

## Vplyv rôznych zdrojov uhlíka a pH na produkciu etanolu u *Saccharomyces cerevisiae*

### Hypotézy:

1. Etanolové kvasenie čistej jablčnej šťavy prebehne menej efektívne ako šťavy s prídavkom rôznych zdrojov uhlíka.
2. Zvýšenie osmotického tlaku prostredia zvýši produkciu etanolu viac ako jeho nízke hodnoty.
3. Zmena pH vstupnej komodity ovplyvní kvasenie.

### Dôvody na stanovenie hypotéz:

1. Predpokladáme, že rôzne druhy prídavkov (melasa, med, sacharóza) ako zdroj uhlíka a iných látok, tiež látok inhibičných môže rôznym spôsobom vplývať na produkciu etanolu pri etanolovom kvasení.
2. Predpokladáme, že zvýšením osmotického tlaku podporíme stresové prostredie a zvýšime tým metabolizmus kvasiniek a produkciu etanolu, aby kvasinky rýchlejšie zriedili prostredie a znížili dopady osmotického stresu.
3. Predpokladáme, že zmeny pH ovplyvnia rast a rozmnožovanie kvasiniek, príjem živín a tým aj vylučovanie etanolu do prostredia, celkovo ovplyvnia rýchlosť fermentácie. Rovnako predpokladáme, že prídavky rôznych zdrojov uhlíka budú mať vplyv na výsledné pH fermentovanej šťavy.

### Postup č. 1: Založenie experimentu na hodnotenie etanolového kvasenia a rozdelenie úloh

#### Rozdelenie do skupín:

Študenti sa rozdelia do 4 skupín, každá skupina bude pracovať na jednom variante. Každá skupina spracuje svoj variant a o výsledky sa podelí s ostatnými skupinami. Jednotlivé skupiny v práci a výsledkoch kontrolujú ostatné skupiny. Výsledným produktom bude článok, ktorý spracuje každá skupina a zakomponuje do nej výsledky všetkých skupín. Konečným výsledkom budú štyri práce vo forme vedeckého článku v slovenskom jazyku.

#### Založenie experimentu:

Založiť je potrebný 16 baniek s objemom 250 ml šťavy príslušného variantu (pozri obrázok nižšie). Vytvoríť je potrebné 4 základné skupiny, ktoré budú variantami experimentu. 4 základné varianty sú:

1. Variant – je iba jablčná šťava, v ktorej budeme sledovať vplyv zmeny pH na tvorbu alkoholu pri teplote 25 °C po dobu 6 dní, pH budeme meniť na hodnoty: -0,2 a +0,2 a +0,4 od pôvodného pH, na zmenu pH použijeme kyselinu citrónovú a hydrogén-uhličitan sodný
2. Variant – je jablčná šťava s prídavkom medu v koncentračnom spáde prídavku medu s nasledujúcimi hodnotami v °Brix: +3°Brix, +6°Brix, +9°Brix a +12°Brix meriame od pôvodných °brix v pôvodnej jablčnej šťave, ako kontrola a začiatok pri výpočte a tvorbe grafov posluží pôvodná vzorka bez zmeny pH
3. Variant – je jablčná šťava s prídavkom melasy v koncentračnom spáde prídavku melasy s nasledujúcimi hodnotami v °Brix: +3°Brix, +6°Brix, +9°Brix a +12°Brix meriame od pôvodných °brix v pôvodnej jablčnej šťave, ako kontrola a začiatok pri výpočte a tvorbe grafov posluží pôvodná vzorka bez zmeny pH
4. Variant – je jablčná šťava s prídavkom sacharózy v koncentračnom spáde prídavku sacharózy s nasledujúcimi hodnotami v °Brix: +3°Brix, +6°Brix, +9°Brix a +12°Brix meriame od pôvodných °brix v pôvodnej jablčnej šťave, ako kontrola a začiatok pri výpočte a tvorbe grafov posluží pôvodná vzorka bez zmeny pH

## Metodika

### Príprava variantu 1:

- pripraviť 4 Erlenmayerove banky s objemom 250 ml jablčnej šťavy
- v bankách upraviť pH v 4 rôznych hodnotách (pôvodné, pôvodné -0,2 pH, pôvodné +0,2 pH, pôvodné + 0,4 pH) pomocou hydrogén-uhličitanu sodného a kyseliny citrónovej
- pre detekciu správneho pH používame elektronický prenosný pH meter
- pH zaznamenáme, množstvo pridaných zložiek na kalibráciu pH zaznamenáme
- pH pôvodnej vzorky zaznamenáme

### Príprava variantov 2, 3 a 4:

- pripraviť 12 Erlenmayerových baniek s objemom 250 ml jablčnej šťavy a prídavku (melasa, med a sacharóza) aby prídavky zvýšili stupne °Brix (koncentrácia cukrov v roztoku) o hodnoty od pôvodnej vzorky o 3 °Brix, o 6 °Brix, o 9 °Brix a o 12 °Brix (viď. obrazová príloha)
- na meranie stupňov °Brix používame refraktometer
- stupne °Brix zaznamenáme (pôvodné aj kalibrované)

### Revitalizácia a pridávanie kvasiniek

- kvasinky pridáme do pripraveného objemu 50 ml a revitalizuje podľa inštrukcií výrobcu
- po revitalizácii pridáme 50 ml šťavy s kvasinkami do zvyšného objemu 200 ml v Erlenmayerovej banke
- kvasinky je potrebné pridať v množstve 0,1 g na 250 ml objem a dôkladne premiešame

### Váženie

- odmerné banky zvážíme na váhach s presnosťou na tisícinu gramu bez kvasnej zátky
- hodnoty zaznamenáme u všetkých vzoriek

### Fermentácia

- banku uzatvoríme kvasnou zátkou, utesníme plastelínou
- fermentujeme pri 25°C po dobu 6 dní

### Mikroskopické vyšetrenie vitality kvasiniek

- pripraviť vitálne farbený preparát

Poznámka: všetky informácie z experimentu zaznamenávame kvôli úschove informácií pre budúce experimenty a pre potreby výpočtov

Tabuľka: 1. Varianty experimentu pre etanolové kvasenie – varianty prídavkov rôznych zdrojov uhlíka s variáciou pH v závislosti od pridanej zložky a teploty

Varianty	Kvasinka	Návažka lyofilizovaných kvasiniek	Objem šťavy	Druh šťavy	Teplota fermentácie	pH fermentácie
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,1 g	250 ml	100 % jablková	25 °C	Nastaviť pH podľa grafického zobrazenia
2				Jablko + med		Vyrovnať vo všetkých vzorkách na pôvodné
3				Jablko + melasa		
4				Jablko + sacharóza		

















**Výsledky a závery experimentu formulované do otázok:**


1. Ako sú efektívne prídavky použitých látok vo vzťahu k produktivite etanolu?
2. Je vstupná koncentrácia pridaných látok dôležitá pri produkcii etanolu?
3. Je zvýšenie osmotického tlaku šťavy pre fermentáciu prospešné?
4. Má zmena pH význam v produkcii etanolu?
5. Je vitalita kvasiniek vo všetkých variantoch rovnaká?

**Výpočty a zobrazenie výsledkov:**

1. Vplyv zdrojov uhlíka na produkciu etanolu
2. Vplyv pH na produkciu etanolu
3. Vplyv koncentrácie zdrojov uhlíka (resp. osmotického tlaku) na produkciu etanolu
4. Grafické vyjadrenie vitality kvasiniek
5. Teoretické prevedenie hodnôt produkcie etanolu na varianty

Obrazová príloha: Varianty v grafickom zobrazení:

Skupina / pH	°Brix				
	+ 0,4	+ 0,2	pôvodné	- 0,2	
1					Jablčná šťava 100 %
Skupiny / °Brix	+12°Brix	+9°Brix	+6°Brix	+3°Brix	
2					Jablčná šťava + med
3					Jablčná šťava + melasa
4					Jablčná šťava + sacharóza

 pôvodné pH a pôvodné °Brix