

Praktická úloha č. 1

Téma: **Výživa a metabolizmus cukrov u kvasiniek**

Kvasinka pивná (*Saccharomyces cerevisiae*) je jednobunková huba, ktorá má nezastupiteľné miesto v mnohých kvasných procesoch pri výrobe potravín a nápojov v potravinárskom priemysle. Vďaka jej nenáročnej kultivácii sa stala jedným z modelových organizmov pre štúdium eukaryotických buniek. V dnešnej úlohe si vyskúšate prácu s nimi a pozrieme sa aj na základné biochemické procesy spojené s ich metabolizmom cukrov.

V praktickej časti tejto úlohy sme si pre vás pripravili tri rôzne roztoky označené A, B, C. Sú to roztok glukózy, roztok škrobu a pitná voda. Vaším cieľom je experimentálne určiť, aký roztok sa skrýva pod akým označením.

Pomôcky: svetelný mikroskop, skúmavky 3ks, stojan na skúmavky 1ks, Petriho miska 1ks, plastové pipety 4ks, podložné sklíčko 3 ks, krycie sklíčka, fixka, vodný kúpeľ

Chemikálie: roztoky A, B, C, Lugolov roztok

Biologický materiál: suspenzia kvasiniek *S. cerevisiae*

Ak vám čokoľvek zo zoznamu chýba, ihneď na to upozornite dozor v laboratóriu.

Postup prípravy vzoriek:

1. Napipetujte 1 ml suspenzie kvasiniek do každej z troch skúmaviek.
2. Do každej skúmavky napipetujte 3 ml jedného z roztokov A, B, C.
Nezabudnite si skúmavky označiť, aby sa vám nepomiešali.
Vždy použite čistú pipetu, aby ste si nekontaminovali roztoky alebo skúmavky so vzorkami.
3. Obsah skúmavky premiešajte jemnými údermi o hranu vašej ruky.
4. Uložte skúmavky do vodného kúpeľa.
5. Skúmavky s vašimi vzorkami nechajte stáť minimálne 30 minút.

Pozorovanie vzoriek:

1. Z každej odstátej vzorky si pripravte mikroskopický preparát. Na podložné sklíčko pridajte pipetou kvapku vzorky a prikryte krycím sklíčkom.
Nezabudnite si ich označiť.
2. Preparáty pozorujte pod svetelným mikroskopom.
Zakreslite a zapíšte vaše pozorovanie. Ako vyzerajú bunky v jednotlivých preparátoch? Prebiehajú v ňom nejaké dobre pozorovateľné procesy?

Test prítomnosti škrobu:

1. Na Petriho misku kvapnite dostatočne ďaleko od seba po približne troch kvapkách z vašich vzoriek. Rozmiestnenie si poznačte.
2. Ku každej vzorke pridajte kvapku Lugolovho roztoku. Pozorujte zmeny sfarbenia vzoriek a zaznamenajte ich. Lugolov roztok zmení svoju farbu v prítomnosti škrobu z oranžovo-hnedej na modrú až fialovú.

Praktická časť

Vzorka A

Nákres:

Vzhľad a aktivita buniek:

Reakcia s Lugolovým roztokom:

Zväčšenie:

Vzorka B

Nákres:

Vzhľad a aktivita buniek:

Reakcia s Lugolovým roztokom:

Zväčšenie:

Vzorka C

Nákres:

Vzhľad a aktivita buniek:

Reakcia s Lugolovým roztokom:

Zväčšenie:

Vyhodnotenie výsledkov praktickej časti úlohy

Na základe vašich experimentov priradte obsah roztoku k ich značeniu:

Roztok A:

Roztok B:

Roztok C:

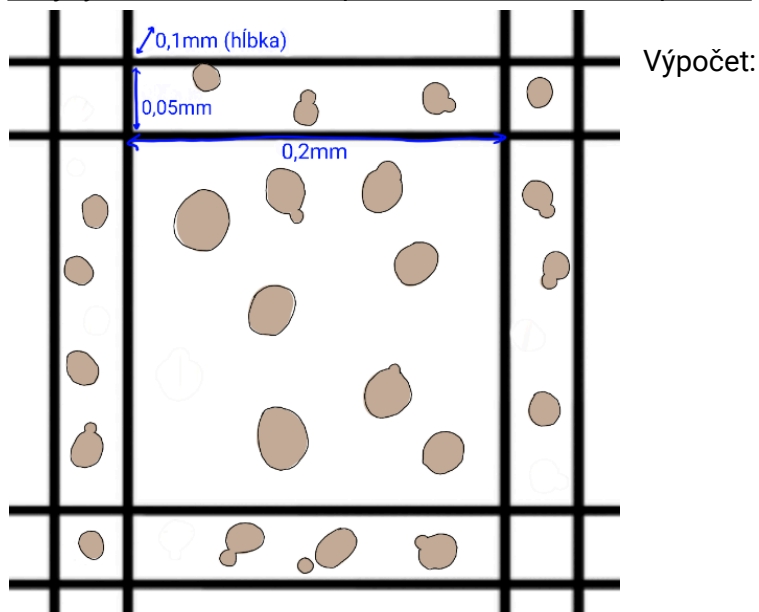
Možnosti: roztok glukózy (2 %), roztok škrobu (1 %), pitná voda

Teoretická časť

- 1) Bürkerova komôrka je špeciálna pomôcka na počítanie koncentrácie buniek v suspenziách. Skladá sa z modifikovaného podložného sklíčka, na ktorom je po zväčšení pod mikroskopom viditeľná mriežka a skrutiek na prichytenie krycieho sklíčka. Na mriežke rozoznávame veľké štvorce s dĺžkou strany 0,2 mm, malé štvorce s dĺžkou strany 0,05 mm a obdĺžniky s rozmermi strán 0,2 mm a 0,05 mm. Samotná komôrka má hĺbku 0,1 mm. Ak spočítame počet buniek v objeme týchto útvarov, dokážeme vypočítať koncentráciu buniek v pripravenej suspenzii.

Vypočítajte koncentráciu buniek v suspenzii použitej na výrobu preparátu na obrázku. Na výpočet použite štvorec so stranou 0,2 mm. Deliace sa bunky sa počítajú ako jedna.

Svoj výsledok uveďte ako počet buniek na liter suspenzie.

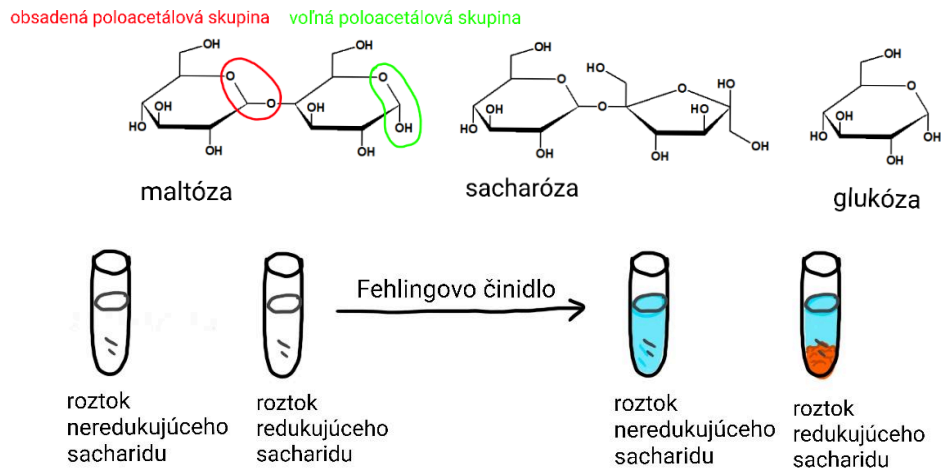


Koncentrácia buniek v suspenzii:

- 2) S vaším kamarátom chemikom ste sa rozhodli vykonať ďalšie experimenty s kvasinkami. Chceli ste porovnať účinok roztoku sacharózy a glukózy na kvasinky. Pripravili ste dve skúmavky so suspenziou kvasiniek. Do jednej zo skúmaviek ste pridali roztok glukózy, do druhej roztok sacharózy. Po istom čase ste pozorovali vaše vzorky pomocou mikroskopu. Zistili ste, že v oboch roztokoch kvasinky intenzívne pučali. Nemali ste ich ani označené, preto ste ich nedokázali odlíšiť. Váš kamarát však dostal nápad a navrhol vykonať

jednoduchú oxidačno-redukčnú reakciu, ktorá sa používa na dôkaz redukujúcich sacharidov v roztoku.

Z vašich vzoriek ste odobrali pár kvapiek do skúmaviek a pridali ste do nich Fehlingovo činidlo. Skúmavky ste dali do vodného kúpeľa, aby ste reakciu urýchlili. Fehlingovo činidlo sa skladá z dvoch roztokov: roztoku pentahydrátu síranu meďnatého (modrej skalice) a roztoku hydroxidu sodného s vínnanom sodno-draselným. Princípom Fehlingovej reakcie je redukcia meďnatého katiónu Cu^{2+} na meďný katión Cu^{1+} , ktorý sa vyzráža ako oxid meďný. V prítomnosti redukujúceho sacharidu vznikne v roztoku oranžová zrazenina. Redukujúce účinky majú sacharidy voľnú poloacetálovú skupinu. Ukážka poloacetálovej



skupiny na molekule maltózy ako aj chemické vzorce glukózy a sacharózy sa nachádzajú pod týmto textom.

Zakrúžkujte správne tvrdenie:

- A. V ani jednej skúmavke sa nevytvorí oranžová zrazenina.
- B. V oboch skúmavkách sa vytvorí oranžová zrazenina.
- C. V skúmavke obsahujúcej glukózu sa vytvorí oranžová zrazenina.
- D. V skúmavke obsahujúcej sacharózu sa vytvorí oranžová zrazenina.

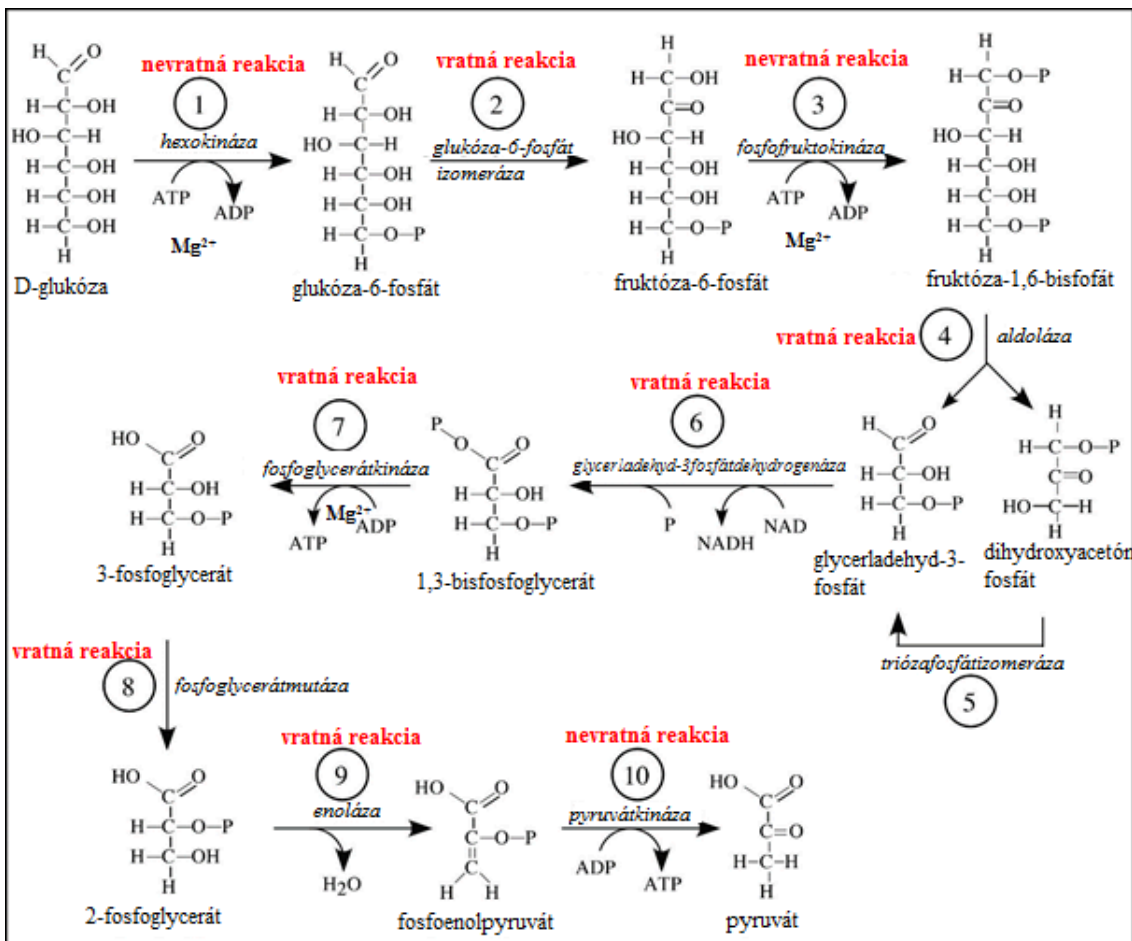
- 3) Chceli ste porovnať, či má koncentrácia cukru v roztoku vplyv na *S. cerevisiae*. Pripravili ste dva roztoky glukózy s rôznymi koncentraciami. Koncentrovanejší roztok ste pripravili pridaním 2 g glukózy na 100 ml vody a menej koncentrovanejší roztok pridaním 0,1 g na 100 ml vody. Do kadičiek s roztokmi ste pridali suspenziu kvasiniek a otvorené ste ich nechali stáť na teplom mieste týždeň. Obe kadičky boli zakalené, na hladine bola pena, ktorá bola tvorená produktom metabolizmu kvasiniek. Z kadičky s koncentrovanejším roztokom cukru sa šíril zápach alkoholu, z druhej nie.

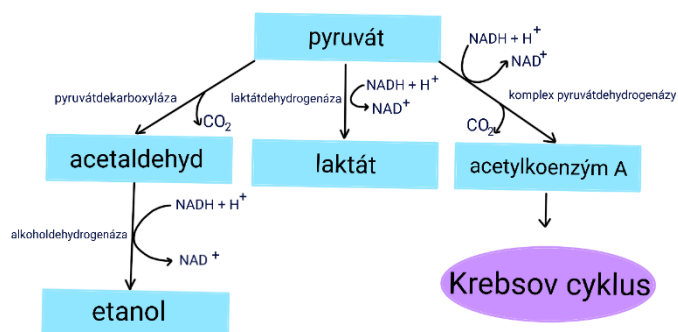
V pene na hladine kadičiek sa hromadil plyn, ktorý je produktom metabolizmu kvasiniek. Aký to bol plyn?

.....

- 4) Glykolýza predstavuje základnú metabolickú dráhu, vďaka ktorej živé organizmy získavajú energiu. Jej podstatou je získavanie energie rozkladom glukózy pomocou biokatalyzátorov, ktoré nazývame enzýmy. Získaná energia chemických reakcií sa ukladá do zlúčeniny ATP (adenozíntrifosfát), konkrétne do jej makroergických väzieb medzi fosfátovými skupinami. Na to, aby bunka dokázala z glykolýzy získať energiu, musí ju v istých krokoch aj minúť.

Kvasinky sú pre potravinársky priemysel významné pre dva procesy: výroba kysnutého cesta a alkoholu. Vo voľnej prírode sa kvasinky vyskytujú najmä na zrelom ovocí, kde súťažia o zdroje živín s mnohými inými hubami a baktériami. Ich schopnosť produkovať etanol z kyseliny pyrohroznovej môže byť dôsledkom tejto konkurencie. Etanol je škodlivý pre živé organizmy vrátane samotných kvasiniek od istej koncentrácie v ich prostredí, približne v rozpätí 11 – 15 %. Reakcie, ktorými kvasinky syntetizujú etanol sú reverzibilné, ako môžete vidieť na priloženom obrázku. Dokážu z etanolu opäť vyrobiť pyruvát, ktorý ďalej bunka dokáže premeniť na acetylkoenzým A, ktorý využívajú mitochondrie v Krevsovom cykle.





Označte správne tvrdenia na základe textu a schém:

- A. Pri premene fosfoenolpyruvátu na pyruvát bunka získava energiu.
- B. Laktát vzniká z pyruvátu redukciou.
- C. Etanol a laktát majú rovnaký počet uhlíkov.
- D. Z jednej molekuly glukózy môžeme získať dve molekuly acetylkoenzýmu A.

Zhrnutie

Na základe vašich experimentov, predošlých teoretických úloh a vašich znalostí označte tvrdenia ako správne alebo nesprávne:

Tvrdenie	správne	nesprávne
<i>S. cerevisiae</i> nedokážu spracovať sacharózu ako zdroj energie.		
<i>S. cerevisiae</i> dokážu samostatne spracovať škrob a získať z neho energiu.		
Miera vegetatívneho rozmnožovania kvasiniek dokáže poslúžiť ako ukazovateľ obsahu výživných látok v ich prostredí.		
<i>S. cerevisiae</i> dokážu produkovať etanol len v podmienkach bez prítomnosti kyslíka.		
Ak majú <i>S. cerevisiae</i> dostatok zdrojov v prostredí, glykolýza je ich hlavným zdrojom ATP.		
Etanol môže byť pre <i>S. cerevisiae</i> zdrojom energie.		
<i>S. cerevisiae</i> sú schopné žiť výhradne v aeróbných podmienkach.		
V prípade nedostatku glukózy v prostredí <i>S. cerevisiae</i> produkujú z pyruvátu miesto etanolu acetylkoenzým A.		
<i>S. cerevisiae</i> dokážu rozkladať monosacharidy a disacharidy, ale nie polysacharidy.		
V procese glykolýzy sa spotrebuje rovnaké množstvo energie ako sa získa.		
Z hľadiska množstva produkovaného ATP je výhodnejšie pre bunku produkovať acetylkoenzým A ako etanol.		
Etanol môže spôsobiť chemickú denaturáciu proteínov a poškodenie biologických membrán.		

Priestor pre spätnú väzbu:

Zdala sa ti úloha ťažká? Čo sa ti na nej páčilo/nepáčilo?