechny čtyři lahve zachyťte v jedné fotografii z boku tak, aby na fotce byly všechny lahve celé včetně celého balónku.
  7. Stejnou fotografii lahví pořizujte co chvíli, abyste později mohli pozorovat rozdíly. Fotografii stačí udělat cca pět – jednu ihned při začátku experimentu, další po 30, 60 a 120 minutách experimentu a poslední cca 3 hodiny po začátku experimentu. Četnost fotek i délka experimentu záleží na vašem úsudku, podle toho, jak rychle se vám balonky budou nafukovat. Měli byste pozorovat, že různý vstupní materiál více či méně ovlivňuje, jak rychle se jednotlivé balonky nafukují.
  8. Po cca třech hodinách můžete experiment ukončit, obsah lahví zlikvidujte, lahve i balonky vymyjte a nechte vysušit.
17. Uveďte, jaké sladidlo či jinou látku dle vlastní volby jste si pro experiment zvolili, proč jste si ji zvolili a co od dané látky očekáváte: bude kvasit lépe či hůře než kuchyňský cukr? Pokud jste si zvolili nějakou směs (např. med, mouka, jablečná šťáva...), uveďte, o které či kterých z obsažených látek se domníváte, že by mohla být zkvasitelná. [1 b]  
Řešení individuální. Pro testování pokusu jsme zvolili čekankový sirup. Ten obsahuje (mimo nějakého zkvasitelného glycerolu a stopového množství nezksavitelné sukralosy) velké množství inulinu, polysacharidu sice hůře pro metabolismus dostupného, ale nakonec zkvasitelného. Čekáme tedy, že balonek se nafoukne, ale ne tak rychle, jako u kontrolní sacharosy.
18. Co mají společného látky ze seznamu v příloze (xylitol, sorbitol, erythritol, mannitol, laktosa, příp. maltodextrin či isomalt) v kontextu kvašení? [1 b]  
Jedná se o tzv. „nezksavitelná sladidla“ či „nezksavitelné cukry“ – v lidských ústech sice stimulují ty správné receptory, a tak vyvolávají smyslový vjem, sladkou chuť, ale pro organismus náš či kvasinčí jsou velmi špatně stravitelné nebo energeticky zcela netknutelné (mají mizivou až nulovou energetickou hodnotu). Tyto látky jsou tak ve fermentaci neaktivní.

19. Přiložte pět fotografií pořízených dle návodu v této části úlohy a uveďte, které sladidlo ze seznamu v příloze jste při experimentu použili. [5 b]



20. Porovnejte a seřad'te jednotlivé podmínky experimentu (kuchyňský cukr, dextrosa, látka ze seznamu v příloze, látka dle vašeho výběru) podle toho, jak rychle se dané balonky nafukovaly. Svá pozorování vysvětlete (tento balonek se nafukoval nejrychleji protože..., tento balonek nejpomaleji protože..., tento se nenafoukl vůbec protože...). Která z podmínek, resp. jaký cukr/látka kvasinkám chutnala nejvíce? [2 b]

Nejrychleji se nafukoval balonek na lahvi se sacharózou, o něco pomaleji pak balonek s čekankovým sirupem (dle očekávání výše) a nejpomaleji překvapivě balonek na lahvi s glukosou (což bylo poněkud překvapivé, autor čekal opak). I balonek na lahvi s glukosou se však nakonec ustálil na přibližně stejném objemu, jako ostatní dva cukry. Balonek na lahvi s nezkrasitelným xylitolem se dle očekávání nenafoukl vůbec, xylitol kvasinky neumí zpracovat.

## Část pátá: Odchod s plnou parádou

aneb kterak nejen kvašení v záběru činností metabolických kvasinky pekařské jest

Kvasinky, kromě toho, že kvasí, musí stejně jako všechny ostatní živé organismy dělat také všechnu tu omáčičku naokolo, která je drží při životě. K životu nestačí jen jíst, pít a dýchat: organismy si stále ještě musí syntetizovat všechny své proteiny, enzymy, nukleové kyseliny, tuky, zásobní sacharidy, provádět energetickou výměnu, uchovávání informací a mnoho, mnoho dalších procesů – jíst, pít a dýchat jsou jen základní procesy, které umožňují získání energie a přísad do naší metabolické omáčičky.

Velice významným procesem, který se v každém organismu, do jisté míry děje, je detoxikace cizích i vlastních škodlivých látek. Tento proces sice přímo nepřispívá k nárůstu biomasy či získání energie, ale tím, že probíhá, odstraňuje překážky ostatním metabolickým procesům na už tak kamenité cestě životem. V nás, lidech, jsou hlavními místy detoxikace játra, ledviny a plíce. Poněvadž si však kvasinka o takových vymoženostech může nechat tak akorát zdát, detoxikační enzymy má rozmístěné buďto ve specializovaných organelách, či volně v cytoplasmě. A na toto se teď podíváme v praxi.

1. Připravte si dvě stejné skleněné lahve, trychtýř, pytlík (7 g) droždí, hypermangan, peroxid vodíku, alespoň 50 ml kalíšek, ze kterého se bude peroxid dobře a rychle vylévat, přípravek na mytí nádobí, vodu (už nemusí být odstátá) a jednorázové nepropustné hygienické rukavice.
2. Do první z lahví nalejte cca 15 ml vody a přisypte pytlík (7 g) droždí. Lahví opatrně míchejte, dokud se veškeré sušené droždí zcela neroztýlí (výsledek musí být rovnoměrně zbarvená suspenze bez hrudek či viditelných granulek droždí). Při míchání dejte pozor, ať vám zbytečně moc granulek droždí neulpí na stěnách, špatně se pak ze stěn do suspenze vrací.
3. Do druhé z lahví opět nalejte cca 15 ml vody a přisypte 1–2 g hypermanganu. Lahví opatrně míchejte, dokud nezískáte výrazně a sytě zbarvený roztok – hypermangan se nejspíše nerozpustí všechen, s tímto si nedělejte starosti. **S hypermanganem i jeho roztokem pracujte opatrně, barví a nechává na kůži hnědé fleky, které zmizí třeba až po několika dnech.**
4. Do obou lahví přidejte trochu pěnivého přípravku na mytí nádobí a dobře jej v suspenzi/roztoku rozmíchejte. Lahvemi míchejte opatrně, ať je moc nenapěníte. **Následující kroky provádějte v otevřeném prostoru, na podložce, u které nevadí, když se ušpiní – ideálně pokus provádějte venku za dobrého počasí např. nad kanálem či na betonu, v každém případě si zajistěte dostatek vody (např. v kyblíku či hadici) pro následnou nevyhnutelnou a důležitou likvidaci následků pokusu. Tento pokus z důvodu vašeho pohodlí nemusíte fotit ani natáčet pro získání plného počtu bodů, nicméně pokud si zajistíte dozor či pomoc, která pro vás pokus zaznamená na video, bude vám to jen ku prospěchu při pozdějším srovnávání.**
5. První z lahví postavte na pevnou podložku, u které nevadí, když se ušpiní. V okruhu ideálně alespoň 1 metru okolo lahve by měl být dostatek místa bez ničitelných, zbarvitelných či vybělitelných předmětů (tedy ani luxusní italská mozaiková dlažba, ani váš pejsek, ani sousedovo nové lambo). V žádném případě se nad lahev nenaklánějte!

6. Do kalíšku odměřte 50 ml peroxidu vodíku. **S roztokem peroxidu vodíku pracujte opatrně a v pracovním oblečení, roztok má bělicí účinky.**
7. 50 ml peroxidu vodíku pomocí trychtýře opatrně, ale svižně přilejte k obsahu lahve, trychtýř ihned vyndejte a ustupte, pozorujte (a ideálně nechejte vaši pomoc natáčet) reakci, zejména její průběh a rychlost.
8. Jakmile reakce ustane (což by se mělo stát nejdéle po cca 3 minutách, zpravidla i mnohem dříve), lahev v rukavicích odstraňte a vymyjte. Místo, kde lahev stála, spláchněte dostatečným množstvím čisté vody.
9. Kroky 5–8 zopakujte i pro druhou z lahví a výsledky porovnejte.

21. Uveďte jméno enzymu, který má nejpravděpodobněji na svědomí pozorovanou reakci suspenze kvasnic s roztokem peroxidu. Uveďte reakci, který tento enzym katalyzuje s peroxidem vodíku jako substrátem. [1 b]

Enzym se jmenuje kataláza a katalyzuje dismutační rozklad peroxidu vodíku.



22. Uveďte chemický název hypermanganu a napište a vyčíslete chemickou reakci, ke které dochází při reakci hypermanganu s peroxidem vodíku. [1 b]

Hypermangan = manganistan draselný,  $\text{KMnO}_4$ ; reakce s peroxidem vodíku probíhá dle rovnice  $2 \text{KMnO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{MnO}_2 + 5 \text{O}_2 + 2 \text{KOH} + 3 \text{H}_2\text{O}$

23. Jaký plyn se uvolňuje při reakci peroxidu vodíku se suspenzí kvasnic a jaký při reakci peroxidu vodíku s hypermanganem? Jak je možné přítomnost těchto plynů ve směsi plynů experimentálně dokázat? [1 b]

Při obou reakcích se uvolňuje kyslík. Jeho důkaz se dělá obtížně, poněvadž kyslík je ve vzduchu všude, ve vysoké koncentraci, tedy je obtížné rozlišit, jestli pochází z reakce či jestli se jedná o kontaminující kyslík z atmosféry. Důkaz kyslíku můžeme provést například tak, že plyn budeme pod vodou jímat do odměrného válce či kádinky obrácené dnem vzhůru (abychom zabránili vstupu atmosférického kyslíku; byť ve vodě stále nějaký rozpuštěný kyslík je, oproti „našemu“ kyslíku je ho zanedbatelné množství), a po vyjmutí nádoby z vody dovnitř vložíme např. doutnající špejli, která by se měla rozhořet.

24. Uveďte svá pozorování z této části úlohy. Jak reakce probíhaly, jak rychle? Byla některá z nich rychlejší, nebo ne? Pokud ano, proč by tomu tak mohlo být? [2 b]

Řešení individuální – v závislosti na kondici vašich kvasinek, peroxidu vodíku, množství hypermanganu a dalších faktorech může být rychlejší jedna i druhá reakce. V principu jsou obě reakce velmi rychlé (i chemický, i katalázou katalyzovaný rozklad) a proto nejde obecně říci, která bude rychlejší; závisí na přesném uspořádání experimentu.

25. Proč je prodej koncentrovaného peroxidu vodíku regulován? Resp. proč si běžný člověk nemůže bez zvláštního povolení legálně koupit roztok peroxidu vodíku koncentrovanější než 12 %? [1 b]

Peroxid vodíku je silné oxidační činidlo a tedy jedna z nutných přísad každé výbušniny. Koncentrovaný peroxid vodíku, stejně jako chlorečnany, kyselina dusičná/dusičnany a další látky jsou tak pro běžnou veřejnost dostupné jen za určitých podmínek (zpravidla určitá maximální koncentrace) a ve vyšších koncentracích nejsou pro běžné osoby

ke koupi vůbec, případně jen se svolením báňského úřadu či jiné autority (v závislosti na charakteru látky).

## Doslov

### aneb dozvuky a ohlasy centralizovaného a body ohodnocovaného týrání kvasinky pekařské

Milý řešiteli, jestli jsi se dočetl (a doexperimentoval) až sem, srdečně ti gratuluji. Máš za sebou nelehký úkol – komplexní charakterizaci fermentačního procesu modelového organismu *Saccharomyces cerevisiae*, ještě navíc s náhledem do jiného metabolického procesu, detoxikace, který v jejích buňkách probíhá.

Naučil jsi se připravit komplexní experimenty, změřit růstovou křivku, tu proložit matematickým modelem a z něj vyčíst užitečná data – například rychlostní konstantu či dobu zdvojení takového růstu: parametry extrémně důležité pro popsání libovolného růstu, ať už mikroorganismů, či třeba celých populací nebo šíření nemocí. Naučil jsi se, jak v experimentech hledat prchlivá \*něco\* – stanovování vlivu různých podmínek na průběh daného procesu a také hledání, při kterých podmínkách náš proces poběží nejlépe. To je opět velmi důležitá zkušenost, která se běžně uplatňuje při optimalizaci jak bioprocusů (a třeba i kvašení, například při výrobě piva, vína či octa a podobných kvašených produktů...), tak i procesů jiných, ať už v technických, přírodních či humanitních vědách. Jen takové hledání a optimalizace je totiž cestou k tomu, jak daný proces provádět co nejrychleji, nejefektivněji a samozřejmě, nejlevněji. No – a nakonec sis vyzkoušel a na vlastní oči viděl i to, že nejenom chemické reakce naším světem hýbou, a že enzymové reakce mohou být stejně rychlé i rychlejší, než tradiční reakce chemické, a to i v mnohem menším množství enzymů.

Milý řešiteli: pokud tě bavila tato úloha, anebo třeba jen některá z jejích částí, pak věř, že právě Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity ti má co dát. Ať už inženýrský obor Biotechnologie, či příbuzné magisterské obory Biochemie, Biofyzikální chemie, Mikrobiologie, Molekulární biologie a genetika a další. A já už dodám jen to, že se těším na naše příští setkání, ať už při nějaké další experimentální úloze, osobně na každoročně na podzim pořádané IBISí kampusové víkendovce či třeba mnohem později, ve Tvé budoucí přírodovědné kariéře.

## Seznam chemikálií a spotřebního materiálu

- Kuchyňské droždí sušené – 16 malých sáčků po cca 7 gramech
  - Pro naše účely se mnohem lépe pracuje se sušeným droždím než s lisovaným. Ideálně koupit větší množství pytlíků se známou vahou anebo větší balení, ze kterého ale budete muset odvažovat.
  - Vyvarujte se kypřícího prášku či tzv. „cukrářského droždí“ – opět se jedná pouze o kypřící prášek, jen na jiné bázi (tj. uvnitř není nic živého, vývoj plynu je čistě chemickou reakcí bez účasti fermentace)
- Kuchyňský cukr / sacharosa
  - Ideálně krystal či krupice, nepoužívejte moučku (cukr moučka obsahuje škrob jako protispékavou látku)
- Dextrosa / glukosa
  - Koupíte v potravinách jako sladidlo Glukopur nebo jako hroznový cukr. Pokud budete volit jiné alternativy, zkontrolujte jeho složení a dejte pozor, aby bylo sladidlo čistá glukosa/dextrosa/hroznový cukr (ne pouze přípravek *na bázi* glukosy – tedy mix glukosy a sacharosy atd.)
- Kterékoliv **JEDNO** z následujících: xylitol, sorbitol, erythritol, mannitol, laktosa, příp. maltodextrin či isomalt
  - Koupíte v potravinách jako umělá sladidla, hledejte u cukru anebo v sekcích bio/dia/racio nebo zdravých potravin. Opět dejte pozor, aby se jednalo o čistou látku, nejen sladidlo „na bázi“
- **JEDNO** libovolné další sladidlo dle vaší volby, např. med, čekankový sirup, třtinový cukr, datlový sirup... - čím rozpustnější, tím lepší.
- Kyselina citronová
- Jedlá soda
- Ocet
- Manganistan draselný – 10 gramů
  - Koupíte v každé lékárně jako „hypermangan“. **Pozor, barví.**
- Peroxid vodíku 3% – 100 mL
  - Opět koupíte v každé lékárně. Ideálně větší (cca 100 ml pro naše potřeby, případně 500 ml, pokud pro něj máte i jiné využití) lahvičku bez spreje/kapátek a podobných vymožeností – peroxid se bude lépe vylévat a ušetříte. **Pozor, má bělicí účinky.**
- Odstátá voda o pokojové teplotě
  - Voda bohatě stačí kohoutková, nicméně v tomto seznamu je proto, abyste si ji dopředu připravili – odlili třeba do hrnce a nechali nejlépe přes noc odstát, aby z ní vyprchaly těkavé látky jako např. chlor a aby se její teplota vyrovnala s teplotou okolí

(kohoutková voda je může být zvláště v zimě velmi studená, a tedy nevhodná pro naše účely – při experimentech by měla voda mít, pokud nebude výslovně uvedeno jinak, 20–25 °C)

- Pěnivý přípravek na mytí nádobí (JAR apod.)
- Jednorázové hygienické **nepropustné** rukavice (např. latexové)

## Seznam pomůcek

- Pět stejně velkých, ideálně skleněných lahví s úzkým hrdlem a malým objemem (ideálně 250 ml, případně 200–500 ml)
  - Pokud neseženete skleněné, použijte plastové, např. od limonády či vody. Skleněné lahve od piva jsou také možností, ale bude se vám hůře pracovat, protože pořádně neuvidíte, co se uvnitř děje. Lahve samozřejmě dobře vymyjte!
- Balónky – alespoň 5 kusů, ideálně kolem 10 kusů (pokud se nějaký balonek zašpiní pěnou, špatně se umývá, tak ať máte náhradní)
  - Před prvním použitím balonky vždy párkrát ústy nafoukněte a nechte vyfouknout, aby se uvolnila tenze pryže. Odpor balónku nikdy nepoužitého je jiný, než odpor balónku už někdy nafouknutého.
- Kuchyňské váhy (rozlišení ideálně 0.1 gramu či 1 gram)
- Fotoaparát a stopky (stačí mobil), příp. krejčovský metr.
- Trychtýř
- Teploměr
- Odměrka
- Kalíšek, do kterého se vejde alespoň 50 ml (může být např. malá odměrka)
- Rychlovarná konvice/sporák a hrnec