

Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

Fakulta prírodných vied

Katedra biotechnológií



LABORATÓRNE CVIČENIA

Z BIOLÓGIE II

Michaela Havrlentová, Veronika Gregusová, Daniela Chmelová

Trnava 2021

Autorský kolektív:

doc. RNDr. Michaela Havrlentová, PhD. (UCM, AH)

Mgr. Veronika Gregusová (UCM, AH)

RNDr. Daniela Chmelová, PhD. (UCM, AH)

Recenzenti:

doc. RNDr. Beáta Piršelová, PhD.

doc. Ing. Tibor Maliar, PhD.

Schválené Edičnou radou Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave a vedením Fakulty prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave ako učebný text pre študentov vysokých škôl.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani jeho časť nemožno reprodukovat' bez súhlasu majiteľa práv.

© Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

© RNDr. Michaela Havrlentová, PhD.

© Mgr. Veronika Gregusová

© RNDr. Daniela Chmelová, PhD.

Vydavateľ: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, 2021

Vydanie: prvé

ISBN 978-80-572-0186-1

PREDSLOV

Skriptum „Laboratórne cvičenia z biológie II“ sumarizuje základné princípy a metódy využívané v biologickom výskume, ktoré sú nadstavbou a pokročilou verziou laboratórných metód a princípov prezentovaných v skripte „Laboratórne cvičenie z biológie I“. Predložené skriptum poskytuje teoretický základ a prehľad laboratórných techník a úloh, ktorých cieľom je pochopiť fungovanie živého organizmu v rámci organizmu samotného a taktiež vo vzťahu k vonkajšiemu prostrediu a experimentálne zvládnuť laboratórne metódy s tým súvisiace.

Predložený študijný materiál je určený študentom odboru Biotechnológie, ale taktiež všetkým tým, ktorí majú záujem osvojiť si postupy využívané v biologickom výskume.

Zámerom predloženého učebného materiálu je prehĺbiť v študentoch teoretické vedomosti o experimentálnych metódach a taktiež umožniť im získanie experimentálnych skúsenosti v tejto oblasti.

Autori

OBSAH

LABORATÓRNY PORIADOK.....	5
BEZPEČNOSŤ PRÁCE V LABORATÓRIU.....	7
PRVÁ POMOC PRI NEHODE	9
NEBEZPEČNÉ LÁTKY V BIOLOGICKOM LABORATÓRIU	10
LABORATÓRNY DENNÍK	13
PRACOVNÉ PROTOKOLY.....	14
ČISTENIE SKLA	16
VODA V LABORATÓRIU.....	17
ZÁKLADNÉ OPERÁCIE V BIOLOGICKOM LABORATÓRIU.....	19
MODELOVÉ ORGANIZMY	26
RASTLINY AKO MODELOVÉ ORGANIZMY	32
ŠTATISTICKÉ HODNOTENIE BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	32
METABOLIZMUS RASTLÍN.....	37
FOTOSYNTÉZA V RASTLINÁCH.....	46
RASTLINNÉ PIGMENTY.....	54
RASTLINNÉ REGULÁTORY RASTU A VÝVINU.....	66
ZÁKLADNÉ ZLOŽKY ŽIVÝCH ORGANIZMOV	72
VODA.....	81
PROTEÍNY	91
SACHARIDY.....	102
POUŽITÁ LITERATÚRA.....	111
PRÍLOHA – Vzor protokolu Laboratórných cvičení z biológie II	114

LABORATÓRNY PORIADOK

1. Študent je povinný zoznámiť sa pred začatím práce v laboratóriu s laboratórnym poriadkom, s bezpečnostnými predpismi a s pravidlami poskytnutia prvej pomoci pri ohrození zdravia.
2. Študent je povinný oboznámiť sa pred začatím práce v laboratóriu so zásadami priebehu laboratórných cvičení, so študijným materiálom, so spôsobom, ako sa na cvičenia pripraviť a ako hodnotí laboratórne cvičenia vyučujúci.
3. Účasť na laboratórných cvičeniach je pre študenta povinná a každá absencia musí byť ospravedlnená. Ak má študent vážne osobné/zdravotné dôvody, pre ktoré sa nemôže zúčastniť cvičenia, oznámi ich vyučujúcemu, ak je to možné, vopred. Každé zameškané cvičenie musí byť nahradené. Na termíne náhradného cvičenia sa dohodne študent s vyučujúcim.
4. Študent je povinný prichádzať do laboratória včas a riadne pripravený. Musí mať pripravené potrebné výpočty na prípravu roztokov, poznať látky, s ktorými bude pracovať a ich vlastnosti. Pred začatím cvičenia vyučujúci overí znalosť študentov formou krátkeho písomného testu a ústneho preskúšania. Pokiaľ vyučujúci usúdi na základe previerky znalostí, že študent nemá dostatočné znalosti na riešenie daného cvičenia, cvičenie vykoná študent v náhradnom termíne.
5. Pri práci v laboratóriu musí mať študent zapnutý pracovný plášť, vhodnú obuv a pracovné pomôcky (poznámkový zošit s napísanou prípravou, ceruzku, pero, fixku na sklo, pravítko, nožnice). Dlhšie vlasy má študent vypnuté a taktiež nemá žiadne visiace náušnice, náramky na rukách a doplnky, ktoré by bránili bezpečnej práci v laboratóriu.
6. Študenti pracujú v dvojiciach, prípadne v trojici, pričom experimentálnu prácu si primerane rozdelia, aby sa každý podieľal na riešení úloh.
7. Pred samotnou prácou si študent prezrie laboratórne prístroje a pomôcky. Pripraví si na pracovný stôl všetky potrebné laboratórne pomôcky. Pred používaním prístrojov sa musí študent najskôr zoznámiť s ich obsluhou. Študent je taktiež oboznámený s vlastnosťami každej chemikálie, s ktorou pracuje (či ide o prchavú látku, toxickú, jed a podobne). S rizikovými látkami pracuje študent bezpečne, v rukaviciach a v zapnutom digestore a pod dohľadom vyučujúceho.
8. Všetky nedostatky a poruchy zistené pred začatím práce alebo počas nej, okamžite hlási študent vyučujúcemu.
9. Pri práci na samotnom cvičení je nutné postupovať presne podľa zadanej úlohy a pokynov vyučujúceho.
10. So všetkými laboratórnymi pomôckami pracuje študent opatrne a bezpečne. Chráni seba i ostatných v laboratóriu pred rizikom otvoreného ohňa, nebezpečnej chemickej látky alebo rozbitia skla.
11. Študent si popisuje zodpovedne všetko laboratórne sklo, v ktorom skladuje chemické roztoky.
12. Priebeh práce a dosiahnuté výsledky si každý študent zaznamenáva do laboratórneho denníka. Po skončení každej úlohy ukáže povinne študent dosiahnuté výsledky

vyučujúcemu, v inom prípade nie je považované laboratórne cvičenie za úspešne zrealizované.

13. Vypracované laboratórne protokoly z laboratórneho cvičenia odovzdá študent vždy v stanovenom termíne elektronicky, pričom vypracovaný laboratórny protokol musí obsahovať všetky nevyhnutné náležitosti a musí byť napísaný na predpísanom formulári.
14. Po skončení práce je študent povinný upratať svoje pracovné miesto, vypnúť elektrické spotrebiče, poriadne umyť sklo (saponátom a hubkou), opláchnuť ho dôkladne v destilovanej vode a vložiť správne do sušiarne.
15. Študent môže opustiť laboratórium až po kontrole dosiahnutých výsledkov a stavu pracovného stola vyučujúcim.
16. Prípadné nehody študenta v laboratóriu alebo akékoľvek (aj drobné) poranenie, prípadne nevoľnosť je nutné ihneď hlásiť vyučujúcemu a v prípade potreby zahájiť okamžite prvú pomoc.

BEZPEČNOSŤ PRÁCE V LABORATÓRIU

1. Práce sa uskutočňujú výhradne podľa pokynov vyučujúceho a pracovného návodu.
2. Tašky a oblečenie študentov je potrebné uložiť do skriň mimo laboratória.
3. V laboratóriu sa nikdy neje, nepije a nefajčí.
4. Na jedenie a pitie (aj mimo laboratória) sa nikdy nepoužíva chemické sklo.
5. Chemikálie sa nikdy neochutnávajú a neinhaliujú sa ich výpary.
6. Práca s jedovatými, prchavými a páchnucimi látkami sa uskutočňuje iba v digestore so spustenou ventiláciou pod dozorom vyučujúceho.
7. Pipetuje sa výhradne pomocou balónikov alebo iných zdrojov podtlaku, nikdy nie ústami!
8. Pri práci pri podtlaku alebo pretlaku v sklenených aparátúrach sa používa iba nepoškodené (nie prasknuté) laboratórne sklo. Podtlakové časti aparatúry sa musia zakryť ochranným štítom.
9. Opravy alebo úpravy elektrickej inštalácie a prístrojov uskutočňuje iba osoba na to určená. V prípade nefunkčnosti zariadenia alebo jeho poruchy je potrebné toto hlásiť ihneď vyučujúcemu.
10. Pri práci so žieravinami a inými nebezpečnými látkami je potrebné pracovať veľmi opatrne, chrániť si tvár a oči ochranným štítom a ruky ochrannými rukavicami.
11. Na pracovisku sa udržiava vždy poriadok a čistota. Je nutné dbať na to, aby sa vonkajšie steny nádob alebo pracovné miesto nepostriekali chemikáliami.
12. Všetko laboratórne sklo, ktoré sa používa na prácu s chemikáliami a roztokmi, si musí študent vždy označiť viditeľne fixkou (najlepšie v hornej tretine laboratórneho skla).
13. Koncentrované kyseliny a zásady sa riedia tak, že kyselina alebo zásada sa leje tenkým prúdom po tyčinke do vody za súčasného miešania a chladenia, nie naopak.
14. Pri uskutočňovaní pokusov v skúmavkách sa drží ústie skúmavky odvrátené od tváre (svojej i spolupracovníkov).
15. Pri práci s horľavinami nesmie byť v blízkosti otvorený oheň. Pri destilácii horľavín je potrebné z okolia odstrániť zásobné nádoby horľavín a kontrolovať prietok vody v chladiči. Horľaviny nikdy nezahrievajte priamym plameňom, používajte kúpele (vodný alebo olejový) alebo ohrevné hniezda.
16. Zvýšenú pozornosť je potrebné venovať hlavne manipulácii s horľavinami I. triedy, ktoré majú teplotu vzplanutia do 21 °C (acetón, éter, metanol, etanol, benzín, benzén a toluén).
17. Črepiny a iné odpadky s ostrými hranami musia byť odkladané do nádob zvlášť k tomu určených, nikdy ich nehádzte do smetného koša.
18. Zvyšky jedov a organických rozpúšťadiel sa likvidujú podľa pokynov vyučujúceho. Zvyčajne sa zlievajú do zásobných fliaš na to určených a nikdy nie do umývadlovej výlevky.
19. Pri práci s éterom sa dbá na bezpečnostné opatrenia (možnosť vznietenia i od horúcich súčastí iných prístrojov).

20. So spotrebným materiálom, chemikáliami a prístrojmi musí študent zaobchádzať opatrne a šetrne.
21. V prípade rozbitia ortuťového teplomeru ohláste túto skutočnosť ihneď vyučujúcemu. Všetky zvyšky teplomera sa zlikvidujú podľa pokynov vyučujúceho. Ortuť sa skladuje v uzatvorenej nádobe s vodou a zneškodňuje sa ako jed.
22. Ak vypukne požiar, je každý povinný pokúsiť sa ho uhasiť vlastnými silami bez ohrozenia vlastného života a života spolupracovníkov (hasiacim prístrojom, improvizovanými hasiacimi prostriedkami) a zároveň študent hlási túto skutočnosť ihneď vyučujúcemu. Je nutné ďalej vypnúť elektrický prúd a pokúsiť sa odstrániť z okolia požiaru horľavé látky (hlavne kvapaliny) a nádoby so stlačenými plynmi. Ak sa nedá požiar uhasiť vlastnými silami, je potrebné okamžite zavolať pomoc (tel. číslo 150 alebo 112).
23. V prípade nehody okamžite informujte vyučujúceho a zranenému sa poskytnie prvá pomoc. Vedúcemu cvičenia je treba hlásiť i každé nepatrné poranenie, bolesti hlavy, hučanie v ušiach, nevoľnosť a pod. Vo všetkých prípadoch je nutné spísať protokol o poranení, pre prípad neskorších komplikácií.
24. Po skončení práce v laboratóriu zanecháva študent čistý a uprataný pracovný stôl. Všetky použité chemikálie a roztoky sú buď uskladnené po ukončení práce v zásobných fľašiach alebo správne zneškodnené.
25. Po ukončení práce v laboratóriu je nutné si umyť ruky.

Kontrolné otázky

1. Čo je zakázané robiť v laboratóriu?
2. Kde sa v laboratóriu pracuje s jedovatými, prchavými a páchnucimi látkami?
3. Ako sa pipetujú roztoky?
4. V piatich bodoch popíšte ako bezpečne pracovať v chemickom laboratóriu.
5. Ako sa riedia koncentrované kyseliny a zásady?
6. Aké zásady platia v laboratóriu pri práci s horľavinami?
7. Ako sa v laboratóriu odstraňujú zvyšky organických rozpúšťadiel?
8. Ako sa treba zachovať v prípade rozbitia ortuťového teplomera?
9. Aké pravidlá platia v biologickom laboratóriu pri požiaroch?
10. V akom stave zanecháva študent svoje pracovné miesto po ukončení práce v biologickom laboratóriu?

PRVÁ POMOC PRI NEHODE

Pri poleptaní kože silnou zásadou alebo kyselinou sa zasiahnuté miesto ihneď dôkladne opláchne prúdom vody. Pri poleptaní kyselinou sa neutralizuje miesto roztokom hydrogénuhličitanu sodného (NaHCO_3 ; 20 g/l; w/v), pri poleptaní zásadou zriedenou kyselinou octovou (CH_3COOH ; 5 g/l; v/v).

Pri zasiahnutí oka chemikáliami sa ihneď oko vypláchne slabým prúdom vody. V prípade zasiahnutia oka zásadou, oko sa vypláchne bórovou vodou (roztok kyseliny boritej, H_3BO_3 ; 30 g/l). Ak sa jedná o kyselinu, použije na výplach roztok boraxu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; tetraboritan sodný; 20 g/l; w/v). V každom prípade je nutné vyhľadať očného lekára.

Pri poleptaní sliznice v ústach sa uskutoční dôkladný výplach úst vodou a následne neutralizácia výplachom zriedenou kyselinou octovou (poleptanie zásadou) alebo hydrogénuhličitanom sodným (poleptanie kyselinou).

Po požití zásady (NaOH ; KOH a pod.) sa odporúča piť zriedenú kyselinu octovú (0,5 – 2,0 g/l; v/v), po požití kyseliny sa pije suspenzia oxidu horečnatého alebo hydroxidu hlinitého vo vode. Po požití jedov je charakter prvej pomoci špecifický, podľa druhu otravy, odporúča sa vypiť aspoň 0,5 l vody a vyvolať zvracanie. Je vždy nutné vyhľadať odborné lekárske ošetrovanie a informovať zároveň vyučujúceho.

Horiaci odev sa hasí prikrývkou alebo vodou. Pri likvidácii väčších plameňov sa použije hasiaci prístroj. Pri malých popáleninách je nutné ošetriť postihnuté miesto masťou na popáleniny a zakryť sterilným obvazom. Väčšie popáleniny ošetrí lekár.

Pri porezaní sklom je potrebné odstrániť z povrchovej rany sklo, okolie dezinfikovať zriedeným roztokom peroxidu vodíka (H_2O_2 ; 3 %; v/v) a obviazať sterilným obvazom. Väčšie zranenia ošetrí lekár.

Kontrolné otázky

1. Ako postupovať pri podávaní prvej pomoci pri poleptaní kože silnou kyselinou?
2. Ako postupovať pri podávaní prvej pomoci pri poleptaní kože silnou zásadou?
3. Ako postupovať pri podávaní prvej pomoci pri zasiahnutí oka zásadou alebo kyselinou?
4. Ako postupovať pri podávaní prvej pomoci pri požití zásady alebo kyseliny?
5. Ako postupovať pri podávaní prvej pomoci pri požití jedov?
6. Kedy sa odporúča piť suspenzia oxidu horečnatého vo vode?
7. Ako sa hasí v biologickom laboratóriu horiaci odev?
8. Ako sa ošetrujú v biologickom laboratóriu popáleniny?
9. Ako sa treba zachovať v biologickom laboratóriu pri porezaní sklom?

NEBEZPEČNÉ LÁTKY V BIOLOGICKOM LABORATÓRIU

Amoniak (NH_3) je značne prchavý. Pary leptajú sliznicu a vo vysokých koncentráciách môžu pôsobiť smrteľne. Postihnutý potrebuje úplný pokoj a pobyt na čerstvom vzduchu. Pri nadýchaní, či požití, je nutné podávať veľké množstvo vody s octom alebo citrónom, neskôr olivový olej s kúskami ľadu. S amoniakom sa v laboratóriu pracuje vo forme hydroxidu amónneho (HN_4OH) a vždy opatrne a v zapnutom digestore.

Chlór (Cl_2 , za normálnej teploty plyn) a **bróm** (Br_2 , za normálnej teploty kvapalná látka) silne leptajú dýchacie orgány. Ich účinky sa prejavujú až po niekoľkých hodinách (kašeľ, dusenie). Postihnutý sa preniesť na čerstvý vzduch, zaistiť pokoj, nenúti sa ho dýchať zhlboka a nikdy sa neposkytuje umelé dýchanie. Je možné vdychovať vodnú paru s amoniakom alebo etanolom, či 2 % (w/v) roztokom sódy. Asanácia rozliateho brómu sa uskutočňuje tiosíranom.

Kyanovodík (HCN) a **kyanidy** (CN^-) sú prudko jedovaté látky mandľového zápachu. Pary kyanovodíka spôsobujú i v nízkych koncentráciách okamžitú smrť. Plyn preniká pokožkou. Pri práci s kyanovodíkom sa vždy používa plynová maska. Pri otrave je nutná okamžitá lekárska pomoc. Dlhodobá sa zavádza umelé dýchanie, poprípade sa zabezpečí vdychovanie kyslíka. Kyanidy pôsobia ako inhibítory dýchacieho reťazca mitochondrií. Smrteľná dávka je zhruba 200 mg. Pri otrave je potrebné okamžite vypláchnuť žalúdok a vyvolať zvracanie, pričom sa podáva zriedený peroxid vodíka. Injekčne sa podáva metylénová modrá a tiosíran. Pary kyanovodíka sa uvoľňujú v kyslom prostredí z kyanidov.

Oxid uhľnatý (CO) je prudko jedovatý plyn, ktorý nie je možné zistiť čuchom. Vytláča kyslík z väzobných miest na hemoglobíne. Už po krátkom čase vdychovania otupuje a spôsobuje smrť zadusením. Postihnutého je potrebné vyniesť na čerstvý vzduch a zavádza sa umelé dýchanie s inhaláciou kyslíka.

Nitrózne plyny (napr. oxid dusnatý, NO ; oxid dusitý, N_2O_3 ; oxid dusičitý, NO_2 ; oxid dusičný, N_2O_5) môžu spôsobiť i pri vdýchnutí malého množstva smrť. Postihnutého je treba nechať vdychovať voľne kyslík a privoniať amoniak vo forme hydroxidu amónneho. Nezavádza sa umelé dýchanie a je potrebné zabezpečiť absolútny pokoj.

Oxid siričitý (SO_2) vyvoláva pri vdychovaní kŕčovitý kašeľ. Pri nízkych koncentráciách nemá pach, ale pri veľmi vysokých koncentráciách má ostrý štiplavý zápach. Postihnutého je potrebné preniesť na čerstvý vzduch, popr. ho nechať vdychovať pary etanolu alebo kyslík.

Sulfán (sírovodík; H_2S) je prudko jedovatý plyn. Je to bezfarebný plyn s charakteristickým zápachom po skazených vajciach a odpornou chuťou. Pri nadýchaní je potrebné postihnutého ihneď vyniesť na čerstvý vzduch. Ak dôjde k otrave a sťaženiu dýchania, je nutné okamžite inhalovať kyslík a zavádzať umelé dýchanie i pri zdanlivej smrti.

Ortuť (Hg) je jedovatá nielen vo svojich zlúčeninách, ale i v parách a prachu. Pri otrave je potrebné podávať prostriedky na zvracanie (mydlová voda) a vypláchnuť žalúdok. Potom podávať bielok v mlieku, vodnú suspenziu horčička s mandľovým olejom, prípadne roztok tanínu. Pri rozliatí asanovať malé kvapôčky sírnym kvetom (prášková forma síry) alebo pozbierať mosadzným plieškom. Pri rozbití ortuťového teplomeru je nutné vždy riadne odstrániť všetku ortuť z prostredia, nakoľko môže spôsobovať v laboratóriu dlhodobé otravy.

Olovo (Pb) je nebezpečné v parách a jeho zlúčeniny spôsobujú dlhodobu chronickú otravu, tzv. saturnizmus. Po požití je treba podávať veľké množstvo roztoku síranu horečnatého (MgSO_4), vyvolať zvracanie a potom podávať mlieko a vodu s bielkom. Po práci s kovovým olovom je nutné si vždy poriadne opláchnuť ruky.

Metanol (CH_3OH) pôsobí škodlivo tak vdychovaním pár, ako aj požitím. V prvej fáze vyvoláva opojenie, neskôr kŕče. Väčšie dávky spôsobujú trvalé oslepnutie a smrť. Na rozdiel od etanolu sa veľmi dobre vstrebáva pokožkou. Pri práci s metanolom sa preto vždy pracuje v ochranných rukaviciach. Pri požití metanolu sa ako antidotum (protijed) podáva etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), ktorý je oveľa lepším substrátom pre ľudskú alkoholdehydrogenázu a zabraňuje tak tvorbe toxického formaldehydu (HCHO) z metanolu.

Silné kyseliny, zásady, ale aj koncentrované roztoky amoniaku, fenolu, peroxidu, brómu a i. sú žieravé látky, preto je s nimi potrebné pracovať veľmi opatrne. Ak je to možné s každou z takýchto látok pracujeme v zapnutom digestore a manipulujeme v gumových rukaviciach, prípadne tvár chránime okuliarmi alebo štítom. Už malé kvapôčky vznikajúce pri nepatrnom prelievaní spôsobujú popáleniny a poškodzujú oči. Preto sa pri prelievaní používajú lieviky a kvapalina sa vždy leje po tyčinke. Vždy sa dbá na to, aby sa nepoškodil štítok s názvom chemikálie (nádoba sa drží štítkom smerom k dlani) a nezanechalo sa malé množstvo obsahu na vonkajšom povrchu nádoby. Spravidla sa otvor nádoby pre istotu utrie kúskom buničiny alebo filtračného papiera.

Benzén, toluén a naftalén (C_6H_6 , C_7H_8 , C_{10}H_8) pôsobia škodlivo na červené krvinky. Pri požití sa vyvoláva zvracanie. Je nutný pokoj, popr. umelé dýchanie.

Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) je značne toxická látka leptajúca kožu, ktorou sa rýchlo vstrebáva a spôsobuje celkovú intoxikáciu. Postriekaná koža sa oplachuje 25 % (v/v) etanolom alebo glycerolom. Pri práci s fenolom sa vždy pracuje v rukaviciach.

Zvlášť nebezpečnou skupinou látok, s ktorými je možné sa v biologickom laboratóriu stretnúť, sú látky **mutagénne** a **karcinogénne**. Ich nebezpečnosť spočíva v tom, že nespôsobujú akútnu otravu, ale dlhodobým pôsobením môžu vyvolať nádorové ochorenie. Pri práci s týmito látkami sa pracuje vždy podľa daných predpisov a s ochrannými pomôckami. Medzi karcinogény, ktoré sa často používajú v biochemickom laboratóriu, patrí **benzén** (C_6H_6), **styrén** (C_8H_8), **chloroform** (trichlórmetán, CHCl_3), **etídiumbromid** ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$) a **akrylamid** ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$).

Pri práci s **infekčným materiálom** je nutné zachovávať všetky hygienicko-preventívne opatrenia, aby nedošlo k nákaze. Za potenciálne infekčný materiál je nutné považovať všetky telesné tekutiny (moč, sliny, krv) a živočíšne tkanivá, prípadne extrakty z nich pripravené.

Kontrolné otázky

1. Ako sa v biologickom laboratóriu pracuje s amoniakom a prečo?
2. Ako sa asanuje vyliaty bróm?
3. Aké sú negatívne účinky kyanovodíka na ľudský organizmus?
4. Je oxid uhoľnatý toxický pre ľudský organizmus? Ak áno, prečo?
5. Môžu byť nitrózne plyny pre ľudský organizmus škodlivé?

6. Aké postupy platia pri asanácii ortuti v biologickom laboratóriu?
7. Aký je vplyv metanolu na ľudský organizmus?
8. V čom spočíva nebezpečenstvo mutagénnych a karcinogénnych látok?
9. Vymenujte aspoň tri karcinogénne látky v biologickom laboratóriu.
10. Ako sa postupuje pri práci s infekčným materiálom a čo všetko sa za infekčný materiál môže považovať?

LABORATÓRNY DENNÍK

Laboratórny denník je určený na zachytenie všetkých aspektov uskutočňovaného experimentu. Pre lepšiu orientáciu v ňom je vhodné, aby jednotlivé stránky v denníku boli číslované. Do laboratórneho denníka je potrebné pred uskutočnením laboratórneho cvičenia napísať domácu prípravu z poskytnutých podkladov, ktorá sumarizuje všetky informácie potrebné na bezproblémový priebeh laboratórneho cvičenia, vrátane cieľa práce, postupu spísaného vo forme textu, blokovej schémy alebo odrážok, výpočtov potrebných na prípravu všetkých roztokov a reagensí nutných pre vykonanie samotného cvičenia, s uvedením ich predpokladanej spotreby (aj tých, ktoré sú v laboratóriu pripravené) a návrh tabuliek na zaznamenanie plánovaných výsledkov, ktoré je počas cvičenia cieľom namerať. **Bez tejto prípravy nebude možné cvičenie absolvovať.**

Do laboratórneho denníka sa počas experimentu zaznamenáva pozorovanie, parciálne výsledky, výpočty a závery vyplývajúce z daného experimentu. Študent sa nespolieha na pamäť a rôzne lístočky (prípadne plášt'), kam zapisuje priebežne namerané údaje alebo pozorovania.

PRACOVNÉ PROTOKOLY

Protokol vypracováva každý študent samostatne a odovzdáva ho vždy do týždňa (pred vypracovaním ďalšej úlohy). Protokol študent vypracuje na voľné listy papiera formátu A4 podľa prílohy. Je vhodné protokol tlačiť farebne a obojstranne. Protokol by mal byť stručný, výstižný a prehľadný, bez zbytočných duplicit a mal by obsahovať nasledujúce časti:

- 1. Titulná hlavička** – podľa vzoru v prílohe obsahuje základné informácie ako názov predmetu a cvičenia, školský rok, dátum laboratórneho cvičenia, meno a študijný odbor študenta a podobne.
- 2. Cieľ práce** – presná definícia, čo je cieľom danej práce, cvičenia, čo chceme cvičením dosiahnuť, zistiť.
- 3. Teoretický úvod** – stručne, jasne ozrejmiť čitateľovi teoretickú časť experimentu.
- 4. Laboratórne pomôcky** – uviesť všetky pomôcky (laboratórne sklo, porcelán, plastový spotrebný materiál a pod.), ktoré boli potrebné pre realizáciu laboratórneho cvičenia ako aj objekty skúmania (semená, kvety, rastlinné pletivá, živočíšne tkanivá, rastlinné alebo živočíšne orgány, suspenzné kultúry, embryá).
- 5. Chemikálie** – uviesť všetky chemikálie, ako aj použité množstvá, ktoré boli potrebné pre realizáciu laboratórneho cvičenia.
- 6. Pracovný postup** – podrobne vlastnými slovami (v minulom čase, množnom čísle) popísať čo a ako bolo v skutočnosti vykonané, vrátane odchýlok od návodu, presných návažok, použitých prístrojov, pomôcok, podmienok merania a podobne – teda tak, aby bolo možné podľa protokolu experiment presne reprodukovať. Je nutné dodržať počet platných desatinných miest – návažok 0,1 g nie je to isté ako 0,10 g!
- 7. Výpočty** – návažky, riedenie roztokov, príprava roztokov a podobne nutné k postupu (vrátane vzťahov a vzorcov potrebných pre spracovanie nameraných hodnôt).
- 8. Výsledky** (+ ich vyhodnotenie, grafy) – (iba) to, čo bolo pozorované alebo namerané, prípadne, čo študent z nameraných hodnôt vypočítal (teda NIE ako sa experiment „mal vyvíjať“, to bude súčasť diskusie). Výsledky sa uvádzajú čo najprehľadnejšie, najlepšie formou tabuľky, obrázkom a prípadne iným grafickým znázornením.

Tabuľky

- Názov tabuľky je vždy nad samotnou tabuľkou a z popisu k tabuľke je zrejmé, aké údaje tabuľka obsahuje.
- Každá tabuľka je číslovaná a v texte protokolu musí byť odvolanie sa na príslušnú tabuľku pri interpretácii výsledkov. Pokiaľ sa na tabuľku neodkazuje v texte, tak je v protokole zbytočná.
- Tabuľka musí obsahovať hlavičku, v ktorej je jasne definované, akú údaje sa v tabuľke nachádzajú. Dôležité je uvádzať pri všetkých hodnotách aj jednotky.

Grafy a obrázky musia mať všetky potrebné náležitosti:

- Názov, z ktorého je presne zrejmé, bez potreby čítania ďalšieho textu protokolu, čo obrázok alebo graf znázorňuje.
- Názov grafu/obrázku a bližší popis grafickej závislosti sa uvádza vždy pod grafom/obrázkom.

- Súradnicové osi s riadnym popisom, t. j. označenie nanášanaj veličiny, vrátane príslušnej jednotky (na osi x nezávisle premenná (veličina, ktorú experimentátor sám mení – napr. koncentrácia roztoku), na osi y závisle premenná (veličina, ktorá závisí od zvolenej nezávislej premennej - napr. absorbanca).
 - Meradlo, t. j. rovnomerne vynesená stupnica v lineárnom rozsahu (ak nie je nutné iné). Pri zostrojovaní grafu sa volí na osiach vhodný rozsah (napr. keď sa pracuje v zásaditej oblasti pH, t. j. v rozsahu 7 - 11, je nezmyselné, aby os začínala nulou), je teda vhodné využiť čo najväčšiu možnú plochu grafu pre zobrazenie danej závislosti.
 - Hodnotu vypočítanú/určenú z nameraných hodnôt je potrebné zaokrúhliť s ohľadom na presnosť použitých meracích metód. To znamená, že počet platných desatinných miest výsledku by mal rešpektovať najmenej presnú hodnotu zo všetkých, z ktorých do vzorca dosadzujete – napr. je nutné zväžiť, ako presná bola koncentrácia kalibračných roztokov, ako presné boli pipetované prídavky činidla. Zvyčajne sa tak uvádza výsledok na dve, tri, maximálne na štyri platné čísla.
- **Pozorovanie a diskusia** – zhodnotenie dosiahnutých výsledkov a vysvetlenie, čo z výsledkov vyplýva. Diskusiu tvorí aj konfrontácia pôvodne plánovaných postupov a realizovaných (zmeny spôsobené napr. nefunkčným prístrojom alebo inými použitými roztokmi) a porovnanie, nameraných alebo vypočítaných hodnôt s údajmi teoretickými získanými z literatúry alebo adekvátnych internetových zdrojov, teoreticky vypočítanými a podobne, vrátane odôvodnenia prípadných odchýlok.
9. **Záver** – stručná odpoveď na stanovený cieľ práce, teda čo z nameraných výsledkov vyplýva.

Kontrolné otázky

1. Čo je náplňou laboratórneho denníka?
2. Aké základné časti by mal obsahovať pracovný protokol? Vymenujte ich.
3. Na čo slúži v protokole teoretický princíp?
4. Definujte pojem „laboratórne pomôcky“ v protokole.
5. Na čo slúži v protokole pracovný postup?
6. Čo všetko musí obsahovať tabuľka?
7. Na koľko desatinných miest sa uvádza zvyčajne nameraný výsledok?
8. Kde sa píše názov grafu, príp. obrázku?
9. Na čo slúži v protokole diskusia?
10. O čom pojednáva záver?

ČISTENIE SKLA

Čistota laboratórneho skla je nevyhnutnou podmienkou bezpečnej a úspešnej práce v laboratóriu. Chemické nádoby sa čistia ihneď po práci, kým nečistoty a zvyšky chemikálií na stenách nezaschnú. Sklo sa pri umývaní drží pevne v dlani, pretože po navlhčení a použití detergentu je jeho povrch veľmi klzký. Spravidla postačujú postupy čistenia skla v laboratóriu známe z domácností (saponátový prostriedok a dôkladné opláchnutie vodou). V laboratóriu je nutné v poslednom kroku laboratórne sklo poriadne vypláchnuť destilovanou vodou. Ak na stenách zostali časti vo vode nerozpustných nečistôt, použijú sa mechanické čistiace pomôcky, akými sú kefy, útržky filtračného papiera alebo jemný piesok. Toto mechanické čistenie však nesmie sklo poškrabať, pretože i nepatrné škrabnutie môže spôsobiť pri zahrievaní prasknutie skla. Keď ani mechanické čistenie nevedie k odstráneniu nečistôt, prichádza na rad chemické čistenie. Na čistenie chemického skla je možné použiť rozpúšťadlo, ktoré čistý materiál neskoroduje a súčasne v ktorom je nečistota rozpustná. Najčastejšie sa využívajú v laboratóriu dostupné minerálne kyseliny. Pri čistení laboratórneho skla minerálnymi kyselinami je nevyhnutné dodržiavať bezpečnostné pokyny s tým súvisiace a používať ochranné pomôcky. Vysokú čistiacu schopnosť má tzv. kyselina chromsírová (zmes 200 ml nasýteného roztoku dichromanu draselného ($K_2Cr_2O_7$), 150 ml koncentrovanej kyseliny sírovej (H_2SO_4) a 100 ml destilovanej vody), ktorá dobre rozpúšťa organické látky a masnotu. Sklo sa do tejto zmesi namočí počas noci a ráno sa potom dôkladne opláchnie v roztoku detergentu, pod tečúcou vodou a nakoniec v destilovanej vode. Chromsírová zmes sa po čase vyčerpá, čo sa prejaví zeleným sfarbením (redukcia dvojchromanu na chromitý ión). Takáto zmes je potom málo účinná a musí sa pripraviť nová. V krajných prípadoch je možné použiť tzv. lúčavku kráľovskú (roztok kyseliny dusičnej (HNO_3) a kyseliny chlorovodíkovej (HCl) v pomere 1:3, v/v). Inou alternatívou je využiť na čistenie skla zásady. Príkladom môže byť zmes izopropanolu (2-propanol, izopropylalkohol, C_3H_8O) s hydroxidom sodným ($NaOH$). Vyčerpanosť čistiacej schopnosti tejto zmesi sa prejaví stmavnutím roztoku.

Kontrolné otázky

1. Popíšte postup čistenia laboratórneho skla.
2. Aký je význam chemického čistenia laboratórneho skla?
3. Aké chemické látky sa používajú na čistenie skla najčastejšie?
4. Ako by ste pripravili kyselinu chromsírovú a na rozpúšťanie akých nečistôt laboratórneho skla slúži predovšetkým?
5. O čom svedčí stmavnutie roztoku zmesi izopropanolu a hydroxidu sodného?

VODA V LABORATÓRIU

Vzhľadom na to, že obyčajná **vodovodná voda** obsahuje vysokú koncentráciu solí, je použiteľná iba čiastočne v biologickom laboratóriu a je absolútne nepoužiteľná pre biochemické pokusy. Používame ju iba vtedy, keď neprichádza do styku s ostatnými reagensiami ako rozpúšťadlo, napr. na chladenie alebo zahrievanie.

Základným spôsobom úpravy vody je destilácia. Väčšinou má každé laboratórium vlastný destilačný prístroj. **Destilovaná voda** postačí pre väčšinu biochemických operácií, ale pre niektoré špeciálne účely nie je jej čistota dostačujúca. Destilovaná voda obsahuje najmä niektoré katióny, ktoré sa do nej dostávajú zo súčastí destilačnej aparatury, skla a elektród. Jej kvalitu je možné zvýšiť opakovanou destiláciou (redestiláciou), ktorá sa uskutočňuje v špeciálnej aparatúre z kremenného skla neuvolňujúceho katióny.

Pre určité špecifické účely sa využíva **deionizovaná voda**. Príprava deionizovanej vody je založená na kombinácii niekoľkých separačných metód vedúcich k postupnému odstráneniu jednotlivých skupín kontaminantov. Súprava je väčšinou založená na čiastkových separátoroch odstraňujúcich hrubšie nečistoty (filtre), ióny (ionomeniče), nepolárne látky (adsorbent) a ako posledný býva zapojený membránový filter. Niektoré aparatury pracujú i na princípe reverznej osmózy. Jednotlivé filtre je však nutné po niekoľkých mesiacoch používania vymeniť, v dôsledku čoho nie je príprava deionizovanej vody lacnou záležitosťou. V prípade použitia deionizovanej vody v laboratóriách molekulovej biológie sa táto ešte sterilizuje v autokláve, nakoľko i malá kontaminácia v nej môže spôsobiť odchýlky v meraných parametroch.

Hlavným kritériom čistoty vody je jej špecifická vodivosť. Pri bežnej destilovanej vode sa pohybuje okolo hodnoty 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Deionizovaná voda máva túto hodnotu ešte o jeden rád nižšiu. Pripravená destilovaná či deionizovaná voda sa skladuje prevažne v plastových nádobách. Sklenené nádoby nie sú pre dlhodobejšie uskladnenie vhodné, pretože sa do vody spätne uvoľňujú niektoré katióny. Ak to podmienky dovoľujú, skladuje sa voda v chlade a v tme, čím sa zabráni možnej kontaminácii autotrofnými organizmami (organizmy, ktoré syntetizujú z jednoduchých minerálnych látok látky organické a teda môžu rásť a rozmnožovať sa aj v destilovanej vode).

Kontrolné otázky

1. Je vodovodná voda vhodná pre prácu v biologickom laboratóriu?
2. Kedy je vodovodná voda absolútne nepoužiteľná?
3. Aký je význam destilovanej vody v biologickom laboratóriu?
4. Ako sa zvyšuje kvalita destilovanej vody?
5. Kde sa využíva voda deionizovaná?
6. Je nutné deionizovanú vodu vždy sterilizovať v autokláve?
7. Ako sa pripravuje deionizovaná voda?
8. Na čo slúžia filtre pri príprave deionizovanej vody?
9. Čo je hlavným kritériom čistoty vody?

10. Ako skladujeme v biologickom laboratóriu destilovanú alebo deionizovanú vodu a prečo?

ZÁKLADNÉ OPERÁCIE V BIOLOGICKOM LABORATÓRIU

MERANIE HMOTNOSTI LÁTOK

Na stanovenie hmotnosti látok sa využívajú v chemickom laboratóriu **váhy**. Váženie je porovnávanie hmotnosti meraných pevných, prípadne kvapalných látok s hmotnosťou závažia.

Existujú dva rozdielne typy váh líšiac sa váživosťou, tzn. maximálnou hmotnosťou váženia a presnosťou stanovenia hmotnosti váženého predmetu:

1. **Technické váhy** - majú podľa daného modelu váživosť od 100 g do niekoľkých kilogramov. Presnosť nebýva väčšia ako 0,05 g.
2. **Analytické váhy** - majú váživosť obvykle do 100 g, prípadne 150 g a ich presnosť je rádovo 0,0001 g.

Na orientačné zistenie hmotnosti predmetov sa používajú tzv. **predvážky**. Slúžia na váženie predmetov s hmotnosťou do 200 g a pracujú s presnosťou 0,1 g. V súčasnosti sa používajú prevažne elektronické typy váh s digitálnym displejom.

Pre každé váženie platí základné pravidlo: chemikálie (kvapalné ani pevné) nesmú prísť do priameho styku s miskami váh. Váhy chránime pred akýmkoľvek stykom s agresívnymi látkami. Všetky manipulácie s chemikáliami (pridávanie a uberanie) sa uskutočňujú mimo váh. Prípadné nečistoty na váhach je potrebné okamžite odstrániť štetcom, pričom v prostredí váh je nevyhnutné pracovať veľmi citlivo.

Vážime podľa nasledovného postupu:

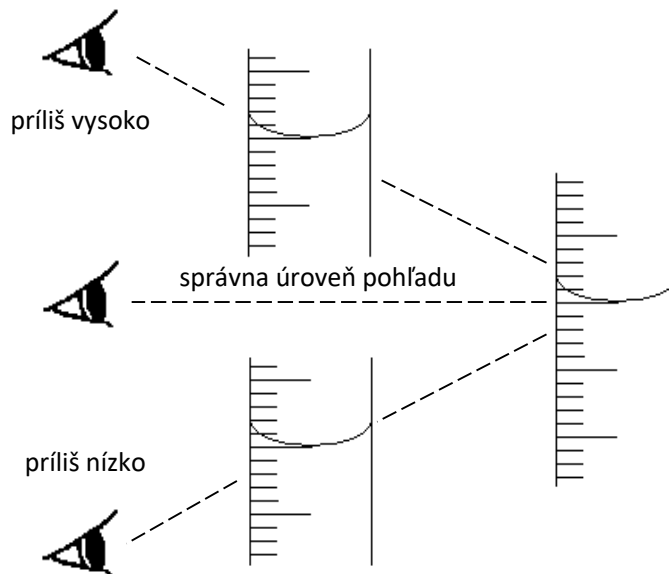
- I. Pred vážением skontrolujeme nulovú polohu váh.
- II. Vážený predmet kladieme opatrne do strednej časti misky váh.
- III. Váženú látku nekladieme nikdy priamo na miskú váh, ale použijeme navažovačku, porcelánovú lodičku, filtračný papier, hodinové sklíčko a podobne. Hygroskopické látky (schopné viazať molekuly vody z vonkajšieho prostredia) vážime na hodinovom sklíčku a podľa možnosti čo najrýchlejšie.
- IV. Na miskú váh nekladieme nečisté, mokré alebo horúce predmety. Horúce predmety vychladíme pred vážением v exsikátore.
- V. Po skončení váženia nastavíme nulovú polohu váh.
- VI. Váhy udržiavame vždy v maximálnej čistote.

MERANIE OBJEMU KVAPALÍN

Na odmeriavanie objemov kvapalín slúžia odmerné valce, pipety, byrety, pyknometre a odmerné banky.

Odmerné valce sa používajú len na približné odmeriavanie kvapalín. Na presnejšie meranie objemov sa používajú **pipety** (buď pre konkrétny objem alebo delené) a **byrety**, pri ktorých je možné kohútom alebo pomocou tlačky regulovať vytekanie kvapaliny. Pri plnení pipiet je treba vždy dbať na to, aby ústie pipety bolo stále ponorené pod hladinou kvapaliny. Pri jeho vynorení nad hladinu dochádza k nasatiu vzduchu do pipety, čo môže spôsobiť

i vniknutie pipetovanej kvapaliny do podtlakového zariadenia (zvyčajne gumeného balónika). Po nasatí kvapaliny do pipety nad rysku označujúcu požadovaný objem sa uzatvorí horný koniec pipety ukazovák – nie palcom. Opatrným uvoľňovaním prstu po kvapkách sa vypúšťa kvapalina. Pri odčítaní je nutné mať oko v rovnakej úrovni so značkou. Odčítava sa vždy spodný okraj menisku (Obrázok 1).



Obrázok 1: Odčítanie menisku pri pipetovaní.

Jedovaté kvapaliny a koncentrované kyseliny a zásady sa nenasávajú nikdy do pipety ústami, ale používajú sa špeciálne násadky či gumové balóniky. Keďže je pipeta kalibrovaná na vyliatie, nikdy sa nevyfukuje, ale jej obsah sa nechá iba voľne vyteciť a jej špička sa otrie o dno alebo stenu nádoby, do ktorej sa kvapalina pipetuje.

V súčasnej dobe sa v laboratóriu pracuje so sklenenými pipetami minimálne, prakticky úplne ich nahradili automatické pipety umožňujúce presnejšie a pohodlnejšie odmeranie daného objemu (Obrázok 2). Sú vhodné i pre pipetovanie mikrolitrových objemov. Automatické pipety sú vyrábané pre rôzne rozsahy objemov (1 – 10 ml, 1 – 5 ml, 100 – 1000 μ l, 20 – 200 μ l, 2 – 20 μ l a 0,2 – 2 μ l). Objem sa nastavuje otočením skrutky na stupnici a nasatie kvapaliny sa realizuje pohybom piestu automatickej pipety, čím sa vytvára nevyhnutný podtlak. Na rozdiel od sklenených pipiet pri pipetovaní automatickými pipetami je nevyhnutné používať plastové špičky s odpovedajúcim rozmerom a pipetovanou kapacitou. Pipetovaním roztoku bez použitia pipetovacích špičiek by mohlo dôjsť rýchlo k poškodeniu automatickej pipety aj v prípade vodných roztokov solí.

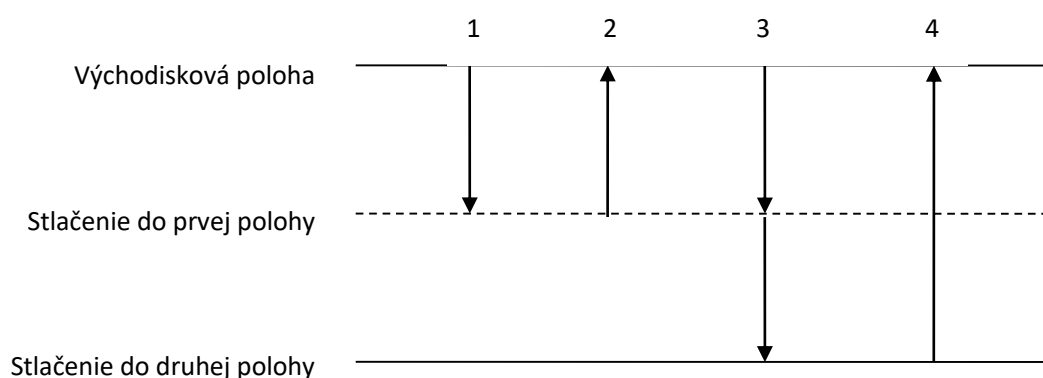
Pipety sa rozlišujú podľa prevedenia na jednokanálové alebo multikanálové. Jednokanálové pipety sú určené na pipetovanie vybraného objemu jedného roztoku, zatiaľ čo multikanálové pipety, ktoré najčastejšie konštruované ako osem- alebo dvanásťkanálové, sú určené pre súčasné pipetovanie rovnakého objemu roztoku paralelne, zvyčajne

do mikrotitračnej platničky. Každý kanál má svoj vlastný piest, preto nie je nutné používať všetky kanály, teda je možné nasadiť aj menej ako osem alebo dvanásť špičiek.



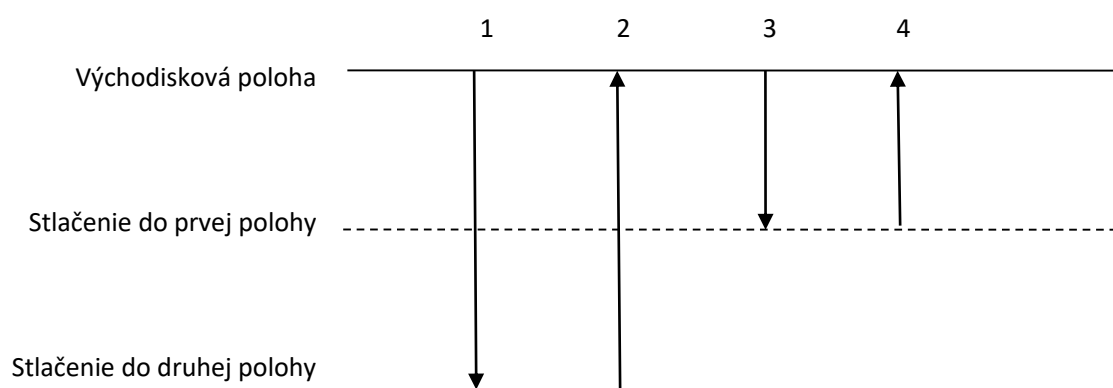
Obrázok 2: Automatické multikanálové a jednakanálové pipety.

Nasávanie a vypúšťanie kvapaliny cez nasaditeľnú špičku je ovládané piestom, ktorý má tri polohy – i) kľudovú, ii) pre nasávanie a iii) pre vypúšťanie. Najčastejšie používanou technikou pipetovania je priame pipetovanie. Pri priamom pipetovaní sa do špičky nasaje presne stanovený objem a v ďalšom kroku sa zo špičky vytlačí tento objem do pripravenej nádoby. Postup pipetovania je znázornený na Obrázku 3.



Obrázok 3: Polohy automatickej pipety pri nasávaní a vypúšťaní kvapaliny pri priamom pipetovaní. 1 – stlačenie piestu pipety do prvej polohy, 2 – nasatie daného objemu do špičky za postupného pomalého (!) uvoľňovania piestu, 3 – vytlačenie objemu zo špičky do reakčnej zmesi stlačením piestu do druhej polohy a 4 – vrátenie piestu automatickej pipety do kľudovej polohy pomalým uvoľnením piestu.

Pri pipetovaní malých objemov (do 50 μl) sa využíva zásadne reverzný mód pipetovania. Jedna kvapka vody predstavuje približne 33 μl , preto ani s najlepšou pipetou nie je možné vytlačiť z pipetovacej špičky úplne všetku kvapalinu, ktorej je menej ako jedna kvapka. Čím menší je pipetovaný objem, tým väčšia je relatívna chyba, ktorej sa dopustíte pri priamom (nereverznom) pipetovaní. Pri reverznom pipetovaní sa stláča piest pipety pri nasávaní tekutiny do druhej polohy a pri jej vytláčaní po prvú polohu. Takže po napipetovaní ostáva v pipetovacej špičke zvyšný objem tekutiny (Obrázok 4). Elektronické pipety umožňujú tiež tento spôsob pipetovania. Relatívna chyba je pri reverznom spôsobe pipetovania výrazne menšia.



Obrázok 4: Polohy automatickej pipety pri nasávaní a vypúšťaní kvapaliny pri reverznom móde pipetovania. 1 – stlačenie piestu pipety do druhej polohy, 2 – nasatie daného objemu do špičky za postupného pomalého (!) uvoľňovania piestu do kľudovej polohy, 3 – vytlačenie požadovaného objemu do reakčnej zmesi stlačením do prvej polohy piestu a 4 – vrátenie automatickej pipety do kľudovej polohy pomalým uvoľnením piestu, pričom v špičke zostáva časť kvapaliny.

Byrety slúžiace k regulovanému odberu kvapalín pri titráciách sú sklenené trubice označené objemovou stupnicou. Pred výtokom je umiestnený kohút alebo pružná hadička s tlačkou. Niektoré byrety majú pre lepšie odčítavanie objemu zadnú stenu z bieleho skla s modrým pruhom v strede.

Odmerné banky, podobne ako pyknometre (nádoby na stanovenie hustoty), sú kalibrované na naliatie. Hrdlo odmerných baniek je pomerne úzke, po celom obvode s ryskou. I tu je potrebné naplniť banku tak, aby sa spodný okraj menisku dotýkal rysky a pri plnení je potrebné mať oko na úrovni rysky. Podobne ako odmerné valce i odmerné banky sa vyrábajú v objemoch od 5 ml do 2 l. Odmerné banky sa používajú na prípravu roztokov s presnou koncentráciou. Vlastné zmiešavanie zložiek roztoku sa uskutočňuje pri nie celkom zaplnenej banke a až po úplnej homogenizácii zmesi (rozpustení a rovnomernom rozptýlení rozpúšťaných zložiek) a vyrovnaní teplôt (teplota, na ktorú je banka kalibrovaná, je uvádzaná na plášti banky – väčšinou 20 °C) opatrne sa dopĺňa rozpúšťadlom po rysku.

SEPARÁCIA LÁTOK

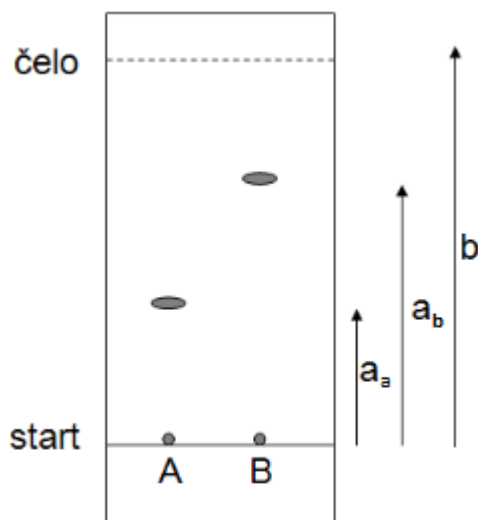
Separáčne metódy sa využívajú v biotechnológiách, farmácií, v toxikológií, pri analýze vzoriek potravín, životného prostredia a v ďalších oblastiach. Medzi separáčne metódy zaraďujeme elektroforetické, chromatografické, extrakčné, destilačné, solubilizačné, filtračné a ďalšie. Medzi často využívané metódy separácie látok patria **chromatografické metódy**. Chromatografia je fyzikálno-chemická metóda, v ktorej sa separované látky distribuujú medzi dve fázy, z ktorých jedna je nepohyblivá (stacionárna) a druhá sa pohybuje v definovanom smere (pohyblivá, mobilná).

Každý chromatografický systém sa skladá z troch základných prvkov:

- I. nepohyblivá (stacionárna) fáza - jednotlivé zložky z analyzovanej zmesi sú pútané fyzikálnymi a/alebo chemickými silami,
- II. pohyblivá (mobilná) fáza – unáša rozpúšťadlom zmes po stacionárnej fáze a k separácii látok zo zmesi dochádza na základe rôznej afinity látok k nepohyblivej (stacionárnej) a pohyblivej (mobilnej) fáze a
- III. samotné zložky analyzovanej vzorky.

Podľa skupenstva pohyblivej fázy sa chromatografia rozdeľuje na plynovú chromatografiu a kvapalinovú. Podľa usporiadania chromatografického systému chromatografiu delíme na kolónovú, tenkovrstvovú a papierovú. Podľa mechanizmu separácie delíme chromatografiu na adsorpčnú, rozdeľovaciu, iónovýmennú, gélovú permeačnú a afinitnú chromatografiu.

Tenkovrstvová chromatografia (TLC, z anglického Thin-Layer Chromatography) slúži na delenie zložiek zmesi na tenkej vrstve (stacionárna fáza) pomocou kvapalnej fázy (mobilná fáza). Ako sorbenty sa využíva silikagél, oxid hlinitý, celulóza, polyamid a ďalšie. Pri chromatografickom vyvíjaní je zmes unášaná mobilnou fázou po vrstve stacionárnej fázy, pričom jednotlivé zložky zmesi interagujú so stacionárnou fázou rôznou rýchlosťou, čím dochádza k ich oddeľovaniu. Prietok mobilnej fázy zabezpečujú kapilárne sily. Pri tomto type chromatografie sa používa na charakterizáciu a identifikáciu látok tzv. retardačný (retenčný) faktor (R_f). R_f je pomer vzdialenosti unášanej látky od štartu (a) ku vzdialenosti čela rozpúšťadla od štartu (b), teda $R_f = a/b$. Analyzované vzorky nanášame na štart chromatogramu v podobe roztoku vo vhodnom rozpúšťadle, ktoré by malo byť prchavé, aby sa ľahko odparilo z povrchu stacionárnej fázy. Koncentrácia vzorky sa volí podľa potrebného množstva látky, ktorá sa má na chromatogram naniesť. Minimálne množstvo látky na štart závisí od medze stanovenia. Maximálne množstvo nanesenej látky je dané rozpustnosťou látky v mobilnej fáze, v prípade voľby nevhodnej koncentrácie môže dochádzať k chvostovaniu vzorky na stacionárnej fáze, čo sa prejaví pruh tiahnucim sa od štartu. Nanášanie vzorky sa realizuje pomocou pipety. Jemne ju priložíme na štart a roztok necháme vsiaknuť do vrstvy, resp. papiera tak, aby sa utvoril krúžok s priemerom asi 5 mm, max. 1 cm. Po odparení rozpúšťadla zvyčajne nanášanie niekoľkokrát opakujeme, aby sme dosiahnu dostatočný objem vzorky. Jednotlivé vzorky sa nanášajú na štart vo vzdialenosti 1,5-2,5 cm medzi sebou a štart je zvyčajne vo vzdialenosti 1 cm od okraja.



Obrázok 5: Chromatogram s vyvinutými vzorkami A a B so znázornením vzdialenosti unášanej látky od štartu (a) pre látku A (a_a) a pre látku B (a_b) ku vzdialenosti čela rozpúšťadla od štartu (b) .

Vyvíjanie sa robí v širších a nižších komorách, prípadne vo väčších kadičkách v mierne šikmej polohe pod uhlom 20° tak, aby spodný koniec dosky zasahoval do mobilnej fázy. Komora sa prikryje sklenenou doskou alebo Petriho miskou. Nedostatočné nasýtenie komory parami rozpúšťadla má za následok okrajový efekt. Rad škvŕn tej istej látky nanosených vedľa seba sa javí ako prehnutá čiara vydutá smerom k štartu. Tento efekt sa dá odstrániť dôkladnejším nasýtením komory, napr. prilepením filtračného papiera, ktorý zasahuje do mobilnej fázy a k stenám komory. Po skončení vyvíjania sa vyberie chromatogram z komory, označí sa čelo mobilnej fázy a chromatogram sa vysuší vo vodorovnej polohe do vypychania zvyškov rozpúšťadla. Detekcia sa môže vykonať niekoľkými spôsobmi a to pomocou (i) priameho pozorovania škvŕn farebných látok viditeľných pri bežnom svetle (napr. rastlinné farbivá), (ii) pozorovanie látok absorbujúcich UV žiarenie, zväčša pri 256 nm, založené na adsorbentoch obsahujúcich fluoreskujúcu zložku, kedy po ožiarení UV svetlom dochádza k zhášaniu fluorescence stacionárnej fázy, čo sa prejaví ako tmavé škrvny na fluoreskujúcom podklade, (iii) prirodzená fluorescencia látok detegovaná pri UV žiarení (366 nm) (niektoré alkaloidy, polyfenoly, terpenoidy), (iv) špecifické farbenie vizualizáciou postrekom špecifickými činidlami, ktoré so separovanou látkou tvoria farebné produkty, (v) izotopové techniky založené na detekcii rádioaktívne značených látok pomocou rengenových filmov a podobných rádioizotopových metód a (vi) bioautografia detegujúca prítomnosť látky na základe jej biologickej aktivity (napr. identifikácia antioxidantov pomocou stabilného radikálu DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) a podobne.

TLC možno rozdeliť podľa charakteru nepohyblivej fázy do troch skupín na adsorpčnú TLC, konvečnú rozdeľovaciu a rozdeľovaciu chromatografiu s obrátenými fázami. Konvečná TLC sa podľa realizácie rozdeľuje na horizontálne alebo vertikálne usporiadanie chromatografickej vrstvy.

Kontrolné otázky

1. Ako sa rozdeľujú váhy líšiace sa váživosťou?
2. Na čo slúžia predvážky?
3. Uveďte rozdiel medzi odmerným valcom a odmernou bankou.
4. Na čo slúžia byrety?
5. Na čo slúžia automatické pipety?
6. Aký mód by ste použili pri pipetovaní 27 μ l roztoku? Vysvetlite.
7. Na čo slúžia v laboratóriu odmerné banky?
8. Ako by ste charakterizovali chromatografiu?
9. Ktoré tri základné prvky tvoria chromatografický systém?
10. Ako by ste vypočítali retardačný (retečný) faktor pri chromatografii?

MODELOVÉ ORGANIZMY

Modelový organizmus je nehumánny druh, ktorý je podrobne študovaný s cieľom porozumenia konkrétneho biologického javu s očakávaním, že objavy uskutočnené v modelovom organizme poskytnú prehľad o fungovaní aj iných živých organizmov. Štúdium modelových organizmov umožnilo významné objavy v genetike, bunkovej biológii, fyziológii, či medicíne. Vhodný modelový organizmus má väčšinou vlastnosti, ktoré zabezpečujú dostupnosť dostatočne reprezentatívnych výsledkov v rozumnom časovom horizonte. Modelové organizmy majú dobre známy a dobre charakterizovateľný pôvod a vyznačujú sa napr. krátkym životným cyklom a väčším počtom potomstva. Medzi ďalšie dôležité vlastnosti modelových organizmov patrí: i) ekonomická nenáročnosť jeho využívania (ekonomická nenáročnosť pri chove či pestovaní dostatočného počtu jedincov), ii) vhodnosť pre štúdium skúmaného problému, iii) schopnosť dostatočne a detailne preskúmať ho (dopredu vypracované a dostupné experimentálne techniky, sekvenovaný a popísaný genóm a podobne) a iv) vhodnosť pre techniky génového inžinierstva.

Spomedzi vírusov sú vhodnými modelovými organizmami λ -baktériofág, T4-baktériofág, vírus tabakovej mozaiky alebo SV40 (opičí leukemický vírus Simian). Spomedzi prokaryotických organizmov sú ako modelové organizmy najpoužívanejšie baktérie patriace medzi druhy *Escherichia coli* (gramnegatívna baktéria), *Bacillus subtilis* (grampozitívna baktéria) ako vhodný modelový organizmus na štúdium sporulácie, prípadne *Mycoplasma genitalium* (parazitujúca baktéria) na štúdium minimálneho genómu dostatočného pre život. Z eukaryotických modelových organizmov sú slizovky (*Dictyostelium*, čeľad *Dictyosteliidae*) vhodný nástroj určený na študovanie cytokinézy (delenie cytoplazmy pri bunkovom delení), pohyblivosti buniek, fagocytózy (proces využívaný bunkami slúžiaci k pohlcovaniu veľkých pevných častíc z okolitého prostredia), chemotaxie (pohyb organizmu v odozve na chemický stimul), tvorby štruktúr, bunkovej diferenciácie, signálnych transdukčných dráh, medzibunkovej komunikácie, vývoja mnohobunkového organizmu z jednotlivých buniek a podobne. Kvasinka pivná (*Saccharomyces cerevisiae*, čeľad *Saccharomycetaceae*) sa používa na kvasovanie sladu pri výrobe piva, na výrobu pekárenských kvasníc, na výrobu liehu a vitamínov skupiny B. Ako modelový organizmus sa využíva na štúdium bunkového a životného cyklu kvasiniek, výskum interakcií medzi proteínmi pomocou kvasinkového dvojhybridového systému a jeho modifikácií, na štúdium ľudských ochorení a na množstvo rôznych genetických a molekulárno-biologických štúdií.

Z rastlín medzi najznámejšie modelové organizmy patrí jednoznačne arábkovka Thalova (*Arabidopsis thaliana*), ktorá nachádza využitie v celom spektre odborov experimentálnej biológie rastlín, v anatómii a fyziológii rastlín začínajúc a končiac v molekulárnej biológii rastlín. Arábkovka Thalova je rastlina z čeľade kapustovité (*Brassicaceae*). Je to jednoročná alebo ozimná bylina dorastajúca do výšky 5 – 30 cm. Ako modelový organizmus pre genetiku bola táto rastlina vybraná preto, lebo je nenáročná a má krátky životný cyklus. Jej genóm v haploidnom stave obsahuje približne 142 miliónov párov báz. Má približne 25 000 génov, o zhruba o tretinu menej ako človek. Ich teloméry obsahujú sekvenciu TTAGGG. V roku 2000

sa stala prvou rastlinou so známym (osekvenovaným) genómom. Okrem toho napr. tabak (*Nicotiana benthamiana*), hrach (*Pisum sativum* L.), pšenica (*Triticum spp.*) alebo kukurica (*Zea mays* L.) sú celosvetovo študované modelové rastliny.

Spomedzi bezstavovcov je háďatko obyčajné (*Caenorhabditis elegans*, čeľad *Rhabditidae*) vhodný modelový organizmus na štúdium genetiky vývoja a predstavuje prvý mnohobunkový organizmus s osekvenovaným genómom. Nezmar (*Hydra spp.*, čeľad *Hydridae*) je nástroj na štúdium regenerácie. Drozofila obyčajná (*Drosophila melanogaster*, čeľad *Drosophilidae*) predstavuje vhodný modelový organizmus predovšetkým pre molekulárnu a evolučnú biológiu, genetiku a neurovedy. Jej genóm sa vyznačuje až 60 % zhodou s ľudským genómom. Za výskum s drozofilou (hlavne *D. melanogaster*, ale aj s inými druhmi) použitom ako modelový organizmus bolo udelených doposiaľ šesť Nobelových cien.

Myš domáca (*Mus musculus*, čeľad *Muridae*) a potkan (*Rattus norvegicus*, čeľad *Muridae*) patria medzi najvýznamnejších zástupcov modelových organizmov spomedzi stavovcov. Využívajú sa v biomedicíne a genetike, ale aj v iných biologických vedách. Okrem nich taktiež morča domáca (*Cavia porcellus*, čeľad *Caviidae*), králik domáci (*Oryctolagus cuniculus domesticus*, čeľad *Leporidae*), pes domáci (*Canis lupus f. familiaris*, čeľad *Canidae*) alebo šimpanzy (*Pan spp.*, čeľad *Hominidae*) sú vhodné nástroje na pozorovania a štúdium zákonitostí živých organizmov.

Pozorovaním modelových organizmov vhodnými vedeckými postupmi a metódami sa zhromažďujú o nich poznatky, ktoré slúžia na rozvíjanie vedomostí. K vedeckým metódam patrí **pozorovanie**, ktoré vychádza z pasívneho pozorovania určitého predmetu alebo javu za prirodzených podmienok, do ktorých nie je zasahované. Ak aktívne zasahujeme do podmienok, hovoríme o druhej vedeckej metóde a teda **experimente (pokuse)**. Pri experimente dochádza k zmene vybraného parametra, prípadne je možné nastaviť celkom nové podmienky a sledovať zmenu správania biologického systému voči prirodzeným podmienkam. Pred uskutočnením pokusu na základe pozorovania určitého javu je vhodné vysloviť domnienku (hypotézu), ktorá sa zvyčajne týka jedného javu alebo malej skupiny javov. Pokiaľ je možné nami vyslovenú hypotézu otestovať pomocou vedeckých metód, teda spomínaného pozorovania a experimentu, hovoríme o **vedeckej hypotéze**, ktorú na základe výsledkov vyvraciamе alebo potvrdzujeme. V súčasnosti je snahou skôr vyvracať pravdivosť určitej vyslovenej hypotézy, pretože jedno potvrdenie ešte neznamená jej všeobecnú platnosť, avšak jej vyvrátenie už znamená jej vážne spochybnenie. Pokiaľ sa však hypotézu nepodarilo vyvrátiť viacerými opakovanými pozorovaniami a nastavenými experimentami, hovoríme už o **vedeckom zákone**. Vedecký zákon je v súčasnom stave poznatkov pravdivá hypotéza, ktorá vyjadruje vzájomný vzťah medzi veličinami. Tento vzťah sa zvyčajne dá opísať matematicky, príkladom môžu byť Archimedov zákon alebo Lambert - Beerov zákon. Súhrn overených vedeckých hypotéz a zákonov sa nazýva **vedecká teória**. Vedecká teória sa zaoberá vysvetľovaním správania sa určitých javov, na rozdiel od vedeckého zákona, ktorý len popisuje ako sa určité javy za konkrétnych podmienok správajú. Vedecká teória je súhrn poznatkov o určitom jave v prírode overených množstvom experimentov.

Úloha č. 1: Zisťovanie klíčivosti malých semien

Teoretický úvod: Získanie rastlinného materiálu na ďalšie experimenty je možné dvoma spôsobmi: 1) priamo z prírody, čo má nedostatky, pretože materiál nie je presne definovaný a nie sú definované podmienky dopestovania a 2) materiál si vypestujeme v laboratóriu za konštantných, definovaných podmienok. Na vypestovanie rastlín používame semená. Semeno predstavuje ukončené ontogenetické (vývin rastliny od začiatku klíčenia semena po vytvorenie nových semien) štádium rastliny vo viac-menej latentnom stave. Najdôležitejšie endogénne faktory vplývajúce na klíčenie sú dobre vyzreté embryo v semene, dostatočne vysušené semeno, dostatočne rozrušené obaly semien za účelom priepustnosti pre molekuly vody a plyny a odstránenie inhibítorov klíčenia. Takými inhibítormi môže byť napr. fytohormóny kyselina abscisová a amygdalín, ktoré umelo odstraňujeme exstirpáciou (odstránenie endospermu). V endosperme sa zvyčajne vyskytujú inhibítory. Medzi exogénne faktory ovplyvňujúce klíčenie patria voda, kyslík, teplota a svetlo. Hydratácia semien je nevyhnutná na naštartovanie biochemických procesov súvisiacich s klíčením. Dostatočný prístup kyslíka ku klíčiacim semenám je limitujúcim faktorom klíčenia, pretože klíčiace semená intenzívne dýchajú, aby získali energiu vo forme ATP (adenozíntrifosfát, makroergická zlúčenina) na štiepenie látok zásobných pletív a na ich zabudovanie do vyvíjajúceho sa embrya. Vyvíjajúce sa embryo pri klíčení je heterotrofné, teda odkázané na štiepenie látok prítomných v zásobných pletivách, pričom dôležitú úlohu tu zohrávajú enzýmy ako napr. amylázy (štiepenie škrobu), lipázy (lipidy), proteínázy (proteíny). Často je v laboratórnej praxi potrebná sterilizácia semien kôli patogénom, ktoré obsahujú na povrchu a ktoré by mohli spôsobiť kontamináciu. Sterilizácia semien sa uskutočňuje roztokom chlórnanu sodného, peroxidu vodíka alebo inými látkami, napr. na báze ortute.

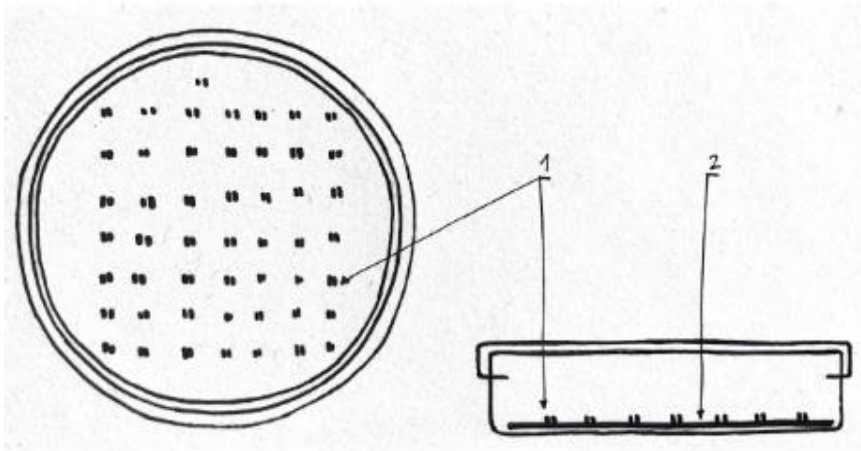
Objekt: semená reďkovky siatej (*Raphanus sativus* L.).

Pomôcky: 3 Petriho misky (priemer 50 mm), pinzeta, filtračný papier.

Postup: Semená necháme napučať vo vode 3 hodiny. Potom vodu zlejeme a semená prepláchneme. Do 3 Petriho misiek vystrihneme 3 kruhy filtračného papiera, do každej misky jeden, pričom papier vložíme do menšej (spodnej) misky a väčšou (vrchnou) miskou prikryjeme. Filtračný papier navlhčíme vodou tak, aby pri naklonení misky ostala kvapka vody na okraji. Do každej Petriho misky odpočítame 100 semien reďkovky a pomocou pinzety ich umiestnime do štvorca, na ktorého strane bude 7x2 semien. Dve zvyšné semená umiestnime v skupinke na ľubovoľnú stranu (Obrázok 6). Na povrch misky do okraja popíšeme dátum a variant prostredia. Misky umiestnime nasledovne: a) v laboratóriu na svetlo, b) v laboratóriu v tme, c) v chladničke. Počas pokusu kontrolujeme vlhkosť filtračného papiera a dopĺňame vodu podľa potreby.

Doba trvania: 50 min, klíčenie 7 dní.

Výsledok: Po 7 dňoch vyhodnotíme percento vyklíčených semien, opíšeme vplyv faktorov prostredia na habitus (celkový vzhľad) klíčencov, porovnáme vplyv svetla, tmy pri rovnakej (laboratórnej) teplote a chladu (4 – 8 °C) na percento vyklíčených semien.



Obrázok 6: Klíčenie malých semien v Petriho miske. 1 – semená, 2 – navlhčený filtračný papier.

Úloha č. 2: Exstirpácia embryí zo semien

Teoretický úvod: Pri niektorých pokusoch je nutné používať embryá zbavené endospermu. Takto upravené embryá sa používajú napr. pri pokusoch sledujúcich vplyv zásobných látok na klíčenie embrya, pri druhoch semien, ktoré obsahujú v endosperme inhibítory klíčenia, pri zakladaní pletivových kultúr *in vitro* a podobne. Endosperm predstavuje pletivo, ktoré vyživuje embryo v semene a je zásobáreň látok potrebných pre prvé fázy vývinu embrya pri klíčení (hlavnou zásobnou látkou je škrob, niekedy lipidy, v malej miere proteíny).

Objekt: semená kukurice siatej (*Zea mays* L.), hrachu siateho (*Pisum sativum* L.), pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.).

Pracovné pomôcky: Petriho miska, skalpel, pinzeta, filtračný papier.

Pracovný postup: Napučané (24 hodín) semená opláchneme vodou. Objasníme si vizuálne, kde sa nachádza embryo v semene a cca 1 mm okolo štítka (súčasť embrya) narežeme endosperm. Tlakom na endosperm štítok odstránime. Štítok jemne dočistíme od zvyškov endospermu, opláchneme destilovanou vodou a polovicu takto pripravených semien dáme klíčiť na vlhký filtračný papier v Petriho miske v laboratóriu na svetle. Druhú polovicu využijeme na Úlohu č. 3.

Doba trvania: 45 min., klíčenie 7 dní.

Výsledky: Po 7 dňoch vyhodnotíme percento vyklíčených semien zbavených endospermu a opíšeme vplyv rozdielneho vodného prostredia na percento vyklíčených semien a na habitus klíčencov.

Úloha č. 3: Príprava živného roztoku podľa Knopa

Teoretický úvod: Pri dlhodobom kultivovaní rastlín nestačí rastliny kultivovať len vo vode, ale je potrebný živný roztok obsahujúci základné biogénne prvky, prípadne pri dlhšej kultivácii i mikroelementy a stopové prvky. Živných roztokov existuje množstvo a pomenované sú zvyčajne podľa autorov, ktorí ich prví pripravili a popísali. Knopov živný roztok patrí k najčastejšie používaným a veľmi často sa využíva v hydroponických kultúrach. Hydropónia je pestovanie rastlín bez pôdy v živnom roztoku. Tento typ pestovania je vynálezom Egyptanov a jeho výhodou je rýchlejší rast rastlín a ich rýchlejšie zakoreňovanie, menšia náchylnosť rastlín k chorobám a presná kontrola skladby živín.

Pracovné pomôcky: odmerné valce, pipety, kadičky, sklená tyčinka, odmerná banka 1 l.

Pracovný postup: Pripravíme si 10 % zásobné roztoky, z ktorých do odmernej banky s objemom 1 l napipetujeme nasledovné množstvá na objem 1 l živného roztoku podľa Knopa.

8 ml 10 % (w/v) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

2 ml 10 % (w/v) KH_2PO_4

2 ml 10 % (w/v) MgSO_4

2 ml 10 % (w/v) KNO_3

1 ml 10 % (w/v) KCl

0,1 ml 10 % (w/v) FeCl_3

Roztoky postupne pridávame do 900 ml destilovanej vody v odmernej banke. Po pridaní roztokov doplníme objem banky po rysku destilovanou vodou. Polovicu exstirpovaných semien (Úloha č. 2) nasadíme na filtračný papier so živným roztokom podľa Knopa a necháme klíčiť v laboratóriu na svetle.

Doba trvania: 30 min, klíčenie 7 dní.

Výsledky: Po 7 dňoch vyhodnotíme percento vyklíčených semien, opíšeme vplyv rozdielneho vodného prostredia na percento vyklíčených semien a na habitus klíčencov.

Kontrolné otázky

1. Aké charakteristiky musí spĺňať modelový organizmus?
2. Vymenujte aspoň troch zástupcov modelových organizmov zo skupiny vírusov.
3. Aký je význam využívania drozofily ako modelového organizmu?
4. Ako by ste popísali modelový organizmus *Arabidopsis thaliana*?
5. Aké modelové organizmy by ste si vybrali na štúdium procesov bunkového delenia?
6. Ako by ste definovali hypotézu?
7. Čo je to vedecký zákon?
8. Vymenujte endogénne faktory ovplyvňujúce klíčenie rastlín.
9. Čo môže spôsobiť inhibíciu klíčenia embrya?
10. Aký je význam kyslíka pri klíčení embrya?

Zaujímavosť

Za prácu s drozofilami bolo udelených šesť Nobelových cien. Ako prvý ju získal Thomas Hunt Morgan, ktorý potvrdil, že gény sa nachádzajú na chromozómoch ako „korálky na šnúrke“ a že niektoré gény sa dedia spolu. Hermann Joseph Muller vystavil drozofily röntgenovým lúčom, spáril ich a pozoroval počet mutácií u potomkov. Jeho objav naznačil príčiny mutácií a preukázal, že röntgenové žiarenie spôsobuje mutácie génov a že bunky vajčiek a spermií sú obzvlášť náchylné na tieto genetické mutácie. Za tento objav mu bola udelená Nobelova cena. Nositeľia Nobelovej ceny z roku 1995 Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard a Eric F. Wieschaus použili drozofilu na pochopenie genetickej kontroly embryonálneho vývoja. V roku 2004 získali Nobelovu cenu Richard Axel a Linda Buck. Objavili veľkú rodinu 1 000 génov (3 % všetkých našich génov), ktoré kódujú asi 1 000 rôznych typov čuchových receptorov nachádzajúcich sa v konkrétnych bunkách vo vnútri nosa, pričom ako modelový organizmus využili okrem myši, potkanov aj drozofily. V roku 2011 Jules A. Hoffmann dostal Nobelovu cenu za svoj výskum aktivácie vrodenej imunity. Drozofily ako modelové organizmy boli využité na sledovanie vrodenej imunity, ktorá poskytuje všeobecnú ochranu pred bežnými patogénmi. V roku 2017 Jeffrey Hall, Michael Rosbash a Michael Young získali Nobelovu cenu za prácu na molekulárnych mechanizmoch, ktoré riadia cirkadiánne rytmy, pričom práca bola vykonaná do značnej miery experimentami na drozofilách.

RASTLINY AKO MODELOVÉ ORGANIZMY

ŠTATISTICKÉ HODNOTENIE BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Každý živý organizmus sa vyznačuje tým, že sa vo svojich detailoch odlišuje od všetkých ostatných organizmov toho istého taxónu. Je to základná črta všetkého živého a nazýva sa **premenlivosť**, čiže **variabilita**. Variabilita sa prejavuje v kvantite (výška, hrúbka, hmotnosť, počet a podobne) i v kvalite (prítomnosť alebo neprítomnosť) rozličných biochemických, cytologických, anatomických i morfológických znakov. Z tohto zdanlivo vyplýva, že správnu a presnú informáciu o určitom vybranom a pozorovanom znaku môžeme získať iba premeraním všetkých jedincov daného taxónu v celej jeho populácii. To je náročné a často neuskutočniteľné, preto sa z **populácie**, ktorá sa v štatistickom zmysle definuje ako množstvo jedincov (objektov), ktoré chceme pozorovať, vyberá vzorka. Vzorka predstavuje časť populácie, na ktorej sa robia konkrétne merania. Predpokladom presnosti a správnosti výsledkov pozorovaní je dostatočná „veľkosť“ a reprezentatívnosť vzorky, dostatočný počet pozorovaných jedincov. Príslušný znak sa teda študuje vo viacerých **opakovaníach** pokusu. Výsledkom pozorovaní je množstvo základných, od seba navzájom sa odlišných, údajov. Ak ich chceme úspešne využiť a pokus správne interpretovať, musíme ich štatisticky spracovať. Štatistickým spracovaním biologického materiálu sa zaoberá vedná disciplína nazvaná biologická štatistika alebo **biometrika**. Biometrika sa zaoberá exaktným hodnotením viacerých hodnôt získaných pri pozorovaní, resp. pokusoch s biologickým materiálom. Pomocou biometriky sa redukuje veľké množstvo základných údajov pokusu, vylučuje sa vplyv nekontrolovateľných faktorov a odstraňujú sa chyby vzniknuté variabilitou organizmov. V súčasnosti sa na spracovanie jednotlivých štatistických údajov využívajú počítače a špeciálne softvéry, čo veľmi urýchľuje spracovanie výsledkov. Často je však dostačujúci aj program Excell, ktorý je štandardnou súčasťou balíčka Microsoft Office alebo Office 365.

Pozorované **znaky** v hodnotenom súbore, vo vybranej vzorke (napr. počet vyklíčených rastlín, dĺžka nadzemnej časti vyklíčenej rastliny, dĺžka koreňa a podobne) predstavujú **štatistický súbor** a jednotlivé hodnoty štatistického súboru nazývame **štatistické premenné** a označujeme ich x_n ($x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$). Rozdiely v hodnotách jednotlivých štatistických premenných sú spôsobené premenlivosťou (variabilitou) biologického materiálu. Najvyššia a najnižšia nameraná hodnota premennej predstavujú **krajné** (extrémne) **hodnoty** – minimum a maximum. Prostredný člen súboru je **medián** ($Med(x)$ alebo \tilde{x}). Medián (stredná hodnota (znaku)) rozdeľuje postupnosť podľa veľkosti usporiadaných výsledkov na dve rovnako početné polovice. Zjednodušene by sa dalo povedať, že polovica hodnôt je menšia než medián a druhá polovica hodnôt je väčšia ako medián. Realita je však komplikovanejšia a súvisí s tým, či je počet prvkov párny alebo nepárny. Na nájdenie mediánu vybraného súboru stačí hodnoty usporiadať podľa veľkosti a zobrať hodnotu, ktorá sa nachádza v strede zoznamu. Párna postupnosť hodnôt však nemá "prvok uprostred". V tomto prípade sa to rieši tak, že sa vezmú oba prvky, ktoré sú takto uprostred a mediánom bude ich aritmetický priemer. Výhodou využitia mediánu je, že jeho výsledok nie je ovplyvnený, tak ako v prípade využitia aritmetického priemeru, nejakými extrémami v meraných hodnotách. Hodnota,

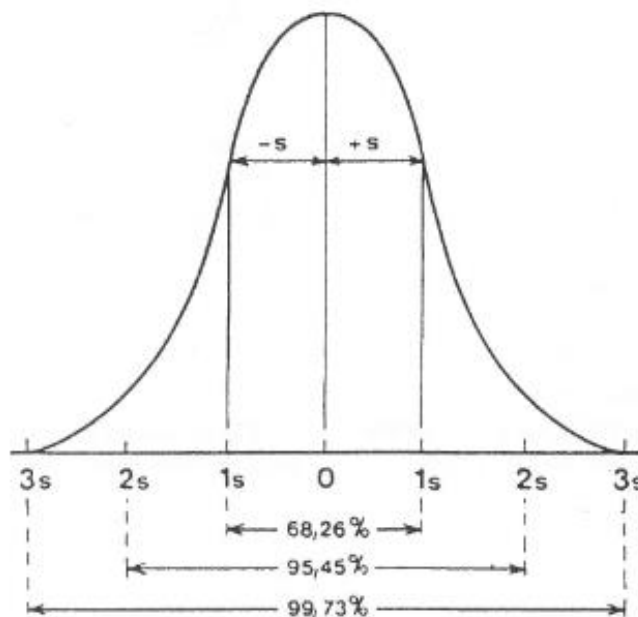
ktorá je v súbore najviac zastúpená, sa nazýva **modus** (D). Avšak najčastejšie používanou hodnotou, ktorou sa charakterizuje štatistický súbor, a predstavuje najlepší odhad najpravdepodobnejšej hodnoty meranej veličiny, je **aritmetický priemer** (\bar{x}). Je to hodnota získaná výpočtom a nemusí sa vždy vyskytnúť v štatistickom súbore. Aritmetický priemer (\bar{x}) sa vypočíta zlomkom, kde v čitateli je súčet všetkých štatistických premenných (x), v menovateli je ich počet (n).

$$\bar{x} = \frac{\sum(x)}{n}$$

Aritmetický priemer (\bar{x}) je dôležitou charakteristikou súboru, ale nedokonale charakterizuje celý súbor. Inú hodnotu aritmetického priemeru totiž vypočítame, ak použijeme dve štatistické premenné a inú v prípade, ak použijeme do výpočtu 10, 15, 20 a viac premenných. Na presnejšiu charakteristiku potrebujeme teda vyjadriť rozptyl jednotlivých štatistických premenných okolo aritmetického priemeru, na čo slúži **smerodajná odchýlka**. Označuje sa symbolom s , hoci sa v literatúre môžeme stretnúť aj s tými označeniami (napr. σ).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Význam a pojem smerodajnej odchýlky (s) je najlepšie vysvetliteľný na ideálnej premenlivosti znaku. Ideálny priebeh premenlivosti sa podobá **Gaussovej krivke**, ktorej hovoríme krivka normálneho rozdelenia. Smerodajná odchýlka (s) je vzdialenosť inflexných bodov krivky od jej osi súmernosti, kde sa nachádza priemer. V tomto ideálnom prípade sa rovná medián (\tilde{x}) priemeru (\bar{x}). Priemerná hodnota (\bar{x}) sa najčastejšie vyskytuje v štatistickom súbore, predstavuje teda aj jeho modus (D) (Obrázok 7).



Obrázok 7: Ideálny priebeh premenlivosti podľa Gaussovej krivky.

Ako je vidieť z Obrázku 6, smerodajná odchýlka (s) má vždy kladnú a zápornú hodnotu (\pm). V rozpätí $-3s$ až do $+3s$ sa nachádzajú prakticky všetky hodnoty Gaussovej krivky, teda ležia tu všetky prípady premenlivosti. Smerodajná odchýlka (s) takto spoľahlivo charakterizuje celý štatistický súbor. Na výpočet smerodajnej odchýlky (s) potrebujeme vypočítať varianciu (V). V čitateli je súčet štvorcov rozdielov jednotlivých štatistických premenných (x) a priemeru (\bar{x}) a v menovateli hodnota N , ktorá sa nazýva **počet stupňov voľnosti**.

$$V = \frac{\sum(x - \bar{x})^2}{N}$$

Pri výpočte ako prvé vypočítame rozdiely jednotlivých štatistických premenných a priemeru $x - \bar{x}$. Umocníme rozdiely jednotlivých štatistických premenných od priemeru na druhú $(x - \bar{x})^2$. Hodnoty spočítame. Na vypočítanie variancie delíme sumu štvorcov odchýlok počtom stupňov voľnosti N . Počet stupňov voľnosti $N = n - 1$, kde n je počet meraní. Variancia vychádza totiž z hodnôt **diferencie**. Diferenciu však môžeme dostať len v tom prípade, ak máme minimálne dve hodnoty. Pri dvoch hodnotách máme teda jednu diferenciu, pri troch hodnotách dve a podobne.

$$s = \sqrt{V} = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Ako ďalšiu potrebnú hodnotu vypočítame **strednú chybu priemeru** ($s_{\bar{x}}$). Táto charakterizuje presnosť zisteného aritmetického priemeru (\bar{x}). Každý priemer je vypočítaný z určitého, početne obmedzeného štatistického súboru (N). Keby sme vzali iný, početne obmedzený štatistický súbor toho istého materiálu, dostali by sme priemer, ktorý by bol veľmi blízko prvému priemeru, ale predsa trochu odlišný. Sledovaním veľkého počtu štatistických súborov by sme dostali aritmetické priemery (\bar{x}), ktorých hodnoty by sa pohybovali v určitom rozpätí. Toto rozpätie by bolo charakterizované príslušnou smerodajnou odchýlkou (s), ktorá sa nazýva stredná chyba priemeru ($s_{\bar{x}}$). V rozpätí trojnásobku strednej chyby priemeru ležia všetky existujúce hodnoty priemeru jednotlivých štatistických súborov, preto presne vymedzujú hodnotu zisťovaného priemeru. Vzorec na výpočet strednej chyby priemeru ($s_{\bar{x}}$) je:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n(n - 1)}}$$

Úloha č. 1: Výpočet základných štatistických premenných

Teoretický úvod: Štatistickým spracovaním nameraných dát porovnáme vplyv podmienok nakličovania rastlinných semien (svetlo, tma, teplo, chlad, výživa) na úspešnosť klíčenia a kvalitu nadzemnej a podzemnej časti naklíčených rastlín.

Objekt: Petriho misky so semenami nakličovanými pred 7 dňami.

Pracovné pomôcky: laboratórny zápisník, pero, ceruzka, pravítko, skalpel.

Pracovný postup: Na laboratórny stôl vyberieme jednotlivé Petriho misky, ktoré sme si pripravili v predchádzajúcom týždni. Na meranie budeme mať k dispozícii po jednej Petriho miske so 100 semenami nakličovanými v tme (uzatvorená skritka v laboratórnej miestnosti bez prístupu svetla), na svetle (na laboratórnej polici), v chlade (chladnička s teplotou cca 4 °C) a po dvoch Petriho miskách s extirpovanými semenami nakličovanými vo vode a v Knopovom živnom roztoku. V každej Petriho miske vypočítame počet vyklíčených semien. Zároveň zistíme najväčšiu a najmenšiu dĺžku koreňa a nadzemnej (zelenej) časti vyklíčených rastlín v každom variante. Následne si vyselektujeme náhodne 25 rastlín z každého variantu, kde budeme merať dĺžku koreňa a dĺžku nadzemnej časti. Namerané údaje z týchto dvoch znakov zapíšeme do tabuľky a štatisticky vyhodnotíme. Tabuľku zostavíme podľa vzoru nasledovne (Tabuľka 1):

Tabuľka 1: Výpočet základných štatistických hodnôt.

n	dĺžka nadzemných častí v cm (x)	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$
1			
2			
⋮			
n			
	Σ		Σ

Doba trvania: 90 min.

Výsledky: Štatisticky vyhodnotíme namerané dáta a porovnáme jednotlivé hodnotené varianty. Zaznamenáme v každom variante krajné hodnoty, medián, modus, aritmetický priemer, smerodajnú odchýlku a strednú chybu priemeru.

Kontrolné otázky

1. Ako by ste charakterizovali premenlivosť biologického súboru?
2. Na čo slúži biometrika?
3. Ako by ste charakterizovali v štatistike znak? Uvedte ľubovoľný príklad sledovaného znaku.
4. Čo je Gaussova krivka?
5. Aký je rozdiel medzi mediánom a aritmetickým priemerom?
6. Ako by ste vypočítali smerodajnú odchýlku?
7. Ako by ste vypočítali a na čo slúži stredná chyba priemeru?
8. Definujte počet stupňov voľnosti.
9. Aké štatistické hodnoty považujete za najdôležitejšie z hľadiska hodnotenia súboru?
10. Aký je význam používania Knopovho roztoku a čím sa líši od bežnej destilovanej vody?

Zaujímavosť

Náhoda nie je pojem výsostne matematický, ale nachádza praktickú aplikáciu v informatike, kde sa vďaka nej môžu vyriešiť zdanlivo neriešiteľné problémy. Typický problém v informatike je matematicky formulovateľný a pozostáva z nekonečného množstva konkrétnych prípadov problému. Úlohou je nájsť taký algoritmus, ktorý rieši každý z týchto prípadov. Mnohé problémy však pomocou súčasných vedomostí a výpočtovej techniky nevieme vyriešiť. Museli by sme ich odložiť na neskôr, nebyť náhody. Niekedy môže náhoda viesť k tomu, že výmenou určitých prvkov v algoritme dostaneme riešenie v priebehu niekoľkých sekúnd aj na bežnom počítači. Už starogrécky filozof Aristoteles povedal, že „náhoda je to, čo môže byť takým, ale aj niečím iným; to, čo môže nejakej veci patriť, ale aj nepatriť“. Na množstvo kľúčových vedeckých objavov sa prišlo úplnou náhodou, keď vedci skúmali niečo úplne iné. Napríklad LSD (dietylamid kyseliny lysergovej), sekundové lepidlo, mikrovlnná rúra, penicilín alebo nylon sa objavili úplne náhodou. Švajčiarsky chemik Albert Hofmann skúmal špecifický druh huby rodu *Claviceps* s cieľom vyrobiť pre farmaceutický priemysel látku stimulujúcu dýchací a obehový systém. Syntetizoval za týmto účelom dietylamid kyseliny lysergovej, známy pod názvom LSD. Bol prvým človekom, ktorý vyskúšal psychedelický účinok tejto látky počas cesty domov na bicykli. Pre potvrdenie svojej hypotézy užil vedome na druhý deň 250 mg LSD, pričom ďalšie pokusy robil na sebe i na kolegoch. Napísal viac ako 100 vedeckých článkov a kníh vrátane „LSD: Moje problémové dieťa“. Percy Spencer zase úplnou náhodou vďaka roztopenej čokoláde dostal nápad na skonštruovanie mikrovlnnej rúry. To ho prinútilo uvažovať, či by sa energia z rádiových vln dala využiť na varenie jedla. Známy je aj prípad škótskeho biológa a farmakológa Alexandra Fleminga, ktorý náhodou objavil hubu *Penicillium notatum*, ktorej metabolit zabíja baktérie a to najmä grampozitívne. V septembri 1928, pred odchodom na dovolenku, nechal náhodne ležať na stole misku s bakteriálnou kultúrou, konkrétne rodom *Staphylococcus*. Po návrate si všimol, že v miske vyrástla huba, okolo ktorej sa vytvoril kruh bez baktérií. Dôkazy o prvej kultúre, ktoré fotografoval, naznačovali, že pozoroval lýzu buniek baktérií. Ale niekedy opísal kľúčové pozorovanie ako príklad inhibície alebo prevencie rastu baktérií v oblastiach postihnutých hubou, čo potvrdzovala jasná inhibičná zóna. Aj keď sa tieto dva účinky vyskytujú za celkom odlišných podmienok, Fleming pravdepodobne zabudol, ktoré pozorovanie bolo skôr. Antibakteriálnu látku nazval penicilín podľa huby, ktorá ho produkovala. Sám si však význam svojho objavu neuvedomil. Až jeho kolegovia Howard Florey a Ernst Chain zistili, že penicilín je možné použiť ako terapeutický prostriedok na boj proti veľkému počtu bakteriálnych chorôb. Za tento objav dostali spolu s Alexandrom Flemingom v roku 1945 Nobelovu cenu.

METABOLIZMUS RASTLÍN

Rastliny sa vyznačujú autotrofným (auto = samo, trofia = výživa) spôsobom života. **Autotrofia** je schopnosť syntetizovať si potrebné organické látky, ktoré získavajú pomocou asimilácie, z anorganických látok. Primárnym produktom asimilácie sú sacharidy. Paralelnými syntézami vznikajú lipidy, proteíny, ako aj katalytické a regulačné organické látky. Autotrofné organizmy sú preto producentami organických látok. Energiu potrebnú pre tieto syntézy získavajú zo svetla (fotoautotrofné organizmy, rastliny) alebo z exergonických reakcií (chemoautotrofné organizmy). Chemoautotrofné organizmy tvoria organické látky z anorganických látok, pričom využívajú chemickú energiu, ktorú získavajú oxidáciou jednoduchých anorganických (sírovodík, vodíka) alebo organických (metán) látok. Sem patria hlavne mikroorganizmy, ktoré nemajú asimilačné farbivá. Zdrojom uhlíka je CO₂. Do tejto skupiny zahŕňame nitrifikačné, denitrifikačné, sírne baktérie, baktérie oxidujúce vodík alebo železo. **Heterotrofné** organizmy využívajú autotrofné na svoj život. Podľa druhu živín a spôsobu života medzi heterotrofy patria živočíchy, huby, človek. Heterotrofia je spôsob výživy organizmov, kedy základné, východiskové organické látky musia získavať z potravy.

Rastlinný organizmus je tvorený množstvom rôznych organických a anorganických látok. Tie sa v rastlinách neustále tvoria a zároveň menia v biochemických reakciách v závislosti od fyziologických funkcií rastliny. Látky, ktoré vznikajú v rastline, hoci to všeobecne platí pre všetky organizmy, je možné rozdeliť podľa pôvodu vzniku v metabolických procesoch na **primárne** metabolity a **sekundárne** metabolity. Medzi primárne metabolity zaraďujeme sacharidy, proteíny, lipidy a nukleové kyseliny a k sekundárnym metabolitom patria látky, ktoré sú odvodené od primárnych metabolitov prostredníctvom rôznych metabolických dráh a pre rastlinu nie sú životne dôležité, avšak rastlina ich potrebuje na prekonanie nepriaznivých podmienok. Tvorba sekundárných metabolitov je obvykle orgánovo, pletivovo, prípadne bunkovo špecifická. Mnohé z týchto látok sú pre rastlinu existenčne dôležité (napríklad farbivá, koenzýmy, bázy nukleových kyselín, fytohormóny). Chránia rastliny pred biotickým (baktérie, huby, nematódy, hmyz alebo pastva zvieratami) a abiotickým (vyššia teplota a vlhkosť, tienie, mechanické poškodenie alebo prítomnosť ťažkých kovov) stresom. Množstvo z nich sa považuje za produkty detoxikačných procesov, ktorými sa rastlina zbavuje reaktívnych odpadov metabolizmu, funkcia mnohých nie je jasná.

Z významných primárnych metabolitov rastliny môžeme spomenúť najmä sacharidy ako je celulóza a lignín. Samozrejme však rastlinný materiál je komplexný a obsahuje veľké množstvo primárnych metabolitov, avšak pre účely nasledujúcich laboratórnych cvičení si bližšie popíšeme tieto dva polyméry. Oba tieto sacharidy tvoria významnú zložku rastlinného materiálu, avšak percento ich zastúpenia je rôzne v závislosti od konkrétneho druhu rastliny. **Celulóza** je rastlinný polysacharid, ktorý je súčasťou stien rastlinných buniek. Makromolekula celulózy obsahuje viac ako 1000 stavebných jednotiek glukózy. Na rozdiel od škrobu a glykogénu je tu β -glykozidová väzba. Vzniká reťazec, ktorý má v prírodnom materiáli charakter dlhého nevetveného vlákna. Celulóza je hlavná stavebná látka rastlinných buniek a spolu s lignínom sa podieľa na stavbe sekundárných bunkových stien. V niektorých pletivách

sa tvorí čistá celulóza (bavlna), inde (napr. v dreve) je sprevádzaná inými látkami: lignínom, hemicelulózou a živcami. Celulóza je najrozšírenejším biopolymérom na zemi, ročne jej vzniká až $1,5 \times 10^9$ ton. Celulóza je nerozpustná látka. Pri reakcii celulózy s hydroxidom sodným a sírouhlíkom, vzniká xantogenan celulózy – medziprodukt na výrobu viskóзовého hodvábu a celofánu. Celulóza sa používa na výrobu papiera, obalových materiálov, hygienických potrieb a podobne. Je hlavnou živinou pre bylinožravcov a najrozšírenejšia organická látka na Zemi. Hemicelulóza patrí medzi heteropolyméry a na rozdiel od celulózy je zložená z rôznych monosacharidov ako je xylóza, manóza, galaktóza a ďalšie. V závislosti od druhu rastliny sa mení aj dominantné zastúpenie vybraného monosacharidy. Napríklad rastliny patriace medzi mäkké drevo majú najviac zastúpenú manózu a rastliny patriace medzi tvrdé drevo naopak xylózu. Ďalším významne zastúpeným primárnym metabolitom v rastlinách, je lignín. **Lignín** je heteropolymér zložený z fenolových (fenylpropanylových) jednotiek a to koniferylalkoholu, sinapylalkoholu a p-kumarylalkoholu. Tieto sú kovalentne spojené s polysacharidmi a proteínmi. Sú to molekuly amorfné a opticky inaktívne. Hlavnými väzbami v molekule lignínu sú éterové (-O-) a uhlík-uhlík väzby. Lignín prejavuje vysoký stupeň štruktúrnej variability, ktorý závisí od rastlinných druhov a pletív a od typu bunky.

Sekundárne metabolity rastlín môžeme rozdeliť podľa štruktúry na polyfenoly (jednoduché fenoly, flavonoidy, fenolové kyseliny, taníny, stilbény), alkaloidy a terpény. V rámci skupiny polyfenolových látok tvorí ich značnú časť skupina flavonoidov. **Fenoly** sú aromatické alkoholy, ktoré obsahujú -OH skupinu naviazanú na aromatickom jadre. Prirodzene sa vyskytujú v mnohých druhoch potravín a tiež v prídavných látkach, ktoré dávajú potravinám farbu, chuť a vôňu. Medzi jednoduché fenoly bežne sa vyskytujúce v rastlinách patrí napríklad vanilín. **Flavonoidy** sú fenolové látky, ktoré sú v rastlinnej ríši veľmi rozšírené a chránia rastliny pred škodlivými činiteľmi. Zahŕňajú skoro 4000 známych derivátov. Vyznačujú sa priaznivým účinkom na organizmus. Sú aktívne vo vodnom aj v lipofilnom prostredí. Medzi najvýznamnejšie flavonoidy patria: kaemferol, kvercetín, hesperidín, rutín, antokyanidíny, katechín, fenylpropanoidy a iné. Vo všeobecnosti sa vyskytujú všade tam, kde je viazaný vitamín C. **Taníny** (triesloviny) sú polyfenolové zlúčeniny, ktoré rozdeľujeme na hydrolyzovateľné alebo kondenzované taníny. Hydrolyzovateľné taníny sú komplexy polyfenolov, ktoré môžu byť rozkladané pomocou zmeny pH alebo enzýmovou/neenzýmovou hydrolýzou na menšie fragmenty, zvyčajne sacharidy alebo fenolové kyseliny. Hlavné použitie tanínov je výroba kože, kde sa taníny používajú na viazanie kolagénových proteínov v koži zvierat, čím sa koža stáva flexibilnejšou a menej citlivou na mikrobiálny útok. **Alkaloidy** patria medzi metabolity odvodené od aminokyselín. Tvoria najpočetnejšiu skupinu sekundárnych metabolitov a pre človeka a zvieratá sú často veľmi jedovaté. Spravidla ide o dusíkaté zlúčeniny alkalickej povahy tvoriace väčšinou soli s organickými kyselinami (šŕaveľovou, mliečnou, jablčnou, citrónovou, vínnou). Väčšina alkaloidových rastlín je známa svojou toxicitou, halucinogénnymi účinkami, využitím v ľudovej medicíne i pre priemyselnú výrobu liečiv. V prírode sa vyskytuje tiež veľký počet **terpénov**. V organizme môžu mať rozličnú funkciu. Prítomnosť kyslíka najčastejšie v alkoholovej, ale i aldehydovej, ketónovej, esterovej, éterovej, laktónovej a fenolovej skupine,

i poloha dvojitej väzby vplývajú na charakter vône týchto látok. Podobne aj prítomnosťou dusíka alebo síry získavajú osobitne výraznú vôňu. Linalol sa vyskytuje v kvetoch konvalinky, v pomarančovom a v koriandrovom éterickom oleji. Geraniol sa nachádza v eukalyptovom a v ružovom oleji, kde sa vyskytuje spolu s citranelom. Z monocyklických terpénov je najdôležitejší limonén. Tvorí hlavnú zložku citrusových éterických olejov. Karvón má vôňu ako rasca a nachádza sa v rasci, kôpri a v terpentínovom oleji. Medzi rastlinné monoterpény patria aj glykozidy i rastlinné hormóny ako je kyselina abscisová a gibberelíny. Medzi sekundárne metabolity môžeme zaradiť tiež **vitamíny**, ktoré bývajú rozdelené do dvoch skupín: na vitamíny rozpustné vo vode a vitamíny rozpustné v tukoch (A, D, E a K).

Úloha č. 1: Dôkaz lignínu

Teoretický úvod: Z kvalitatívneho hľadiska je lignín po celulóze najrozšírenejšou organickou zlúčeninou rastlinného pôvodu. Má stavebnú funkciu. Tvorí približne 25 % rastlinnej biomasy, v prípade ihličnatých stromov až 50 %. V najväčšom zastúpení sa objavuje v bunkových stenách sekundárnych buniek, ktoré tvoria xylémové cievy a tracheidy. Ukladanie lignínov poskytuje štrukturálnu podporu a pevnosť nadzemným častiam vyšších suchozemských rastlín. Vďaka hydrofóbnym vlastnostiam zabezpečuje lignín v xylémových cievach vodotesnosť. Lignínové molekuly vznikajú polymerizáciou troch alkoholov - kyseliny škoricovej, monolignolov (fenypropánové jednotky) a to p-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol. Tieto fenypropánové jednotky reagujú s floroglucínom alebo anilínom a v kyslom prostredí dávajú charakteristické zafarbenie.

Objekt: zápalky, viacročné konáriky bazy čiernej (*Sambucus nigra* L.), kancelársky papier, filtračný papier.

Pracovné pomôcky: kadičky, Petriho misky, sklená tyčinka, pipeta, odberná banka, odmerný valec, vodný kúpeľ.

Chemikálie: 1 % (w/v) alkoholický roztok floroglucínu, koncentrovaná HCl, roztok anilínhydrochloridu (1 ml anilínu sa zmieša s 1 ml koncentrovanej HCl a doplní 8 ml destilovanej vody).

Pracovný postup:

- a) Z konárika bazy čiernej pripravíme pozdĺžny a riečny rez. reznú plochu potrieme floroglucínom a potom koncentrovanou HCl. Lignifikované bunkové steny sa zafarbia červeno až červenofialovo. Nelignifikované bunkové steny nachádzajúce sa v stržni nedávajú farebnú reakciu.
- b) Drievko zo zápalky ponoríme na 30 sekúnd do roztoku floroglucínu. Potom drievko prenesieme do HCl. Drievko sa ihneď zafarbí na červeno. Druhé drievko ponoríme do roztoku anilínhydrochloridu. Drievko sa ihneď zafarbí na zlatožlto. Obidve reakcie sú dôkazom prítomnosti lignínu v dreve. Paralelne vykonáme obidve skúšky s dreveným

kancelárskym papierom a filtračným (celulóзовým) papierom. Papier obsahujúci lignín dáva pozitívnu reakciu, papier celulóзовý nedáva reakciu.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Vyhodnotíme pozorované reakcie a popíšeme, ktoré objekty obsahujú lignifikované bunkové steny a aká je ich funkcia vo vzorke.

Úloha č. 2: Reakcie tanínov (trieslovín)

Teoretický úvod: Taníny (triesloviny) sú zložité organické zlúčeniny polyfenolového charakteru, ktoré obsahujú pyrokatechol, pyrogalol alebo floroglucín. Spoločným znakom týchto vysokomolekulárnych látok je schopnosť zrážať proteíny nachádzajúce sa v koži. Týmto procesom koža získava vhodné technologické vlastnosti, odolnosť voči hnilobným rozkladným procesom, strate ohybnosti a prílišnému napučievaniu. Práve z tohto dôvodu sú extrakty z trieslovín využívané i v lekárstve, zrážaním proteínov slizníc na nich vytvárajú koagulačné membrány, čím znižujú dráždivosť, inhibujú zápaly a podobne. Pre svoju zvieravú horkú chuť poskytujú rastline ochranu pred napadnutím rôznymi škodcami (napr. tvorba hálok). Obzvlášť bohaté na triesloviny sú rastlinné čeľade ako *Rosaceae*, *Fabaceae*, *Polygonaceae*, *Ericaceae*. Z hľadiska chemickej povahy sú triesloviny rôznorodé chemické látky a preto aj ich dôkazové reakcie sú často charakteristické pre celú skupinu a nie dostatočne špecifické, preto je často potrebné uskutočniť viaceré reakcie pre potvrdenie prítomnosti tanínov vo vzorkách.

Objekt: dubové hálky (*Quercus robur* L.), oplodie pagaštana konského (*Aesculus hippocastanum* L.), silný extrakt čierneho alebo zeleného čaju.

Pomôcky: kadičky, skúmavky, stojan na skúmavky, pipeta, aparátúra na filtrovanie, sklená tyčinka, vodný kúpeľ, centrifúga, lakmusové papieriky, Petriho miska.

Chemikálie: 10 % (w/v) FeCl₃, nasýtený roztok AlCl₃, roztok želatíny (1 g želatíny sa nechá napučať v 100 ml destilovanej vody, zahreje sa na 60 °C a pridá sa 10 g NaCl, pH roztoku sa upraví na 4,0), 1 % (w/v) AgNO₃, 26 % NH₄OH, 10 % (w/v) octan olovnatý zásaditý bezvodý, 5 % (w/v) molybdénan amónny v nasýtenom roztoku AlCl₃, 20 % (v/v) H₂SO₄, KOH, Fehling I (roztok pozostávajúci z 69,3 g síranu meďnatého a 1 l destilovanej vody), Fehling II (roztok pozostávajúci z 46 g vlnanu sodno-draselného a 120 g hydroxidu sodného v 1 l destilovanej vody).

Postup: 10 g nadrobno nasekaného rastlinného materiálu varíme 10 min v 100 ml destilovanej vody. Prefiltrujeme. Filtrát rozdelíme na 6 častí a urobíme skúšky na prítomnosť trieslovín.

a) K 5 ml trieslovinového extraktu pridáme niekoľko kvapiek 10 % (w/v) FeCl₃. Za prítomnosti pyrokatecholových trieslovín sa roztok zafarbí na čienozelene, za prítomnosti pyrogalolových trieslovín sa roztok zafarbí na čiernomodro. Toto zafarbenie dáva

komplexná zlúčenina železitého iónu s fenolovými látkami. Reakcia je pozitívna aj za prítomnosti fenolových látok netrieslovínového pôvodu.

- b) K 5 ml čierneho trieslovínového extraktu opatrne prikvapkáme pripravený želatínový roztok. Vyzráža sa žltkastá zrazenina. Reakcia je špecifická pre triesloviny. Látky, ktoré dávajú negatívnu reakciu, sa za triesloviny nepovažujú.
- c) K 5 ml trieslovínového extraktu pridáme 1 ml 1 % (w/v) AgNO_3 , niekoľko kvapiek hydroxidu amónneho a krátko povaríme. Triesloviny sa vyzrážajú a súčasne sa vyzráža aj čierne koloidné striebro.
- d) K 5 ml trieslovínového extraktu pridáme 3 ml 10 % (w/v) zásaditého octanu olovnatého. Triesloviny sa v roztoku kvantitatívne vyzrážajú vo forme bledej zrazeniny. Súčasne sa vyzrážajú aj látky fenolovej povahy, ktoré môžu skresliť výsledok.
- e) K 5 ml trieslovínového extraktu pridáme po kvapkách 5 % (w/v) roztok molybdénanu amónneho v nasýtenom roztoku AlCl_3 . Žltá zrazenina je dôkaz prítomnosti trieslovín.
- f) K 10 ml trieslovínového extraktu pridávame zásaditý octan olovnatý do vytvorenia bielej až blede žltej zrazeniny. Po vytvorení zrazeniny obsah kadičky krátko povaríme. Zrazeninu centrifugujeme, dekantujeme. 2-krát premyjeme vodou, pridáme 5 ml 20 % (v/v) H_2SO_4 a 20 min hydrolyzujeme varom. Po vychladnutí roztok neutralizujeme pridaním pevného KOH do slabo alkalickéj reakcie. Pridáme Fehlingov roztok (celkový objem 15 ml, pričom v rovnakom objeme zmiešame roztoky Fehling I a Fehling II). Vylúčená červená zrazenina Cu_2O dokazuje, že v molekule triesloviny na nachádza redukujúci sacharid.

Doba trvania: 75 min.

Výsledky: Popíšeme princíp každej dôkazovej reakcie a získaný výsledok. Zhodnotíme, aké použité objekty obsahujú triesloviny a naše výsledky porovnáme s údajmi publikovanými v literatúre.

Úloha č. 3: Dôkaz prítomnosti vitamínu C

Teoretický úvod: Vitamín C (kyselina L-askorbová) patrí medzi vitamíny rozpustné vo vode. Jej sumárny vzorec je $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$. Vyskytuje sa predovšetkým v ovocí a zelenine. Kyselina L-askorbová je potrebná na reguláciu metabolizmu aminokyselín, udržiavanie pevnosti cievnych stien (najmä kapilár) a tkanivové dýchanie. Podporuje vstrebávanie železa, stimuluje tvorbu bielych krviniek, vývoj kostí, zubov a chrupaviek, podporuje rast a odstraňuje voľné radikály. Významné množstvá obsahujú najmä citrusové plodiny. Princíp dôkazovej reakcie spočíva v nakvapkaní pripravenej olivovozelenej zmesi roztokov hexakvanoželezitanu draselného a chloridu železitého do skúmavky s roztokom kyseliny askorbovej za vzniku modrého sfarbenia. Takú istú farebnú reakciu pozorujeme aj na reze plodov ovocia (za prítomnosti vitamínu C). Uvedený dôkaz vitamínu C je založený na jeho redukčných schopnostiach. Kyselina askorbová zredukuje hexakvanoželezitan draselný na hexakvanoželeznatan draselný a ten utvorí so železitým kationom berlínsku modrú

(hexakvanoželeznatoželezitan draselný). Takto možno polokvantitatívne sledovať obsah vitamínu C v jednotlivých druhoch ovocia a zeleniny (intenzita sfarbenia je relatívne úmerná obsahu vitamínu C). Obsah vitamínu C v primárnom zdroji závisí od viacerých faktorov vnútorných (napr. ontogenetický stav rastlinného pletiva) a vonkajších (napr. prítomnosť ťažkých kovov, oxidačných činidiel). Na oxidáciu a následne znehodnotenie vitamínu C vplýva pH, kyslík, kovy, teplota. Vitamín C je najstálejší pri pH 3-4, čím je pH vyššie, tým sa vitamín C rýchlejšie znehodnotí. Kyslík znehodnocuje vitamín C predovšetkým v prítomnosti kovov (predovšetkým Fe, Cu) a taktiež zvyšovaním teploty sa zvyšuje miera znehodnotenia vitamínu C.

Objekt: citrónová šťava (*Citrus x limon*) alebo iný zdroj vitamínu C.

Pracovné pomôcky: kadička, kvapkadlo, skúmavka, stojan na skúmavky.

Chemikálie: 1 % (w/v) roztok hexakvanoželezitanu draselného, 1 % (w/v) roztok chloridu železitého, kyselina askorbová (Celaskon).

Pracovný postup: Najprv zmiešame rovnaké objemy (po 1 ml) roztoku hexakvanoželezitanu draselného a chloridu železitého. Takto pripravenú zmes kvapneme na rozrezané plody ovocia a pre porovnanie aj do skúmavky s roztokom kyseliny askorbovej. Pozorujeme.

Doba trvania: 10 min.

Výsledky: Zaznamenáme pozorované farebné zmeny a vysvetlíme.

Úloha č. 4: Redukčné vlastnosti vitamínu C

Teoretický úvod: Vitamín C je kofaktorom viacerých enzýmov v tele (čo znamená, že bez neho by tieto enzýmy nemohli plniť svoju funkciu) a má významný vplyv na tvorbu kolagénu. Má silné redukčné vlastnosti, ktoré rastlina využíva pri oxido-redukčných metabolických procesoch. Redukčné vlastnosti je možné dokázať redukovaním roztoku AgNO₃ na elementárne striebro v tme a chlade.

Objekt: čerstvá šťava z citróna (*Citrus x limon*).

Pracovné pomôcky: kadičky, aparátúra na filtrovanie, skúmavky, stojan na skúmavky, pipeta, sklená tyčinka, varný kúpeľ.

Chemikálie: 1 % (w/v) kyselina L-askorbová, 1 % (w/v) kyselina citrónová, 1 % (w/v) roztok glukózy, 1 % (w/v) AgNO₃, 26 % NH₄OH.

Pracovný postup: V prvom kroku si pripravíme citrónovú šťavu spôsobom, že citrón vytlačíme a získanú šťavu prefiltrujeme. Polovicu šťavy odložíme a druhú polovicu 10 min povaríme v kadičke. Po vare necháme vychladnúť. Do skúmaviek napipetujeme nasledujúce roztoky v objeme 5 ml: destilovaná voda (kontrola), kyselina L-askorbová, kyselina citrónová, citrónová šťava, povarená a vychladnutá citrónová šťava, 2 ml roztoku glukózy + pár kvapiek

NH₄OH. Do každej skúmavky napipetujeme 3 ml 1 % (w/v) AgNO₃ a skúmavky uložíme na tmavé miesto. Vyhodnotíme po 45 min.

Doba trvania: 75 min.

Výsledky: Po dobe inkubácie vyhodnotíme úlohu vizuálnym porovnaním množstva vyredukovaného striebra, popíšeme a vysvetlíme pozorované javy. Vyhodnotíme, ktoré zložky citrónovej šťavy redukovujú roztok AgNO₃.

Úloha č. 5: Dôkaz prítomnosti vitamínu A

Teoretický úvod: Vitamín A je všeobecný názov pre látky s aktivitou vitamínu A, ktoré sú rozpustné v tukoch. Vyznačuje sa vysokou citlivosťou na svetlo a na kyslík. Vitamín A sa ako retinol vyskytuje v potravinách živočíšneho pôvodu (napr. olej z rybej pečene, pečienka, mlieko a mliečne výrobky). Ako 3,4-dihydroretinol (vitamín A₂) ho nájdeme v morských rybách (napr. žralok, platýz, makrela). Vo forme provitamínu (β-karotén) je vitamín A prítomný v zelenine a ovocí (napr. mrkva, brokolica, melón, šalát, špenát, marhuľa) a v tráviacom trakte človeka sa mení na vitamín A len v množstve potrebnom pre telo. Provitamín A (chemicky β-karotén) patrí do skupiny karoténov, ktoré sa v prítomnosti kyseliny sírovej sfarbia modro alebo modrofialovo. Tento vitamín je dôležitý pri redoxných procesoch v organizme, biochemických dejoch videnia a podobne. Preto by ho mal byť v potrave dostatok. Dá sa to dosiahnuť pravidelnou konzumáciou zdrojov beta-karoténu (napr. mrkvy, paradajok a iných). Jeho nedostatok spôsobuje poruchy zraku a rastu.

Objekt: zdroj vitamínu A, resp. jeho provitamínu β-karoténu (mrkva *Daucus carota* L., plod ruže šíповej *Rosa canina* L., vaječný žĺtok a podobne).

Pracovné pomôcky: skúmavka, stojan, trečia miska, strúhadlo, skalpel, kvapkadlo, Petriho miska, hodinové sklíčko.

Chemikálie: benzín technický, koncentrovaná (96 %) kyselina sírová, roztok beta-karoténu.

Pracovný postup: Objekt v množstve 5 g nakrájame najemno, príp. nastrúhame a vložíme do skúmavky. Prilejeme 3 ml benzínu. Dôkladne pretrepeme a necháme 3 min stáť. Z roztoku následne kvapneme kvapku na Petriho misku alebo hodinové sklíčko. Na druhú Petriho misku kvapneme kvapku pripraveného roztoku β-karoténu. Keď sa benzín z Petriho misky odparí po 2-3 min, prikvapneme do oboch roztokov s karoténmi kyselinu sírovú. Pozorujeme farebnú zmenu vo forme modrého zafarbenia ako dôkaz karoténu.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Pozorujeme výslednú farebnú zmenu v oboch vzorkách. Porovnáme a vysvetlíme príčinu farebnej reakcie.

Úloha č. 6: Stanovenie obsahu lipidov vo vzorke

Teoretický úvod: Lipidy sú po chemickej stránke estery vyšších karboxylových kyselín a alkoholov. Ich molekuly sú pomerne chudobné na kyslík. Lipidy patria medzi primárne metabolity. Nie sú síce priamym produktom fotosyntézy, ale úzko s ním súvisia. Acetyl-CoA (acetylkoenzým A) je centrálna molekula metabolizmu sacharidov, lipidov, proteínov a ďalších látok. Vzniká v procese cyklu kyseliny citrónovej. Tvoria rozmanitú skupinu látok (tuky, vosky, fosfolipidy, terpény a iné), ktorej spoločnou vlastnosťou je ich rozpustnosť v organických rozpúšťadlách a čiastočná rozpustnosť, resp. úplná nerozpustnosť vo vode. Lipidy sú nevyhnutné pre stavbu bunkových štruktúr, tkanív a pletív, sú zdrojom energie pre organizmus, živočíšny organizmus chránia pred stratou tepla a mechanickým poškodením, zúčastňujú sa na stavbe nervových buniek a obaľujú nervové vlákna a vytvárajú prostredie, v ktorom sú rozpustné látky inak nerozpustné vo vode (niektoré vitamíny, hormóny, liečivá, farbivá).

Objekt: zomleté olejnaté semená (slničnica ročná, ľan siaty, mak siaty a podobne).

Pracovné pomôcky: centrifugačné skúmavky, stojan na skúmavky, odmerný valec, pipeta, destilačná banka, korkový podstavec, filtračná aparátúra, analytické váhy, exsikátor, centrifúga, rotačná odparka.

Chemikálie: *n*-hexán, síran sodný bezvodý.

Pracovný postup: Navážime do umelohmotnej centrifugačnej tuby 3 g pomletej vzorky, hmotnosť si zapíšeme (*m*). Ku vzorke pridáme 20 ml *n*-hexánu, uzatvoríme, silno pretrepeme. Extrahujeme 6-krát 20 sek v mikrovlnnej rúre. Po každej extrakcii vzorku silno pretrepeme. Po poslednej extrakcii vzorku centrifugujeme (4200 otáčok, 5 min). Supernatant zlejeme do pripravenej banky. Ku vzorke, k peletu prilejeme 10 ml *n*-hexánu a extrakciu opakujeme ako v prípade objemu 20 ml. K peletu prilejeme 8 ml *n*-hexánu a opakujeme extrakciu. Odvážime si prázdnu destilačnú banku (m_1) a pripravíme si aparáturu na filtrovanie, pričom na filtračný papier dáme lyžičku síranu sodného bezvodého. Supernatant zozbieraný zo všetkých extrakcií prefiltrujeme a premyjeme 2 × 3 ml hexánu (jedenkrát prepláchneme banku a jedenkrát filtračný papier) a prebytočné rozpúšťadlo odparíme na rotačnej odparke pri teplote 60 °C. Banku po odparení vložíme do exsikátora, kde vychladne a taktiež nenasaje vzdušnú vlhkosť, ktorá by ovplyvnila výsledok. Odvážime (m_2). Namerané hodnoty dosadíme do vzorca a vypočítame podiel lipidov vo vzorke:

$$x (\%) = (((m_2 - m_1) / m) * 100) * (100 / \text{sušina})$$

kde *x* je množstvo lipidov vyjadrené v percentách, *m* je hmotnosť vzorky, m_1 prázdna destilačná banka a m_2 odparok.

Doba trvania: 60 min.

Výsledky: Vypočítame podiel lipidov vo vzorke a podľa údajov z literatúry porovnáme správnosť získaného výsledku.

Kontrolné otázky

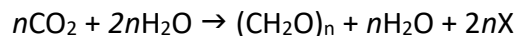
1. Aký je rozdiel medzi sekundárnymi a primárnymi metabolitmi?
2. Vymenujte príklady primárnych metabolitov.
3. Vymenujte príklady sekundárnych metabolitov.
4. Popíšte skupinu alkaloidov, chemickú podstatu a ich využitie.
5. Aké vlastnosti majú flavonoidy?
6. Popíšte zloženie celulózy.
7. Čo je to lignín?
8. Ako rozdeľujeme vitamíny z pohľadu ich rozpustnosti?
9. Aké sú princípy dôkazových reakcií trieslovín?
10. Ako dokážeme redukčné vlastnosti vitamínu C?

Zaujímavosť

V ríši rastlín je možné nájsť nespočetné množstvo liečivých látok, ktoré sa vyznačujú svojimi terapeutickými účinkami a nachádzajú využitie v ľudovom liečiteľstve. Avšak rovnako je možné nájsť v rastlinách množstvo jedov. Jedna z najjedovatejších rastlín, ktorá sa bežne nachádza v okrasných záhradách a dvoroch, je oleander obyčajný (*Nerium oleander*), ktorý obsahuje množstvo toxínov alkaloidovej povahy (napr. oleandrín), ktoré spôsobujú hnačku, zvracanie, delírium až smrť. Avšak na prvom mieste v rebríčku jedovatých rastlín sa nachádza tabak pre toxické alkaloidy ako nikotín a anabasín. Orálne požitie týchto alkaloidov je životu nebezpečné.

FOTOSYNTÉZA V RASTLINÁCH

Fotosyntéza je jedinečný metabolický proces živej prírody, v ktorom zelené (autotrofné) organizmy i) transformujú energiu žiarenia na energiu chemických väzieb v ATP (adenozíntrifosfát, makroergická zlúčenina), ii) syntetizujú organické látky (glukóza) a iii) vytvárajú O₂, od ktorého závisí existencia živých organizmov, vrátane ľudskej populácie. Pojem fotosyntéza pochádza z dvoch gréckych slov a to fotos = svetlo a synthesis = viazanie, zlučovanie. Práve vďaka fotosyntéze je možné udržiavať relatívne stále pomer dvoch plynov v ovzduší, O₂ a CO₂ a tiež sa podieľa na kolobehu uhlíka v prírode. Je to jedna z foriem asimilácie oxidu uhličitého, ktorá môže mať rozličný priebeh. Daný proces je možné znázorniť rovnicou:

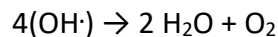
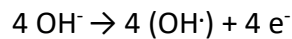
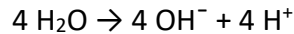


kde *X* môže byť kyslík, síra alebo tiež môže chýbať. Fotosyntéza predstavuje **autotrofný** spôsob výživy typický pre zelené rastliny, ktoré obsahujú **asimilačné farbivá** (chlorofyly, karotenoidy, fykobilíny). Fotosyntézu však môžu uskutočňovať aj riasy, cyanobaktérie a niektoré rody baktérií (purpurové sírne baktérie, zelené sírne baktérie a ďalšie).

Fotosyntézu možno charakterizovať ako súbor fotofyzikálnych (absorpcia energie žiarenia asimilačnými pigmentami), fotochemických (fotosyntetická fosforylácia) a biochemických procesov (fixácia a redukcia CO₂ – Calvinov cyklus u C₃ rastlín a Hatch-Slackov cyklus u C₄ rastlín) v rastlinnej bunke obsahujúcej asimilačné pigmenty. Pomocou týchto pigmentov rastlina vytvára za účasti energie žiarenia z anorganických látok (CO₂ a H₂O) organické zlúčeniny (glukóza, C₆H₁₂O₆) za súčasného uvoľnenia O₂. Hovoríme o primárnych metabolitoch (sacharidy, lipidy, proteíny), ktoré sú potom základom pre syntézu sekundárnych metabolitov. Fotosyntéza je proces nazývaný aj fotosyntetická asimilácia, pretože z jednoduchých látok (CO₂ a H₂O) vznikajú zložité látky (glukóza). Asimilačné farbivá predstavujú nielen zelené chlorofyly, ale aj žltó-oranžové karotenoidy a fykobilíny. Každé z týchto pigmentov absorbujú inú časť spektra viditeľného svetla vo vlnovom rozmedzí od 400 do 700 nm. Fotosynteticky aktívny je modrozelený chlorofyl *a*, žltozelený *b*, tiež chlorofyl *c* a *d* vyskytujúci sa v hnedých a červených riasach, pričom existuje aj bakteriochlorofyl *a* a *b*, chlorobiumchlorofyl. Procesy fotosyntézy môžeme rozdeliť do dvoch fáz: jedna zahŕňa reakcie, ktoré prebiehajú len pri osvetlení (svetelná fáza fotosyntézy) a druhá skupina predstavuje reakcie, ktoré sa uskutočňujú nezávisle od osvetlenia, aj za tmy (tmavá fáza fotosyntézy, v niektorej literatúre sa stretáme aj s označením temnotná fáza).

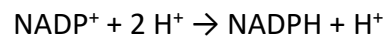
Svetelná fáza predstavuje primárne procesy, ktoré prebiehajú na membráne tylakoidov v chloroplastoch, pričom energiu na asimiláciu oxidu uhličitého dodáva slnečné svetlo. Princípom je premena tejto slnečnej energie na energiu chemických väzieb a uskutočňuje sa v dvoch po sebe nasledujúcich krokoch prostredníctvom fotosystému I a II, ktoré sa nachádzajú v eukaryotoch. Tieto sú sústavami prenášačov a farbív, ktorých významnou zložkou je chlorofyl. **Fotosystém I** (P700) absorbuje svetelné žiarenie s vlnovou dĺžkou 700 nm. Fotosystém I prijíma svetelné žiarenie, následne chlorofyl fotosystému I prechádza do excitovaného stavu a uvoľňuje elektróny, ktoré môžu buď redukovať NADP⁺

(nikotínamidadenínindinukleotidfosfát) na $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (redukovaná forma nikotínamidadenínindinukleotidfosfátu) alebo sa vrátiť späť. Časť ich energie sa využije na tvorbu ATP v procese cyklickej fosforylácie. Redukovaná forma NADP sa potom využíva v tmavej fáze fotosyntézy. **Fotosystém II** (P680) absorbuje svetelné žiarenie s vlnovou dĺžkou 680 nm. Podobne ako fotosystém I, prijme svetelné žiarenie, prejde do excitovaného stavu a uvoľní elektróny, ktoré prechádzajú na fotosystém I (resp. na chlorofyl fotosystému I), kde nahradia uvoľnené elektróny. Elektrónové nasýtenie chlorofylu fotosystému II zapríčiňuje **fotolýzu vody**, pri ktorej sa uvoľňuje kyslík, protóny a elektróny:



Z hydroxidového iónu OH^- sa odoberá elektrón a vráti sa späť do chlorofylu (to už iný elektrón, ako ten, ktorý sa z chlorofylu uvoľnil na začiatku fotosyntézy, preto hovoríme o necyklickej fáze). OH^- sa pri odnímaní elektrónu mení na $\text{OH}\cdot$ hydroxidový radikál. Tento radikál je vysoko reaktívna látka, ktorá reaguje s ďalším radikálom a vzniká O_2 . Tento proces sa označuje tiež ako resyntéza vody, preto na pravej strane rovnice je voda.

Energia elektrónu pochádzajúca z jeho uvoľnenia z chlorofylu sa využije na vznik radikálu $\text{H}\cdot$ z vodíkového kationu, ktorý zreaguje s NADP^+ , podľa rovnice:



A tak ako bolo písané vyššie, $\text{NADPH} + \text{H}^+$ sa využije v tmavej fáze na redukciu O_2 . NADP^+ funguje ako koenzým, nebielkovinová zložka enzýmu oxidoreduktáz (enzýmy katalyzujúce oxidačno-redukčné procesy). Výsledkom svetelnej fázy fotosyntézy je vznik moakroergickej zlúčeniny ATP, O_2 a redukovanej formy NADP – teda $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

Tmavá fáza fotosyntézy predstavuje sekundárne procesy, ktoré nie sú priamo závislé od osvetlenia a prebiehajú aj v tme. Ich podstatou je premena látok, teda CO_2 na glukózu za využitia ATP a $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zo svetelnej fázy na glukózu. Nevyhnutné látky pre priebeh tmavej fázy fotosyntézy sú ATP, $\text{NADPH} + \text{H}^+$, CO_2 a organický substrát, na ktorý sa viaže (fixuje) CO_2 . Tmavá fáza prebieha mimo tylakoidov, v stróme chloroplastov. CO_2 sa môže redukovať na organický substrát dvoma spôsobmi: i) **Calvinov-Benssonov cyklus** a ii) **Hatch-Slackov cyklus**.

Calvinov-Benssonov cyklus môžeme rozdeliť na tri fázy – karboxylačnú, redukčnú a regeneračnú. V prípade Calvinov-Benssonovho cyklu je primárnym akceptorom CO_2 molekula RuBP (ribulóza 1,5-bifosfát), pričom katalyzátorom reakcie je ribulózabisfosfátkarboxyláza (niekedy označovaná ako Rubisco). Po naviazaní CO_2 na RuBP vzniká nestabilný 6-uhlíkový medziprodukt, ktorý sa vzápätí hydrolyticky rozkladá na dve molekuly 3-uhlíkovej kyseliny 3-fosfoglycerovej (PGA), preto sa rastliny s týmto mechanizmom fixácie oxidu uhličitého nazývajú **C3 rastliny**. Uhlík je fixovaný všetkými

bunkami mezofylových listov. Patrí sem väčšina rastlín mierneho pásma (napr. obilniny), niektoré tropické rastliny (napr. rýža, sója, bambus) a väčšina stromov.

Hatch-Slackov cyklus je typický pre **C4 rastliny** (bežné krmoviny ako kukurica, cirok, cukrová trstina), ktoré patria medzi veľmi produktívne rastliny fixujúce oxid uhličitý. Nazývajú sa tak preto, lebo produkujú v tmavej fáze fotosyntézy namiesto PGA, 4-uhlíkovú kyselinu oxaloctovú. V tomto prípade sa molekula CO₂ viaže na substrát fosfoenolpyruvát (PEP) za účasti fosfoenolpyruvátkarboxylázy (Pepkáza), ktorý sa po fixácii mení na oxálacetát so štyrmi molekulami uhlíka. Táto kyselina je nestála a mení sa redukciou na kyselinu jablčnú alebo amináciou na kyselinu asparágovú.

Okrem C3 a C4 rastlín poznáme ešte **CAM** fotosyntézu. Pomenovaná je na počesť čeľade *Crassulaceae*, v ktorej bola prvýkrát zdokumentovaná. Tento typ fotosyntézy je prispôbením nízkej dostupnosti vody a vyskytuje sa v orchideách a sukulentných druhoch rastlín rastúcich v suchých oblastiach. V rastlinách sú prieduchy v listoch zatvorené počas denného svetla, aby sa znížila evapotranspirácia, a otvorené sú v noci, aby zachytili CO₂, ktorý viažu na kyselinu oxaloctovú, pričom z nej vzniká kyselina jablčná akumulujúca sa vo vakuolách. Cez deň sa táto kyselina dekarboxyluje a uvoľnený CO₂ vstupuje do Calvinovho cyklu. Pri svetle sa uplatňujú obidva karboxylačné systémy – teda aj C3 aj C4.

Metódy využívané pri štúdiu fotosyntézy a respirácie možno principiálne rozdeliť do štyroch skupín: 1) biochemické, 2) gravimetrické, 3) gazometrické a 4) iné. Biochemické metódy sú založené na fotolýze vody pomocou Hillovej reakcie dokazujúcej, že kyslík uvoľnený z fotosyntézy pochádza z vody a nie CO₂ alebo na karboxylačnej aktivite ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxylázy (Rubisco). Hillova reakcia sa sleduje na izolovaných chloroplastoch, kde akceptorom elektrónov z fotosytému II nie je fotosystém I, ale synteticky pripravený akceptor, napr. DIP (dichlórfenollindolfenol). Po redukcii tohto syntetického akceptora elektrónov dochádza k farebným zmenám, ktoré sa stanovujú spektrofotometricky. Karboxylačná aktivita Rubisco sa stanovuje meraním rádioaktivity uhlíka pomocou scintilačného prístroja. Princípom gravimetrických metód je stanovenie čistej fotosyntézy, t.j. rozdielu medzi celkovou fotosyntetickou produkciou sušiny a spotrebou asimilátov za súčasne prebiehajúcej respirácie, napr. metóda stanovenia prírastku hmotnosti výrezov pletív listov (segmenty, terčiky) exponovaných vždy v rovnakom prostredí. Gazometrické metódy sú zamerané na meranie zmien poklesu koncentrácie CO₂ (napr. infračerveným plynovým analyzátorom – IRGA) v prostredí obklopujúcom rastlinný materiál. Do 4. skupiny metód stanovenia fotosyntézy patria metóda dôkazu produkcie O₂ vo fotosyntéze, stanovenie škrobu a chlorofylov v listoch rastlín a metóda rastovej analýzy stanovujúca prírastok rastlinnej biomasy za určitý časový interval. Každá z uvedených metód má svoje prednosti a nedostatky.

Úloha č. 1: Extrakcia listových farbív

Teoretický úvod: V listoch zelených rastlín sa nachádza viacero farbív, ktoré sa zúčastňujú procesu fotosyntézy a aj iných procesov regulovaných svetlom. Najznámejším farbivom je

zelený chlorofyl. Ďalšie farbivá sú napr. deriváty chlorofylov a karotenoidy. Poznáme dva druhy chlorofylu v rastlinách - chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Chlorofyl *a* sa dá od chlorofylu *b* rozlíšiť na základe spektrálnych vlastností. Karotenoidné farbivá sú odvodené od α - a β -karoténov zavedením molekuly kyslíka (xantofyly). β -karotén je najpočetnejšie zastúpeným karotenoidom v zelených listoch rastlín. Ďalšími karotenoidmi sú α -karotén a lykopen, xantofyly (napr. luteín, violaxantín). Hlavnou úlohou karotenoidov je absorpcia svetla a ochrana fotosyntetického aparátu pred nadmerným žiarením. Karotenoidy, ktoré sú žltej, oranžovej, červenej alebo fialovej farby absorbujú slnečné žiarenie a energiu prenášajú na chlorofyly.

Objekt: zelené listy (napr. mladé listy trávy, púpavy a podobne).

Laboratórne pomôcky: trecia miska, nožnice, laboratórna lyžička, kadička, odmerný valec, pipeta, aparátúra na filtrovanie.

Chemikálie: morský piesok, uhličitan vápenatý, síran sodný bezvodý, 80 % (v/v) acetón.

Pracovný postup: Odvážime 1,5 g čerstvých zelených listov a rozstriháme ich na malé kúsky. Tieto rozotrieme s lyžičkou morského piesku a lyžičkou uhličitanu vápenatého a 10 ml 80 % (v/v) acetónu. Zmes prefiltrujeme do kadičky, pričom na filtračný papier dáme lyžičku síranu sodného bezvodého. Zvyšok v trecej miske premyjeme 20 ml acetónu. Filtrát prelejeme do odmerného valca a doplníme na objem 50 ml. Extrakt listových farbív použijeme na ďalšiu analýzu.

Doba trvania: 25 min.

Výsledky: Popíšeme vlastnosti extraktu pri jeho pozorovaní voľným okom proti svetlu a vysvetlíme dôvody voľby použitého extrakčného činidla.

Úloha č. 2: Stanovenie fotosyntetických pigmentov spektrofotometricky

Teoretický úvod: Pri spektrofotometrickom stanovení množstva chlorofylov (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*) v listoch rastlín ide o stanovenie absorpcie chlorofylového extraktu v oblasti vlnových dĺžok, pri ktorých je absorpcia chlorofylových komponentov maximálna. Absorpčné maximum pre chlorofyl *a* v 80 % (v/v) acetóne je 664 nm a pre chlorofyl *b* tiež v 80 % (v/v) acetóne je to 648 nm.

Objekt: extrakt listových farbív získaný v úlohe č. 1.

Pracovné pomôcky: spektrofotometer, sklená kyveta, sklená pipeta.

Pracovný postup: Extrakt listových farbív premiešame a prelejeme do kyvety tak, aby objem tvoril dve tretiny kyvety. Zmeriame absorbciu vzorky pomocou spektrofotometra pri vlnových dĺžkach 470 nm, 646 nm a 663 nm. Nezabudneme odmerať absorbciu slepého pokusu (80 % acetón) pri každej vlnovej dĺžke. Vždy uskutočníme 4 merania pri každej

vlnovej dĺžke. Obsah fotosyntetických pigmentov vypočítame dosadením absorpcie do nasledovných rovníc:

$$C_{\text{chlorofyl } a} = 12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646} * V / 1000 * FW \text{ (mg/g FW)},$$

$$C_{\text{chlorofyl } b} = 20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663} * V / 1000 * FW \text{ (mg/g FW)},$$

$$C_{\text{karotenoidy}} = [(1000 \times A_{470} - 3,27 \times cchl \ a - 104 \times cchl \ b) / 229] * V / 1000 * FW \text{ (mg/g FW)}$$

kde V je objem rozpúšťadla, ktorý sme použili na extrakciu farbív zo zelených listov (50 ml), FW je čerstvá hmotnosť zelených listov (z *angl.* fresh weight).

Doba trvania: 30 min.

Výsledky: Vyhodnotíme obsah jednotlivých listových plastidových pigmentov v analyzovanej vzorke. Z nameraných hodnôt stanovíme priemernú hodnotu a tiež vypočítame smerodajnú odchýlku a porovnáme ju s publikovanými údajmi.

Úloha č. 3: Chlorofyl pri fotosyntéze

Teoretický úvod: Asimilačné orgány rastlín, ktorými sú listy, obsahujú veľké množstvo chlorofylu. Niektoré rastliny sa vyznačujú abnormalitami pri tvorbe týchto asimilačných pigmentov. Abnormality môžu byť genetického pôvodu alebo spôsobené vírusovou infekciou. Listy, ktoré nie sú súvisle zelené, nazývame panašované. Panašované listy obsahujú biele, žlté, prípadne jemne zelené miesta a tieto miesta sú bez chlorofylov. Bez chlorofylu neprebíha v rastlinách fotosyntéza, nedochádza k tvorbe primárnych metabolitov ako sú sacharidy. Preto je reakcia týchto bezchlorofylových miest listu s Lugolovým roztokom negatívna, čo dokazuje potrebu chlorofylu pri fotosyntéze.

Objekt: panašované listy (napr. izbové rastliny ako brečtan (*Hedera*), fikus (*Ficus benjamina*), zelenec (*Chlorophytum comosum*) alebo vonkajšie ako hosta (*Hosta*), ostrice (*Carex*) a bršlen Fortuneov (*Euonymus fortunei*)).

Pracovné pomôcky: pinzeta, skalpel, kadička, vodný kúpeľ, Petriho miska.

Chemikálie: 96 % etanol, Lugolov roztok (20 g jodidu draselného rozpustíme v 20 ml destilovanej vody a pridáme 10 g kryštalického jódu. Prelejeme do odmernej banky a doplníme do 100 ml destilovanou vodou, v ktorej sme rozpustili 5 g octanu sodného).

Pracovný postup: Panašované listy odrežeme a po dobu 1 min varíme vo vriacej vode na uľahčenie prechodu Lugolovho roztoku do listu. Následne listy extrahujeme po dobu 3 min v horúcom etanole zahriatom na 50 °C, aby sme vyplavili chlorofyly. V ďalšom kroku listy následne preniesieme do Petriho misky s Lugolovým roztokom. Časti listu, ktoré sú pôvodne zelené sa zafarbia na hnedo, lebo obsahujú nižšie sacharidy (dextríny). Panašované časti listu zostávajú jasnožlté, pretože nedôjde k reakcii Lugolovho roztoku so škrobom.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Popíšeme reakciu list a jeho pigmentovania na prítomnosť Lugolovho roztoku. Vysvetlíme.

Úloha č. 4: Stanovenie obsahu celkových sacharidov vo vzorke

Teoretický úvod: Sacharidy sú významnou zložkou rastlín. Ako primárne metabolity vznikajú v procese fotosyntézy, teda počas fixácie CO_2 z atmosféry. Význam sacharidov je v organizme kľúčový, slúžia predovšetkým ako zdroj energie, majú stavebnú funkciu a sú prekursorom pre syntézu iných organických látok. Množstvo sacharidov v rastline je možné stanoviť napr. spektrofotometricky alebo gravimetricky. Glykolizidová väzba v molekule sacharidu vzniká spojením poloacetálovej $-\text{OH}$ skupiny jednej molekuly monosacharidu s niektorou z $-\text{OH}$ skupín druhej molekuly sacharidu. Na základe tejto väzby rozdeľujeme sacharidy na redukujúce (majú aspoň jednu voľnú poloacetálovú skupinu, napr. monosacharidy glukóza, maltóza) a neredukujúce (ani jedna poloacetálová $-\text{OH}$ skupina nie je voľná, všetky sú zapojené do väzby sacharidu, napr. disacharid sacharóza).

Objekt: jablko, hruška, prípadne iné ovocie.

Pracovné pomôcky: navažovacia miska, nožnice (alebo strúhadlo), delená pipeta, filtračný papier, kadička, odmerná banka, teplomer, Erlenmeyerova banka, odmerný valec, vodný kúpeľ, sušiareň, tretia miska.

Chemikálie: morský piesok, 20 % (w/v) vodný roztok hexakyanoželeznatánu draselného $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 20 % (w/v) vodný roztok síranu zinočnatého ZnSO_4 , koncentrovaná HCl , 30 % (w/v) roztok NaOH , Fehling I (je roztok pozostávajúci z 69,3 g síranu meďnatého a 1 l destilovanej vody), Fehling II (roztok pozostávajúci z 46 g vínanu sodno-draselného a 120 g hydroxidu sodného doplníme do objemu 1 l destilovanou vodou), roztok fenolftaleínu, etanol, dietyléter.

Pracovný postup: Jemne nakrájanú alebo nastrúhanú vzorku navážime v hmotnosti 20 g a dôkladne v trecej miske homogenizujeme. Pre lepšie rozrušenie bunkových stien použijeme morský piesok (1 lyžička). Vzorku vložíme do 100 ml odmernej banky a pridáme 1 ml roztoku kyanoželeznatánu draselného a za stáleho miešania 1,7 ml roztoku síranu zinočnatého. Obsah banky doplníme po značku vodou, premiešame dôkladne a prefiltrujeme cez skladaný filtračný papier. Z filtrátu odpipetujeme 50 ml do odmernej banky s objemom 100 ml, pridáme 5 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej a zahrievame (5 min.) pri teplote 67-70 °C. Obsah banky ochladíme pod tečúcu vodou a zneutralizujeme 5 ml 30 % (w/v) roztoku NaOH . Obsah banky opäť ochladíme a po značku doplníme vodou. Premiešame. Do Erlenmayerovej banky s objemom 250 ml (alebo do kadičky) odpipetujeme 25 ml Fehlingovho roztoku I a rovnaké množstvo Fehlingovho roztoku II. Pridáme 25 ml zinvertovaného roztoku, 30 ml destilovanej vody a privedieme do varu, ktorý udržíme 2

min. Obsah banky ochladíme v studenej vode. Tekutina nad vrstvou vyzrážaného oxidu meďného musí byť modrá. Prefiltrujeme obsah nádoby cez vopred odvážený filtračný papier. Filtračný papier premyjeme 2 x 10 ml horúcej destilovanej vody, potom 2 x 10 ml etanolu a 2 x 10 ml dietyléteru. Produkt (sediment na filtračnom papieri) vysušíme pri teplote 105 °C. Filtračný papier so sedimentom dáme vychladnúť do exikátora a po vychladnutí odvážime. Vypočítame množstvo sacharidov vo vzorke podľa vzťahu:

$$x (\%) = \frac{a \cdot 0,95}{1000 \cdot n} \cdot 100$$

kde x je množstvo sacharidov v percentách, a je hmotnosť produktu v g (t.j. hmotnosť produktu získaná rozdielom hmotností filtračného papiera po filtrácii a vysušení a pred filtráciou) a n je pôvodná hmotnosť vzorky v g.

Doba trvania: 50 min.

Výsledky: Stanovíme percentuálny podiel sacharidov vo vzorke a podľa dostupnej literatúry zhodnotíme získaný výsledok.

Úloha č. 5: Dôkaz škrobu v listoch

Teoretický úvod: Škrob je polysacharid zložený z monoméru glukózy. Je ľahko dokázateľným stabilným produktom fotosyntézy. Dokážeme ho Lugolovým roztokom. Lugolov roztok reaguje so škrobom za vzniku modrého zafarbenia, s dextrínmi za vzniku červenohnedého zafarbenia a s glukózou nevytvára žiadnu farbu. Zakryté miesta, na ktoré svetlo na liste nedopadne, neobsahujú škrob, pretože v týchto častiach neprebíha fotosyntéza, sacharidy sa nevytvárajú. Reakcia s Lugolovým roztokom je preto negatívna.

Objekt: akékoľvek zelené listy (napr. list izbovej rastliny, list zo stromu, bylinky) chránené niekoľko dní pred svetlom.

Pracovné pomôcky: kadičky, vodný kúpeľ, pinzeta, Petriho miska, filtračný papier.

Chemikálie: 96 % etanol, Lugolov roztok.

Pracovný postup: Dopredu pripravené listy ponoríme na 1 min do vriacej vody, čím list usmrtime. Z vody preložíme list do etanolu s teplotou 40 - 50 °C na dobu 5 min, čím z listu odstránime fotosyntetizujúce pigmenty, hlavne chlorofyly. List následne ponoríme do Lugolovho roztoku. Škrob vytvorený na osvetlených miestach listu reaguje s Lugolovým roztokom a dáva modré zafarbenie, nižšie sacharidy (dextríny) červenohnedé zafarbenie. Neosvetlené miesta na liste zostávajú jasnožlté.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Popíšeme pozorovaný jav vplyvom Lugolovho roztoku a vysvetlíme. Popíšeme vzťah škrobu a zelených farbív chlorofylov k procesu fotosyntézy.

Kontrolné otázky

1. Aký je rozdiel medzi autotrofiou a heterotrofiou?
2. Aký je rozdiel medzi rastlinami a živočíchmi z hľadiska tvorby organických látok?
3. Aký je princíp chemosyntézy?
4. Vymenujte niekoľko predstaviteľov baktérii a spôsob ich produkcie organických látok.
5. Popíšte princíp fotosyntézy.
6. Čo je nevyhnutné pre priebeh fotosyntézy?
7. Aké farbivá sa zúčastňujú procesu fotosyntézy?
8. Aké produkty vznikajú v svetlej a aké v tmavej fáze fotosyntézy?
9. Popíšte rozdiel medzi C3, C4 a CAM rastlinami.
10. Aké metódy štúdia fotosyntézy v rastlinnej biológii poznáte?

Zaujímavosť

Svetlo je nevyhnutnou súčasťou života na Zemi. Svetelné žiarenie poháňa biochemické procesy fotosyntézy, pri ktorých rastliny vytvárajú z vody a oxidu uhličitého sacharidy a kyslík. Nevyhnutné pre tieto procesy sú chloroplasty. Vďaka svojej zložitej štruktúre zachytávajú v listoch energiu fotónov z červenej a modrej časti spektra a využívajú ju na oddelenie protónov a elektrónov v molekulách vody. Nežiaduce ultrafialové žiarenie zo Slnka môže byť pre bunky škodlivé a tak obsahujú bunky listov aj pigmenty, ktoré vnútorné vrstvy buniek chránia. Inou formou ochrany listov pred nadbytočným žiarením je ich schopnosť skláňania sa, aby zmiernili hrozbu spálenia. Eukalyptus (*Eucalyptus*) napríklad zvesí pri poludňajšom príliš intenzívnom slnečnom žiarení listy kolmo nadol. Na druhej strane kutikula na povrchu listu chráni vnútorné bunky listu od nadmerného vyparovania vody, ktorá je pre život stromov a ich proces fotosyntézy nevyhnutná. Svetelná energia sa premieňa na chemickú energiu a pritom sa uvoľňuje kyslík. Uhlík z oxidu uhličitého sa následne buď fixuje do jednoduchých sacharidov (monosacharidov) ako je glukóza a fruktóza alebo sa vo forme škrobu ukladá ako zásobná energia v semenách, koreňoch, či hlúzách. Počas slnečného dňa tak dospelý buk nadýcha približne 35 000 litrov vzduchu, z čoho sám spotrebuje 10 000 litrov. Vyprodukuje zároveň 12 kg monosacharidov a 13 kg kyslíka. V noci potom stromy zužitkujú nahromadenú energiu k produkcii ďalších organických látok. Vďaka dusíku v koreňoch sa transformujú monosacharidy na aminokyseliny a následne na liečivé či jedovaté alkaloidy, fenolové zlúčeniny, lipidy a ďalšie dôležité látky.

RASTLINNÉ PIGMENTY

Farebnú pestrosť prírody okolo nás spôsobujú **rastlinné pigmenty**. Sú to zložité organické látky schopné absorbovať vlnové dĺžky elektromagnetického žiarenia vo viditeľnej oblasti. Výnimkou je biela farba kvetov, ktorá nie je spôsobená farbivom, ale prítomnosťou vzduchu v intercelulárnych priestoroch. Rastlinné pigmenty sú pre existenciu rastlín, a tým aj pre existenciu života na Zemi, mimoriadne dôležité. Ich primárny význam spočíva vo fotosyntéze. Zohrávajú tiež dôležitú úlohu pri opeľovaní, slúžia ako ochrana pred negatívnymi účinkami ultrafialového žiarenia (fotodeštrukcia), absorbujú teplo, čím chránia citlivé generatívne orgány rastliny pred prehriatím. Komerčne sa rastlinné pigmenty využívajú v potravinárskom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle.

Rastlinné farbivá sa delia z dvoch hľadísk, podľa rozpustnosti a z chemického hľadiska. Podľa **rozpustnosti** rozoznávame hydrochrómy (rozpustné vo vode nachádzajúce sa vo vakuolách) a lipochrómy (rozpustné v tukoch a organických rozpúšťadlách a nachádzajú sa v plastidoch). Z **chemického hľadiska** rastlinné pigmenty delíme na chinónové, indolové, pyranové, karotenoidné a pyrolové farbivá.

Chinónové farbivá sú najrozšírenejšou skupinou prírodných farbív, ale k celkovému sfarbeniu prispievajú menej, lebo sa vyskytujú v koreňoch a kôre stromov a často sú prekryté inými farbivami. Výnimkou je pestré sfarbenie húb (*Fungi*) a lišajníkov (*Lichenes*). Z chemickej stránky vznikajú z fenolov, ktorých hydroxylová skupina sa viaže glykozidovou väzbou na sacharid. Spôsobujú aj tmavnutie poranených častí rastlín, na jeseň menia farbu listov, niektorých druhov hrušiek na tmavozelenú až čiernu (zmena chinónu na hydrochinón).

Indolové farbivá majú ako základ indol. Z tejto skupiny farbív je najznámejšie indigo z *Indigofera* ssp., ktoré sa využívalo už v staroveku. Ďalej sem patria betalainy z rodu *Beta* ssp. Indolové farbivá spôsobujú sfarbenie kvetov mnohých kaktusov. Nachádzajú sa tiež v klobúku muchotrávky červenej (*Amanita muscaria* L.) a v bulve repy cviklovej (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* L.).

Pyranové farbivá predstavujú veľmi pestrú skupinu zväčša hydrochrómových farbív, ktoré sa vyskytujú v glykozidickej forme a s dvoma pyrolovými jadrami. Dávajú žlté, červené, fialové alebo modré sfarbenie. Vyskytujú sa v kvetoch, plodoch a listoch. Najznámejšia je skupina flavonoidov (najmä antokyány) a tiež skupina chalkónov. **Flavonoidy** sú zväčša žltej farby (*flavus* = žltý), typické sú pre čeľade *Astraceae* a *Viciaceae*, známych ich je viac ako 400. **Antokyány** sú ich oxidované formy. Ich farebná škála je od modrej cez fialovú až červenú. Do značnej miery závisí farebný prejav antokyánov od pH prostredia. Ich názvy súvisia s rastlinami, v ktorých sa vyskytujú: pelargonín, petunidín, malvidín a podobne.

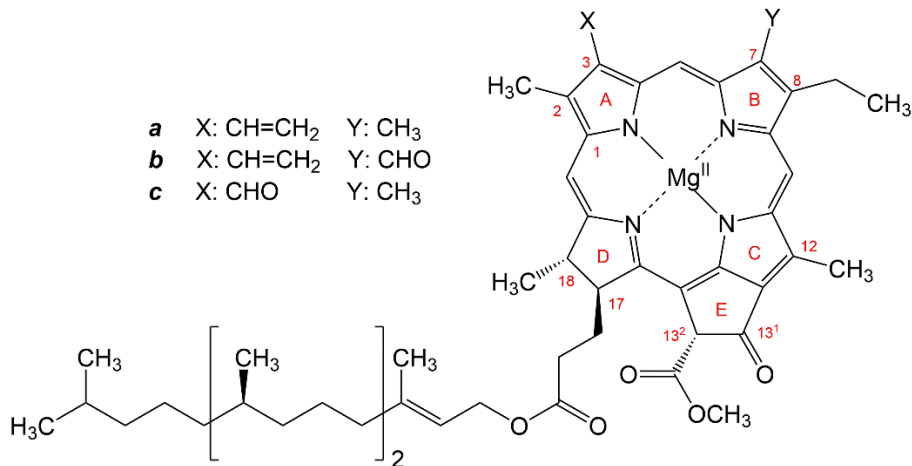
Karotenoidné farbivá patria medzi veľmi rozšírené rastlinné pigmenty (asi 270) v širokej farebnej škále od žltej, oranžovej až po červenú. Sú to tetraterpény. Vo svojich molekulách majú najčastejšie 40 uhlíkových atómov a ich konštitučnou jednotkou je molekula izoprénu. Ich farba je vyvolaná systémom väčšieho množstva konjugovaných dvojitéch väzieb (11 a viac). Tieto farbivá sa nazývajú polyénové. Sú lipofilné, rozpúšťajú sa v tukoch a v nepolárnych rozpúšťadlách. Rozdeľujú sa na primárne a sekundárne. Primárne karotenoidy

sú viazané na proteíny a nachádzajú sa v chloroplastoch ako súčasť fotosystémov. Sekundárne karotenoidy sa nachádzajú v chromoplastoch. Sú súčasťou kvetov, plodov, starnúcich vegetatívnych orgánov a tiel parazitických rastlín. Ich prítomnosť v listoch vyniká hlavne na jeseň, kedy sa chlorofyly, dovtedy prekrývajúce karotenoidy, rozkladajú. Karotenoidy je tiež možné rozdeliť na dve hlavné skupiny, a to bezkyslíkaté karotény a kyslíkaté xantofyly. **Karotény** dostali názov podľa toho, že boli izolované (1831) z koreňa mrkvy obyčajnej (*Daucus carota L.*). Existuje α -, β - a γ -karotén, ktoré sa od seba líšia štruktúrnym usporiadaním na konci molekuly. Najčastejší je β -karotén, ($C_{40}H_{65}$). Od α -karoténu sa líši len rozdielnou polohou dvojitej väzby v jednom z kruhov (iónové jadrá). γ -karotén má polyenový reťazec na jednom konci otvorený ako karotén lykopén – červené farbivo plodov rajčiaka jedlého (*Lycopersicon esculentum L.*) a melóna cukrového (*Melo sativus L.*). Toto farbivo má reťazec otvorený na oboch koncoch. Z hľadiska výživy človeka má význam β -karotén, ktorý je prekurzorom vitamínu A. **Xantofyly** majú ako najrozšírenejšie farbivo žltý luteín ($C_{40}H_{56}O_2$), derivát α -karoténu s hydroxylovou skupinou na α - a β -iónovom jadre. Sprevádza chlorofyl vo všetkých zelených častiach rastlín, nachádza sa v kvetoch a plodoch. Medzi xantofyly patrí rovnako aj žltý zeaxantín, ktorý sa nachádza napr. v zrnách kukurice siatej (*Zea mays L.*), violaxantín v zelených riasach (*Chlorophyta*) a v asimilačných orgánoch všetkých vyšších rastlín. Súčasťou tejto skupiny farbív sú aj β -kryptoxantín, anteroxantín, neoxantín a taxaxantín, ktoré bývajú súčasťou fotosystémov, ďalej červený rodoxantiín nachádzajúci sa v listoch niektorých druhov vyšších rastlín, hlavne v okrasných drevinách. Podobnú štruktúru majú aj červené farbivá kapsantín a kapsorubín v perikarpe plodov papriky ročnej (*Capsicum annum L.*). Význam karotenoidov v poslednej dobe rastie, pretože majú dokázané antioxidačné účinky, čo pôsobí preventívno-terapeuticky na zdravie človeka. Spolu s vitamínom C sú tieto látky jedny z najsledovanejších výskumných objektov z hľadiska vychytávania voľných radikálov.

Medzi **pyrolové farbivá** patria chlorofyly a fykobilíny. **Chlorofyly** sú najdôležitejšie fotosynteticky aktívne pigmenty rastlín. Vyskytujú sa vo všetkých autotrofných organizmoch, s výnimkou pigmentov baktérií. Molekula chlorofylu má cyklickú porfyrínovú štruktúru s 10 dvojitými väzbami, tvorenú 4 pyrolovými jadrami, ktoré sú spojené metínovými mostíkmi. V centre sa nachádza atóm horčíka. Po jeho odstránení vzniká feofytín. Ďalej je v chlorofyle cyklopentánové jadro, ktoré obsahuje karboxylovú skupinu viazanú esterickou väzbou s metanolom. Druhý alkoholový komponent (fytol) tvorí v molekule chlorofylu „chvost“ a je estericky spojený s kyselinou propiónovou na IV. jadre. Na pyrole I je vinylová skupina. Rozdiel medzi chlorofylom *a* ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) a chlorofylom *b* ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) je v tom, že chlorofyl *a* má na II. pyrole metylovú skupinu, zatiaľ čo chlorofyl *b* aldehydickú (Obrázok 8).

Obidva chlorofyly sa od seba líšia rozpustnosťou a absorpčným spektrom. Obidva pigmenty majú absorpčné maximum v modrofialovej časti spektra s vrcholmi pri 430 nm a 455 nm. Druhé absorpčné vrcholy sú v červenej časti spektra, pri 664 nm a 648 nm. Absorpčné maximá týchto pigmentov súčasne poukazujú na fotosyntetickú najúčinnnejšiu časť spektra. Porfyrínová štruktúra chlorofylov je dominantnou štruktúrou celého radu ďalších biologicky vysoko aktívnych látok nazývaných hémy: červeného krvného farbiva hemoglobín

obsahujúceho železo, červeného farbiva nitrogénnych baktérií leghemoglobínu obsahujúceho molybdén, červeného myoglobínu vo svalových bunkách, oxido-redukčného enzýmu cytochrómu obsahujúceho železo. Všetky molekuly majú význam pri prenose kyslíka a elektrónov v biologických štruktúrach.



Obrázok 8: Rozdiel medzi chlorofylmi nachádzajúci sa v rastlinách z pohľadu ich štruktúry. Písmená a, b, c predstavujú rôzne funkčné skupiny na pozícii X a Y.

Úloha č. 1: Oddelenie chlorofylu od karotenoidov pomocou rozpúšťadiel

Teoretický úvod: Z čerstvého rastlinného materiálu sa farbivá plastidov najlepšie extrahujú polárnymi rozpúšťadlami (etylalkohol, acetón). Nepolárnymi rozpúšťadlami (hexán, petroléter) môžeme kvantitatívne extrahovať karotény. Chlorofyly a xantofyly sa nepolárnymi rozpúšťadlami neextrahujú, resp. extrahujú len veľmi ťažko. Je to spôsobené tým, že chlorofyly a xantofyly sú v plastidoch viazané vo forme lipoproteínových komplexov, ktoré apolárne rozpúšťadlá nerozrušujú. Polárne rozpúšťadlá naproti tomu rozrušujú všetky lipoproteínové komplexy. Najznámejším xantofylom je luteín, nachádzajúci sa v listoch a v niektorých druhoch rias: *Rhodophyceae*. Xantofyl violaxantín sa nachádza v hnedých riasach. Benzín, ktorý sa oddelí od alkoholu, viaže na seba chlorofyly a a b, ktoré spôsobujú zafarbenie roztoku na zeleno. Spodná alkoholová vrstva je v odtieňoch žltej, prípadne okrovej a je spôsobená prítomnosťou karoténu a xantofylov.

Objekt: zelené listy trávy (50-100 g), zelené listy stromov (50-100 g).

Pomôcky: trecia miska, nožnice (alebo skalpel), lyžička, kadičky, stojan na skúmavky, skúmavky, vrchnák na skúmavky.

Chemikálie: morský piesok, 96 % (v/v) etanol, benzín.

Pracovný postup: Z rastlinného materiálu pripravíme alkoholový extrakt plastidových farbív. Zelené listy v množstve 10 g rozrežeme na drobné kúsky a homogenizujeme v trecej miske za prítomnosti malého množstva morského piesku a asi 10 ml čistého liehu (96 % EtOH). Homogenát aj s rastlinným materiálom spláchneme do 50 ml kadičky a premyjeme 10 ml etanolu. Do jednej skúmavky napipetujeme 3 ml alkoholového extraktu plastidových farbív a

rovnaký objem (3 ml) benzínu. Skúmavku dobre uzavrieme, pretrepeme, potom pridáme niekoľko kvapiek destilovanej vody a necháme ustáť. Do druhej skúmavky napipetujeme 6 ml alkoholového extraktu plastidových farbív, pridáme niekoľko kvapiek vody a tiež necháme ustáť. V prvej skúmavke pozorujeme oddelenie chlorofylov od karotenoidov a druhú skúmavku použijeme na porovnanie. Do skúmavky č. 3 napipetujeme 6 ml alkoholového extraktu a táto skúmavka slúži ako kontrola.

Doba trvania: 45 min.

Výsledky: Porovnaním s kontrolou popíšeme vzniknuté farebné zmeny v skúmavkách, vysvetlíme príčinu zmien a separované farbivá.

Úloha č. 2: Extrakcia antokyánov a závislosť ich zafarbenia od pH

Teoretický úvod: Extrakcia je difúzna separačná metóda, pri ktorej sa z kvapalnej alebo tuhej zmesi oddelí vyžadovaná zložka rozpúšťaním v extrakčnom rozpúšťadle, ktoré sa s ostatnými zložkami pôvodnej zmesi nemieša alebo sa s nimi mieša len obmedzene. Extrakcia z tuhých látok sa nazýva niekedy aj vylúhovanie. Výsledkom je vytvorenie dvoch fáz: extrakt a rafinát. Vodné roztoky antokyánov menia farbu v závislosti od pH roztoku. Vzhľadom k tejto skutočnosti sa označujú ako prirodzené indikátory pH prostredia. V neutrálnom prostredí je ich farba medzi fialovou a modrou. V kyslom prostredí, kedy dochádza k zvyšovaniu koncentrácie iónov H^+ , sa ich zafarbenie postupne mení od fialovej cez červenú až na jasnočervenú. V zásaditom prostredí pri zvyšovaní koncentrácie iónov OH^- pozorujeme zmenu zafarbenia antokyánov od modrej cez zelenú až po žltú.

Objekt: listy kapusty červenej (*Brassica oleracea* cv. *capitata* L.), plody vtáčieho zobu (*Ligustrum vulgare* L.), plody brusnice čučoriedkovej (*Vaccinium myrtillus* L.), prípadne iné plody fialovej alebo purpurovej farby.

Pracovné pomôcky: Petriho miska, trecia miska, skalpel, kadičky, odmerný valec, vodný kúpeľ, aparatura na filtrovanie, skúmavky, pipeta, stojan na skúmavky, lakmusové papieriky.

Chemikálie: 10 % (w/v) NaOH, 10 % (v/v) HCl.

Pracovný postup: Listy červenej kapusty, prípadne plody (vtáčieho zobu, brusnice čučoriedkovej a podobne) v množstve 10 g rozrežeme na drobné kúsky, vložíme do kadičky s 25 ml destilovanej vody a zahrejeme do varu a ihneď odstavíme. Varom sa z rastlinného materiálu extrahujú vo vode rozpustné antokyánové farbivá. Z roztoku potom filtráciou odstránime zvyšky rastlinného materiálu. Do skúmavky napipetujeme 5 ml filtrátu a zmeriame pH. K filtrátu pridáme niekoľko kvapiek roztoku HCl, zmeriame pH a zároveň pozorujeme farebné zmeny. Potom pridáme do skúmavky niekoľko kvapiek NaOH, pozorujeme farebné zmeny a zaznamenáme pH. Do druhej skúmavky pridáme k 5 ml filtrátu po kvapkách roztok NaOH, pozorujeme farebné zmeny a zaznamenáme pH roztoku.

Doba trvania: 30 min.

Výsledky: Zapišeme a vysvetlíme, aké farebné zmeny antokyánov sme sledovali v závislosti od pH prostredia. Popíšeme, či je zmena zafarbenia proces reverzibilný alebo ireverzibilný.

Úloha č. 3: Chromatografické delenie antokyánov a flavonoidov pomocou papierovej chromatografie

Teoretický úvod: Chromatografia sa využíva ako rýchla a jednoduchá metóda najmä na kvalitatívne posúdenie zloženia zmesi, sledovanie priebehu reakcií a porovnávanie štandardov. Túto metódu je možné použiť aj na kvantitatívne rozdelenie malých množstiev zmesí, ktorých jednotlivé zložky majú dostatočne rozdielne R_f (retardačné, retenčné) hodnoty. Stacionárnou fázou je kvapalina zakotvená na chromatografickom papieri a mobilnou fázou organické rozpúšťadlo alebo zmes rozpúšťadiel (napr. butanol, pentán, acetón), ktoré sa pohybujú vďaka kapilárnym silám (vzlínanie).

Objekt: roztok antokyánov z Úlohy č. 1, prípadne fialové alebo žlté kvety fialky sirôtky (*Viola maxima* L.), slezu liečivého (*Malva alcea* L.), prípadne kvety pelargónie (*Pelargonium* spp.).

Pracovné pomôcky: kadička, dve veľké Petriho misky, malá Petriho miska, UV lampa, chromatografický papier, skalpel, kadička, pipeta.

Chemikálie: 2 M HCl, 0,5 M HCl, butanol.

Pracovný postup: Korunné lupienky kvetov zalejeme v malej kadičke minimálnym množstvom 0,5 M HCl a necháme 45 min extrahovať. Vyextrahované farbivo nanesieme do stredu kruhového chromatografického papiera s priemerom o 1 cm väčším ako je priemer veľkej Petriho misky (11 cm). Priemer škvry nesmie byť väčší ako 1 cm, pričom farbivo nanášame vo viacerých vrstvách a každú necháme zaschnúť. Stred chromatografického papiera prevrtáme skalpelom a do otvoru zasunieme malý papierový valček ako knôt s dĺžkou cca 2 cm. Vytvájaciu sústavu si pripravíme zmiešaním rovnakého objemu 2 M HCl a butanolu. Oba roztoky dobre premiešame a necháme stáť, kým sa neoddelia dve fázy. Hornú butanolovú vrstvu použijeme ako mobilnú fázu a vlejeme ju do malej Petriho misky, ktorú vložíme do stredu veľkej Petriho misky. Dolnú vodnú fázu použijeme na nasýtenie chromatografickej komory, vlejeme ju opatrne do veľkej Petriho misky okolo malej misky s mobilnou fázou. Kruhový papier s nanesenou vzorkou vložíme medzi dve veľké Petriho misky s knôtom ponoreným do mobilnej fázy. Vytváraním sa vytvoria početné koncentrické kruhy antokyánov a flavonoidov, ktoré môžeme dobre pozorovať ožiarením vysušeného chromatografického papiera UV svetlom (vlnová dĺžka cca 300 – 400 nm).

Doba trvania: 75 min.

Výsledky: Popíšeme spôsob separácie antokyánov a vzniknuté škvry ako výsledok papierovej chromatografie.

Úloha č. 4: Chromatografia karotenoidov na tenkej vrstve

Teoretický úvod: Karotenoidy sú rastlinné farbivá rozpustné v tukoch, v prírode hojne zastúpené vo všetkých rastlinných druhoch, obvykle sfarbené na žlté, oranžové a červené. Z chemického hľadiska je možné karotenoidy zaradiť do skupiny terpenoidov, to znamená látok odvodených od izoprénových podjednotiek. Extrakt z papriky ročnej (*Capsicum annum* L.) obsahuje 37 až 54 pigmentov, počet závisí na spôsobe izolácie. Väčšina z nich je na báze karotenoidov. Hlavným pigmentom papriky je červený kapsantín a kapsorubín, žlté-oranžové β -karotén a žltý luteín a xantofyly. Karotenoidy z rôznych rastlinných substrátov sa chromatograficky separujú v nepolárnej zmesi heptánu a dietyléteri. Pohyblivosť jednotlivých molekúl závisí na ich polarite, tzn. predovšetkým na počte hydroxy- skupín.

Objekt: extrakt karotenoidov (napr. extrakt zo sušenej papriky červenej alebo v lekárni kúpeného β -karoténu).

Pracovné pomôcky: Erlenmeyerova banka, aparátúra na filtrovanie, odparovacia banka, filtračný papier, silikagél (Silufolová platňa), kadičky, pipety, odmerný valec, mikrokapilára, veľká Petriho miska, ceruzka, fén.

Chemikálie: dietyléter, heptán.

Pracovný postup: 0,5 g červenej sušenej papriky, paradajky, mrkvy alebo kukurice extrahujeme spolu s 15 ml dietyléteri v 50 ml Erlenmeyerovej banke v prítomnosti 0,5 – 1,0 g bezvodého síranu horečnatého pri občasnom premiešaní. Následne roztok prefiltrujeme a prebytočné rozpúšťadlo odparíme na rotačnej vákuovej odparke. Takmer suchý odparok rozpustíme v 1 ml zmesi 15 % (v/v) dietyléter - 85 % (v/v) heptán. Pri analýze karotenoidov použijeme silikagél (Silufolová platňa) ako stacionárnu fázu a zmes dietyléter : heptán zmiešané v pomere 1:6 (v/v) ako mobilnú fázu (vyvíjacia zmes). Nádobu na vyvíjanie TLC platní pripravíme tak, že do 250 ml kadičky vložíme predsušenú a na laboratórnu teplotu ochladenú filtračný papier, ktorý umiestnime po obvode celej kadičky. Následne pridáme vyvíjajúcu zmes max. do výšky 5 mm a kadičku zakryjeme sklenenou Petriho miskou. Extrakt karotenoidov nanášame na predsušenú (aktivovanú) platňu s rozmermi 5 x 10 cm mikrokapilárou v podobe škvŕn s maximálnym priemerom 5 mm a to 1 cm od spodného okraja platne, kde si opatrne ceruzkou naznačíme štartovaciu líniu. Po odparení rozpúšťadla z nanesených vzoriek opatrne umiestnime platňu do vyvíjajúcej nádoby, ktorú následne prikryjeme sklenenou Petriho miskou. Počas vyvíjania pozorujeme priebeh separácie a po dosiahnutí čela rozpúšťadla vo vzdialenosti cca 1 cm od horného okraja platne platňu vytiahneme a ceruzkou označíme čelo rozpúšťadla. Platňu vysušíme fénom. Následne vizualizujeme škvŕny pri viditeľnom svetle a pri 280 a 360 nm. Počas vizualizácie pozorované škvŕny zakrúžkujeme ceruzkou. Vyvinutú TLC platňu prekreslíme do zošita a do tabuľky uvedieme R_f pozorovaných škvŕn a ich farbu pri rôznom type osvetlenia. R_f hodnoty vypočítame ako podiel vzdialenosti stredu škvŕny od štartu (a) a vzdialenosti čela mobilnej fázy od štartu (b):

$$R_f = a/b$$

R_f je funkciou adsorbčnej schopnosti stacionárnej fázy a pre danú látku závisí od systému, v ktorom je meraný, t.j. od teploty, druhu adsorbentu a od zloženia mobilnej fázy.

Doba trvania: 35 min.

Výsledky: Chromotogram vyhodnotíme, zapíšeme všetky R_f hodnoty škvŕn pri viditeľnom svetle a pri UV svetle pri vlnových dĺžkach 280 a 360 nm.

Úloha č. 5: Extrakcia listových farbív

Teoretický úvod: V listoch zelených rastlín sa nachádza viacero farbív, ktoré sa zúčastňujú procesu fotosyntézy a aj iných procesov regulovaných svetlom. Najznámejším farbivom je zelený chlorofyl. Ďalšie farbivá sú napr. deriváty chlorofylov a karotenoidy. Poznáme dva druhy chlorofylu - chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Chlorofyl *a* sa dá od chlorofylu *b* rozlíšiť na základe spektrálnych vlastností. Karotenoidné farbivá sú odvodené od alfa- a beta-karoténov zavedením molekuly kyslíka (xantofyly). Beta-karotén je najpočetnejšie zastúpeným karotenoidom v zelených listoch rastlín. Ďalšími karotenoidmi sú alfa-karotén a lykópén, xantofyly sú napr. luteín, violaxantín. Hlavnou úlohou karotenoidov je absorpcia svetla. Karotenoidy absorbujú energiu v modrej oblasti spektra a prenášajú ju na chlorofyly. Extrakty zelených farbív použijeme v ďalších experimentoch na delenie plastidových farbív kapilárnou analýzou, papierovou chromatografiou a tenkovrstvovou chromatografiou a na hydrolýzu chlorofylu na feofytín.

Objekt: zelené listy.

Pracovné pomôcky: trecia miska, nožnice, laboratórna lyžička, kadička, odmerný valec, pipeta, aparátúra na filtrovanie.

Chemikálie: morský piesok, uhličitan vápenatý, síran sodný bezvodý, 80 % (v/v) acetón.

Pracovný postup: Odvážime 1,5 g čerstvých zelených listov a rozstriháme ich na malé kúsky. Tieto rozotrieme s lyžičkou morského piesku a lyžičkou uhličitanu vápenatého a 10 ml 80 % acetónu. Zmes prefiltrujeme do kadičky, pričom na filtračný papier dáme lyžičku síranu sodného bezvodého. Zvyšok v trecej miske premyjeme 20 ml acetónu. Filtrát prelejeme do odmerného valca a doplníme na objem 50 ml. Extrakt listových farbív použijeme na ďalšie, nižšie uvedené analýzy.

Doba trvania: 25 min.

Výsledky: Popíšeme vlastnosti extraktu pri jeho pozorovaní voľným okom proti svetlu a vysvetlíme spôsob extrakcie v danom rozpúšťadle.

Úloha č. 6: Delenie plastidových farbív kapilárnou analýzou

Teoretický úvod: Delenie látok na základe kapilárnej analýzy sa od chromatografického delenia odlišuje tým, že pri kapilárnej analýze vzlína po papieri roztok látky a nie čisté rozpúšťadlo ako pri chromatografii. Pri chromatografickom delení roztok látky nanesieme na papier a papierom necháme pretekať alebo vzlínať čisté rozpúšťadlo.

Objekt: acetónový extrakt listových farbív.

Pracovné pomôcky: Petriho misky, kadičky, odmerná banka, odmerný valec, veľká kadička.

Chemikálie: metanol, petroléter.

Pracovný postup: Extrakt listových farbív nalejeme do Petriho misky a do nej ponoríme pás filtračného chromatografického papiera široký 2 cm a dlhý 20 cm. Pás papiera zavesíme na odmernú banku alebo odmerný valec. Vedľa Petriho misky položíme malú kadičku s 10 ml roztoku zmesi petroléter:metanol (1:1; v/v). Všetko prikryjeme veľkou kadičkou, aby delenie prebiehalo v atmosfére nasýtenej parami rozpúšťadla. Farbivá z roztoku budú vzlínať papierom a rozdelia sa do pásov. Keď rozpúšťadlo dosiahne vzdialenosť 1 cm od vrchného okraja, delenie ukončíme. Papier vysušíme fénom alebo na vzduchu a vyhodnotíme. Najvyššie vystúpi rozpúšťadlo, žltý pás patrí karotenoidom a pod nimi sú chlorofyly.

Doba trvania: 25 min.

Výsledky: Popíšeme, aké rôzne rastlinné farbivá sa nám podarilo extrahovať v extrakte listových farbív a akou farbou sa prejavili na chromatografickom papieri. Popíšeme ich význam v rastlinnom organizme.

Úloha č. 7: Delenie plastidových farbív pomocou papierovej chromatografie

Teoretický úvod: Postupne od čela vyvíjacej zmesi by sme v závislosti od použitej vyvíjacej zmesi mohli detegovať nasledovné farbivá: beta-karotén, luteín, zeaxantín, chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a v mieste nanosenia vzorky by mohli byť pozorovateľné vyseparované chlorofylíny.

Objekt: acetónový extrakt listových farbív.

Pomôcky: Petriho misky, kadičky, odmerný valec, pipety, chromatografický papier.

Chemikálie: metanol, petroléter, benzín, benzén, chloroform, acetón, izopropanol, toluén, hexán.

Postup: Pripravíme si pásy chromatografického papiera dlhé 15 cm a široké 6 cm. 1 cm od okraja si nakreslíme ceruzkou štartovaciu čiaru, na ktorú nanesieme vo viacerých vrstvách extrakt listových farbív v dĺžke škrvny cca 2 cm. Dôležité je, aby sme vzorku nanášali tak, aby bol celý 2 cm pás približne rovnako široký všade. Po nanesení vzorky necháme papier vyvíjať v niektorej z nasledovných vyvíjacích zmesí: i) benzín:benzén:chloroform:acetón:izopropanol

(50:35:10:0,5:0,17; v/v/v/v/v), ii) toluén:hexán:metanol (400:3:3; v/v/v), iii) petroléter:izopropanol (99:1; v/v), iv) petroléter:chloroform (3:1; v/v) alebo v) toluén:benzén:metanol (200:1:1; v/v/v). Zmes nalejeme do väčšej kadičky (objem 250 – 600 ml) do výšky maximálne 0,8 mm. Vložíme papier tak, aby štartovacia čiara bola nad vyvíjacou zmesou a nebola v nej ponorená. Kadičku rýchlo po vložení papiera uzatvoríme veľkou Petriho miskou. Separáciu uskutočňujeme v tme uložením kadičky do skrinky v laboratóriu alebo kadičku obalíme alobalom, prípadne iným svetlo-nepriepustným materiálom. Keď rozpúšťadlo dosiahne vzdialenosť 1 cm od vrchného okraja papiera, delenie ukončíme. Papier vytiahneme, vysušíme fénom alebo na vzduchu a vyhodnotíme.

Doba trvania: 45 min.

Výsledky: Popíšeme, aké rôzne rastlinné farbivá sa nám podarilo separovať v extrakte listových farbív a akej sa javili farby na chromatografickom papieri. Popíšeme ich význam v rastlinnom organizme.

Úloha č. 8: Delenie plastidových farbív pomocou tenkovrstvovej chromatografie

Teoretický úvod: Pomocou TLC môžeme rozdeliť zmes plastidových farbív vďaka tomu, že majú rôznu afinitu k polárnemu povrchu silikagélu a sú rôzne rozpustné v nepolárnom organickom rozpúšťadle (mobilná fáza). Nepolárne zlúčeniny dobre rozpustné v nepolárnom rozpúšťadle prejdú na platničke väčšiu vzdialenosť ako polárne zlúčeniny, ktoré sa pevnejšie viažu na silikagél a pohybujú sa teda pomalšie. Tabuľka 2 znázorňuje poradie (vzhľadom na štartovaciu líniu) a farebný prejav jednotlivých farbív.

Tabuľka 2: Poradie farbív na tenkej vrstve silikagélu zoradených od najvyššej hodnoty R_f (β -karotén) po najnižšiu hodnotu R_f (neoxantín).

Farbivo	Farba	Rozpúšťadlo
β -karotén	Oranžovočervená	Hexán
Chlorofyl <i>a</i>	Modrozelená	Acetón
Chlorofyl <i>b</i>	Zelenožltá	Acetón
Luteín	Žltá	Etanol
Violaxantín	Svetložltá	Etanol
Neoxantín	Svetložltá	Etanol

Objekt: acetónový extrakt rastlinných listových farbív.

Pracovné pomôcky: silikagélové platničky, kadička, pipeta, odmerný valec, pravítko, ceruzka, Petriho miska, teplovzdušný fén.

Chemikálie: hexán, acetón.

Pracovný postup: Pripravíme si vyvíjaciu zmes (hexán : acetón v pomere 65 : 35; v/v) a do kadičky s objemom 250-400 ml nalejeme zmes do výšky cca 1 cm. Na silikagélovú platničku s

rozmerom 2 x 18 cm si vo vzdialenosti 1 cm od spodného okraja urobíme štartovaciu líniu. Do jej stredu nanesieme acetónový roztok listových farbív. Šírka nanesej vrstvy nesmie byť väčšia ako 1 cm. Nanesený extrakt farbív vysušíme voľne na vzduchu alebo pomocou fénu. Platničku vložíme do kadičky s vyvíjacou zmesou, kadičku uzavrieme Petriho miskou a necháme separovať. Vyvinuté škvrny by mali byť v poradí: neoxantín, violaxantín, luteín, chlorofyl b, chlorofyl a a beta-karotén, pričom poradie je od uvedené od najnižšej hodnoty R_f po najvyššiu. Pozorujeme pri dennom svetle i pri UV. Vypočítame R_f pre jednotlivé separované farbivá.

Doba trvania: 30 min.

Výsledky: Popíšeme jednotlivé vyseparované farbivá, ich farebný prejav, R_f a význam v rastlinnom organizme.

Úloha č. 9: Hydrolýza chlorofylu na feofytín

Teoretický úvod: V kyslom prostredí sa z chlorofylu odštiepuje horčík, pričom dochádza k zmene zafarbenia chlorofylu zo zelenej farby do hnedá.

Objekt: acetónový extrakt listových farbív.

Pracovné pomôcky: skúmavka, pipeta, kvapkadlo.

Chemikálie: koncentrovaná HCl.

Pracovný postup: Do skúmavky nalejeme 5 ml acetónového roztoku listových farbív. Kvapneme do roztoku niekoľko kvapiek koncentrovanej HCl a niekoľko kvapiek destilovanej vody. Po premiešaní roztoku sa zelená farba pôvodného roztoku zmení na olivovohnedú, čo je spôsobené vznikom feofytínu, pričom dochádza k odštiepeniu horčíka.

Doba trvania: 10 min.

Výsledky: Popíšeme a vysvetlíme pozorovaný jav hydrolýzy chlorofylových farbív.

Úloha č. 10: Delenie chlorofylu a karotenoidov papierovou chromatografiou, frontálna analýza

Teoretický úvod: Pri tomto spôsobe separácie slúži vzorka súčasne aj ako mobilná fáza a preto sa kontinuálne privádza do systému alebo je kontinuálne súčasťou systému. Ako prvá pri separácii začne zo systému vychádzať najmenej sorbovaná zložka, neskôr sa v eluáte objaví aj ďalšia zložka, ktorá má väčšiu afinitu k sorbentu, po čase zložka s ešte väčšou afinitou k sorbentu až sa nakoniec separuje eluát s obsahom všetkých zložiek. V tomto stave sa posledný eluát zložením vyrovnal pritekajúcej vzorke, chromatografický systém je nasýtený, ďalšia separácia zložiek nie je možná. Frontálna analýza sa nepoužíva veľmi často v analytickej praxi. Dôvodom je, že touto technikou možno získať v čistom stave len prvú

elujúcu sa zložku a po každej analýze je potrebné náplň kolóny regenerovať alebo ju vymeniť. Táto chromatografická technika sa využíva na kontrolu technických procesov a pri výskume sorpčných procesov. V našom prípade ide o dokumentáciu jednej z možností, ako separovať rastlinné pigmenty. Na filtračnom papieri pozorujeme tri prúžky reprezentujúce tri základné listové pigmenty: najvyššie je žltý pruh tvorený kyslíkatými karotenoidmi, pod ním zelený pruh chlorofylov a a b a najnižšie slabo žltý pruh bezkyslíkatých karotenoidov.

Objekt: acetónový extrakt listových farbív.

Pracovné pomôcky: stojan na skúmavky, skúmavky (20 mm x 180 mm), pásik filtračného papiera, pipeta (5 ml).

Pracovný postup: Do skúmavky napipetujeme 3 ml vyextrahovaného chlorofylu z úlohy č. 4. Do extraktu vložíme pásik filtračného papiera (široký a dlhý tak, aby sa do skúmavky vmestil). Po 20 minútach filtračný papier vyberieme a necháme uschnúť. Pozorujeme rozdelenie chlorofylov na filtračnom papieri.

Doba trvania: 30 min.

Výsledky: Popíšeme, aké rôzne rastlinné farbivá sa nám podarilo separovať v extrakte listových farbív a akej sa javili farby na chromatografickom papieri. Popíšeme ich význam v rastlinnom organizme.

Kontrolné otázky

1. Aký je rozdiel medzi hydrochrómami a lipochrómami?
2. Ako rozdeľujeme z chemického hľadiska prírodné farbivá?
3. Popíšte pyrolové farbivá.
4. Vymenujte aspoň dve farbivá zo skupiny xantofylov.
5. Do akej skupiny zaraďuje antokyány?
6. Ako pH vplyva na flavonoidné farbivá?
7. Ako môžeme rozdeliť karotenoidy a prečo sú dôležité pre rastliny?
8. Čo je extrakcia?
9. Ako by ste vypočítali retardačný (retenčný) faktor?
10. Ako by ste uskutočnili tenkovrstvovú chromatografiu katorenoidov?

Zaujímavosť

Viete, že svetlom je možné ovplyvniť rastlinu v jej kvitnutí? Stačí, ak použijete tmavočervené svetlo. Rastliny vnímajú svetlo inak ako ľudské oko. Ide hlavne o rozdielnu spektrálnu citlivosť. Ľudské oko je najcitlivejšie na vlnové dĺžky približne uprostred spektra viditeľného žiarenia, rastliny majú naopak najvyššiu citlivosť v oblastiach krajného viditeľného spektra, teda v modrej (s maximom asi 450 nm) a červenej (s maximom asi 660 nm) časti spektra viditeľného žiarenia. Rastliny reagujú na pomer energie v rôznych farebných spektrách svetla, a tak je možné ovplyvniť faktory rastu (tvar, správny rast),

nutričný obsah, chuť plodu a rýchlosť kvitnutia. Zatiaľ, čo modré svetlo rastlina využíva k distribúcii rastových hormónov a prispôsobuje svoj tvar (množstvo listov) k intenzite a smeru žiarenia, červené svetlo využíva rastlina k fotosyntéze a k rastu stonky (tzv. naťahovanie sa za slnkom). Červené svetlo tiež reguluje kvitnutie a klíčenie semien.

RASTLINNÉ REGULÁTORY RASTU A VÝVINU

Fytohormóny alebo regulátory rastu a vývinu rastlín, rastlinné rastové hormóny sú látky, ktoré určitým spôsobom ovplyvňujú rast a vývin rastlín. Na fyziologické procesy rastliny môžu vplývať pozitívne (stimulátory rastu) alebo negatívne (inhibítory rastu). Toto rozdelenie je všeobecné, pretože tá istá látka v optimálnych koncentráciách môže pôsobiť stimulačne a vo vyšších koncentráciách určitý proces inhibuje.

V rastlinách sa fytohormóny vyskytujú v nízkych koncentráciách. Miesta ich vzniku a účinku sú rozdielne. Ich transport sa uskutočňuje pomocou vodivých dráh rastliny. Majú široké spektrum účinku, každý fytohormón môže ovplyvňovať celkom rozdielne procesy. Veľmi dôležitá je ich funkcia v endogénnej regulácii metabolizmu, ktorá je spojená s rastom, vývinom a morfogenezou. Zúčastňujú sa aj pri regulácii metabolizmu orgánov, ktoré už rast a vývin ukončili. Veľmi dôležitú úlohu zohrávajú v koreláciách medzi jednotlivými orgánmi v rámci celistvosti rastlinného organizmu.

Klasické delenie fytohormónov je na **stimulátory** a **inhibítory**. Okrem menovaných skupín fytohormónov sú známe aj iné látky s preukázateľnými regulačnými účinkami v rastlinách (kyselina jasmónová, kyselina fazeová, kyselina kukurbitová a iné).

Medzi **stimulátory** patria auxíny, gibberelíny a cytokiníny. **Auxíny** sa tvoria vo vrcholových meristémoch, smer ich prúdenia v cievnych zväzkoch je bazipetálny (tvoriaci sa na vrchole) alebo akropetálny (postupujúci smerom zdola k vrcholu orgánu. Natívne auxíny sú z chemickej stránky kyselina β -indolyloctová (IAA) a prekursorom jej tvorby je aminokyselina tryptofán. Fyziologické účinky auxínov sú rôznorodé. Tie najvýznamnejšie sú napríklad apikálna dominancia, predlžovanie buniek, polarita, tvorba adventívnych koreňov, partenokarpia, činnosť kambia, transport vody, kvitnutie dlhodenných rastlín, zabraňovanie opadávaníu listov, fototropizmus a geotropizmus. Synteticky pripravené látky auxínoveho typu sa nazývajú auxinoidy. Niektoré z nich majú silnejšie účinky ako natívne. Do skupiny auxinoidov patria kyselina α -naftyloctová (NAA) alebo 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D). Používajú sa napríklad pri zakoreňovaní odrezkov drevín. Spolu s cytokinínmi sú základnou zložkou v médiách pre pletivové *in vitro* kultúry. **Gibberelíny** sú terpenoidné zlúčeniny (cyklické diterpény) a neexistujú ich syntetické analógy. Označujú sa ako GA₁, GA₂ a GA₃ a je známych približne 125 gibberelínov v prírode. Gibberelíny sa tvoria hlavne v mladých pletivách, ako sú najmladšie lístky, v apexe výhonu, v koreňoch a v semenách. Ich pôsobenie je spojené predovšetkým s rastom stonky (stimulujú bunkové delenie a predlžovací rast) a po ich aplikácii dosahujú rastliny výraznejší vyšší vzrast. Okrem toho stimulujú bunkové delenie a predlžovací rast, stimulujú delenie buniek v kambiu, partenokarpiu (vývin plodov bez oplodnenia), narúšajú dormáciu púčikov a semien a aktivizujú enzýmy endospermu pri klíčení. **Cytokiníny** sa tvoria v koreni, odkiaľ sa xylémovým tokom spolu s vodou dostávajú do ostatných častí rastlín, floémovým tokom sa môžu vracieť späť do koreňov. Z chemickej stránky sú to rozkladné produkty DNA, hlavne deriváty adenínu. Natívnym cytokinínom je zeatín, dihydrozeatín a IPA (6- γ , γ -izopentenyladenín). Tieto formy natívnych cytokinínov sa nachádzajú v endosperme suchých a klíčiach semien obilnín a strukovín, v listoch, koreňoch

a vyvíjajúcich sa plodoch. Hlavný fyziologický účinok cytokinínov je pri delení buniek (*cytokinesis* – delenie) a ich predlžovaní. Rušia apikálnu dominanciu a tým napomáhajú rastu bočných púčikov a výhonkov. Spomaľujú starnutie listov a pletív tým, že stimulujú tvorbu RNA a proteínov a spomaľujú degradáciu chlorofylov. Čo sa týka syntetických analógov, najznámejšie sú kinetín (6-furfurylaminopurín, ktorý vzniká autoklávaním kvasiniek v kyslom prostredí) alebo BAP (6-benzylaminopurín).

K **inhibítorm** zaraďujeme kyselinu abcisovú, fenolové látky a etylén. **Kyselina abcisová** (ABA) je látka všeobecne rozšírená v rastlinách, mikroorganizmoch a nachádza sa aj v pôde. Z chemického hľadiska je to látka terpenoidného charakteru odvodená metabolickými dráhami od kyseliny mavalónovej, podobne ako giberelíny. Fyziologické procesy ABA sú v mnohých ohľadoch v protiklade s látkami, ktoré zaraďujeme medzi stimulatory. Známy je predovšetkým antagonistický vzťah medzi ABA a giberelínmi. Hlavný význam ABA spočíva v navodzovaní dormancie púčikov, semien a hľúz. Rovnako spôsobuje opadávanie listov a plodov. Silne potláča predlžovací rast buniek a tým, že potláča syntézu RNA, spôsobuje starnutie buniek. **Fenolové látky** patria medzi natívne inhibítory. Patria medzi ne napríklad kyselina salicylová, škoricová a *p*-kumarová a od nich odvodené deriváty ako sú kumarín alebo skopoletín. Ich účinok spočíva v oxidatívnom odbúravaní IAA tak, že podporujú činnosť IAA-oxidázy. Tým spôsobujú inhibíciu predlžovacieho rastu, dormanciu púčikov, hľúz a semien. **Etylén** je plyn s chemickou štruktúrou $\text{CH}_2=\text{CH}_2$, ktorý produkujú všetky rastúce pletivá, najmä však dozrievajúce plody rastlín. Fyziologické pôsobenie etylénu je inhibícia polárneho transportu auxínov, čo spôsobuje opadávanie listov, a inhibuje regeneráciu odrezkov. Najznámejšie využitie etylénu je dozrievanie dovážaných nezrelých plodov exotického ovocia a urýchľovanie dozrievania niektorých typov semien, tiež indukcia kvitnutia niektorých druhov rastlín.

Klasický test stanovenia fytohormónov je **biotest**. Je to metóda, pomocou ktorej môže byť biologicky aktívna látka na základe jej účinku na živý systém dokázaná alebo kvantitatívne stanovená. Ide o reakcie rastlinných orgánov, v ktorých sa tieto látky nachádzajú vo zvýšenom množstve a na ktoré tieto orgány špecificky a veľmi citlivo reagujú. Na začiatku výskumu umožňujú biotesty identifikáciu sledovanej skupiny fytohormónov a sú pomocou pri izolácii čistého preparátu. V niektorých prípadoch sú jediným nástrojom na identifikáciu fytohormónu, obzvlášť ak nie je známa štruktúra aktívnej látky. Na začiatku chemického výskumu sú totiž obyčajné chemické metódy identifikácie málo citlivé a špecifické. Biotesty sú však zaťažené viacerými analytickými chybami. Ich uskutočnenie trvá príliš dlho, sú nielen časovo, ale aj technicky náročné. Metódy plynovej a kvapalinovej chromatografie sú ich náhradami a umožňujú kvalitatívne i kvantitatívne stanovenie minimálnych koncentrácií regulátorov rastu. Najnovšie sa využívajú na stanovenie aj minimálneho množstva fytohormónov RIA testy (Radio imuno assay). Prvým rastlinným orgánom, ktorý sa na tento účel použil, bola koleoptila jednoklíčnolistových rastlín. Odstránenie vrcholu koleoptily zastavilo rast tohto orgánu a porušilo jej fototropickú a geotropickú citlivosť. Ukázalo sa, že vrchol koleoptily produkuje látku, ktorá sa transportuje z miesta tvorby na miesto účinku a vyvoláva príslušný fototropický alebo geotropický efekt.

Koleoptila a najmä jej subapikálna časť, ktorá sa vyznačuje predlžovacím rastom závislým od prítomnosti kyseliny β -indolyloctovej, sa stala základom pre biotesty v rastlinnej fyziológii. Neskôr sa používanie biotestov rozšírilo aj o ďalšie orgány rastlín, v niektorých prípadoch sa používajú celé rastliny. Použitie rastliny alebo rastlinného orgánu v biotestoch predpokladá minimálne množstvo natívnej látky v materiáli, ktorý sa používa v biologickom teste a jeho vysokú citlivosť na analyzované vzorky. V prípade giberelínov sa biotestami využíva ich schopnosť predlžovacieho rastu zakrpatených mutantov. Používa sa trpasličí hrach (*Pisum sativum* L.) odroda Pionier, ktorý sa po naklíčení rozreže na polovicu a kultivuje v rôznych koncentráciách giberelínov. Podobný je biotest s klíčencami šalátu siateho (*Lactuca sativa* L.), kde sa obdobne merajú prírastky hypokotyllov. Cytokiníny stanovujeme biotestami založenými na ich schopnosti stimulovať delenie buniek. Najznámejší je biotest na stanovenie hmotnostných prírastkov klíčnych listov reďkovky (*Raphanus sativus* L.). Tiež sa používajú biotesty sledujúce rast kalusových kultúr tabaku, sóje, mrkvy. V biotestoch sa na stanovenie cytokinínov tiež využíva ich schopnosť zabraňovať rozkladu chlorofylu alebo schopnosť vo zvýšenej miere v tme tvoriť antokyány, prípadne betacyaníny.

Úloha č. 1: Kalibračná krivka stanovenia giberelínu pomocou biotestu

Teoretický úvod: Semená šalátu siateho (*Lactuca sativa* L.), podobne ako napr. semená rumančeka kamilkového (*Matricaria chamomilla* L.), vyžadujú na klíčenie svetlo. Svetelný impulz možno nahradiť taktiež pôsobením rastového regulátora, kyseliny giberelovej. Ako kontrolu pri sledovaní vplyvu rastového regulátora použijeme v experimente semená, pri ktorých sme klíčenie indukovali svetlom.

Objekt: semená šalátu siateho (*Lactuca sativa* L.).

Pracovné pomôcky: Petriho misky, filtračný papier.

Chemikálie: roztoky GA₃ (koncentrácia 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 mg/l)

Pracovný postup: 50 suchých semien šalátu vložíme do Petriho misky s filtračným papierom na dne s roztokmi s rôznym obsahom kyseliny giberelovej a vodou ako kontrolou. Semená namočené v roztoku kyseliny giberelovej necháme klíčiť v absolútnej tme pri teplote 25 °C. Kontrolu osvetlíme prvých 6 hodín pri napúčaní a potom ju vložíme do termostatu k Petriho miskám s roztokmi kyseliny giberelovej. O 48 hodín po vysiatí vyhodnocujeme percentá klíčenia, pričom ako kontrolu použijeme semená, kde sme klíčenie indukovali svetlom.

Doba trvania: 60 min nasádzanie + klíčenie 48 hod + 60 min vyhodnotenie.

Výsledky: Vyhodnotíme jednotlivé varianty a porovnáme s kontrolou. Výsledky zapíšeme do tabuľky a vyhodnotíme graficky.

Úloha č. 2: Cytokinínový biotest – testovanie schopnosti cytokinínov oddiaľovať senescenciu listov

Teoretický úvod: Fytohormóny zo skupiny cytokinínov regulujú veľké množstvo procesov počas rastu a vývinu rastlín. Jedným z ich účinkov je aj schopnosť cytokinínov oddialiť senescenciu (starnutie) listov v tme. Tma urýchľuje proces rozkladu chlorofylu a dochádza k voľným okom pozorovateľnému žltnutiu, t.j. starnutiu listov. Cytokinínový biotest je založený na schopnosti cytokinínov tento senescenčný proces spomaliť. Dnes je predstava mechanizmu tohto účinku založená na spomalení dýchania, ako aj degradačných procesov vedúcich k rozkladu chlorofylu. Rozklad fotosyntetických pigmentov vedie k nefunkčnosti fotosyntetického aparátu a tým obmedzenému prísunu energie z procesov fotosyntézy. V praxi sa môžu tieto poznatky využiť napríklad pri skladovaní brokolice.

Objekt: terčiky z mladých listov trávy alebo obilnín.

Pomôcky: skúmavky so zábrusom alebo so zátkou s objemom do 10 ml, laboratórny stojan na skúmavky, hodinové sklíčko, lievik, skalpel, automatické pipety a špičky, sklená pipeta, nožnice, pinzeta, váhy, tretia miska, lyžička, odsávací banka, lievik na podtlakovú filtráciu, filtračný papier, odmerný valec.

Chemikálie: benzyladenín, 0,1 M NaOH, 0,1 M HCl, destilovaná voda.

Postup: Pripravíme si roztoky cytokinínu benzyladenínu (BA). Navážime potrebné množstvo BA (približne 1 mg) na hodinové sklíčko, presnú hmotnosť si zapíšeme. Podľa navážky vypočítame objem rozpúšťadla nevyhnutného na prípravu zásobného roztoku s molaritou 0,05 mM. Keďže ide o látku, ktorá má v destilovanej vode obmedzenú rozpustnosť, je potrebné BA najprv rozpustiť v 200 μ l 0,1 M NaOH. Roztoky rozpúšťadiel a výsledných roztokov musia byť číre, nesmú obsahovať zákal ani zrazeninu. Roztok kvantitatívne prelejeme pomocou lievika do sklenenej skúmavky so zábrusom. Zvyšky rozpusteného BA z hodinového sklíčka a lievika kvantitatívne vymyjeme vypočítaným objemom destilovanej vody. Dbáme na úplné rozpustenie BA, následne roztok zneutralizujeme 200 μ l 0,1 M HCl (rovnaký objem ako NaOH) na požadovanú koncentráciu 0,05 mM. Rovnakým spôsobom si pripravíme roztok BA s koncentráciou 0,5 μ M BA. Do 3 označených sklenených skúmaviek s uzáverom (popis má obsahovať meno, dátum a typ inkubačného roztoku) napipetujeme 1ml destilovanej vody, 1ml 0,05 mM BA a 1ml 0,5 μ M BA. Pripravené listy upravíme žiletkou tak, aby mali dĺžku 7 cm a šírku 1 cm, pričom zrežene spodné časti listov a necháme listovú čepeľ. Trojicu čepelí odvážime, ich hmotnosť zapíšeme a v tejto pripravenej trojici ponoríme bázami do príslušného inkubačného roztoku. Skúmavky s pokusným materiálom uzavrieme a pri laboratórnej teplote inkubujeme 7 dní v tme.

Z toho istého rastlinného materiálu odoberieme zároveň listy na extrakciu chlorofylu. Na stanovenie obsahu fotosyntetických pigmentov (chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a karotenoidov) odvážime 80 mg listov. V tretej miske listy zhomogenizujeme s využitím zmesi morského piesku, uhličitanu horečnatého (0,5 g) a cca 5 ml 80 % (v/v) acetónu. Rozotierame 2 min.

Vzniknutú homogénnu zmes dekantujeme filtráciou za podtlaku do skúmavky, ktorá bude umiestnená v odsávacej banke. 80 % acetónom zmyjeme všetok pigment do odsávacej banky. Filtrát doplníme 80 % (v/v) acetónom do 10 ml. Výsledný extrakt preniesieme do kvety a zmeriame absorbančiu vzorky pomocou spektrofotometra pri vlnových dĺžkach 470, 646 a 663 nm.

$$C_{\text{chlorofyl } a} = 12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646} * V / 1000 * FW \text{ (mg/g FW)},$$

$$C_{\text{chlorofyl } b} = 20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663} * V / 1000 * FW \text{ (mg/g FW)},$$

$$C_{\text{karotenoidy}} = [(1000 \times A_{470} - 3,27 \times cchl \ a - 104 \times cchl \ b) / 229] * V / 1000 * FW \text{ (mg/g FW)}$$

kde V je objem rozpúšťadla, ktorý sme použili na extrakciu farbív zo zelených listov (10 ml), FW je čerstvá hmotnosť zelených listov (z *angl.* fresh weight).

Po týždni inkubácie: Vyhodnotíme inkubované listové čepele namočené v destilovanej vode a roztokoch s rozdielnou koncentráciou BA. Rastlinný materiál z každej varianty pokusu vysušíme na filtračnom papieri a odvážime trojicu. Hmotnosť si zapíšeme. Listy z každého variantu analyzujeme následne na obsah fotosyntetických pigmentov. Pracujeme podľa postupu vyššie. Navážime si z každého variantu 80 mg, hmotnosť si zapíšeme. Homogenizujeme v tretej miske, filtrujeme a spektrofotometricky stanovíme obsah pigmentov pre každý variant.

Doba trvania: 90 min + 80 min.

Výsledky: Získané dáta z analýzy hmotnosti a obsahu pigmentov vo vstupnom materiáli a vo vzorkách inkubovaných vyhodnotíme a navzájom porovnáme. Dáta vynesieme do grafu. Graf bude zobrazovať vzťah zmeny obsahu chlorofylu od koncentrácie pridaného cytokinínu a rovnako zmeny v hmotnosti. Odôvodníme získané výsledky a stanovené závery.

Kontrolné otázky

1. Čo sú to fytohormóny a aká je ich funkcia?
2. Ako rozdeľujeme fytohormóny?
3. Popíšte funkciu giberelínov.
4. Popíšte funkciu cytokinínov.
5. Popíšte funkciu auxínov.
6. V čom spočíva úloha etylénu v rastlinách?
7. Ktorý hormón by ste použili na klíčenie semien?
8. Na čo slúži kyselina abcisová?
9. Aký je význam využitia biotestov v biologických vedách?
10. Ako by ste stanovili obsah fotosyntetizujúcich pigmentov?

Zaujímavosť

Pri veľkom množstve rastlinných druhov pozorujeme tzv. arbuskulárnu mykorízu. Je to symbióza rastlín s niektorými druhmi húb, pri ktorej hýfy húb prenikajú do koreňových buniek rastliny. Takáto symbióza je pre rastlinu výhodná, pretože huba dodáva rastline z pôdy vodu a minerálne látky, ku ktorým by sa korene inak nedostali a rastlina na druhej strane poskytuje hube sacharidy a iné organické živiny. Rastlina však musí svojho partnera držať na uzde a teda kontrolovať, aby sa hubové hýfy nerozrastali v koreňoch rastliny viac, ako je nutné. Inak by spolunažívanie rastline škodilo. Viaceré vedecké tímy študujú molekulárne mechanizmy tohto spolunažívania a hľadajú nástroje, ktorými rastlina kontroluje a tlmí rozvoj mykorízy. Vedci zistili, že okrem určitých regulačných proteínov a príslušných génov zohrávajú významnú úlohu v týchto procesoch rastlinné hormóny zo skupiny strigolaktónov. Tie sú vylučované z koreňov a stimulujú rast mykoríznych húb. Vedci zistili, že strigolaktóny sú dôležité pre jemné vyladenie vzťahov medzi rastlinou a mykoríznymi hubami a tak pomáhajú zaistiť, aby symbióza prinášala úžitok obom partnerom. Strigolaktóny sú známe od roku 1966, ale ako rastlinné hormóny boli popísané až v roku 2008. Od tej doby sa postupne zisťuje, čo všetko sú schopné v rastlinách ovplyvňovať. Strigolaktóny majú napr. význam pre príjem fosforu rastlinami. Niektoré parazitické rastliny ich využívajú k napadnutiu svojich hostiteľov. Parazity z rodu *Striga* tak napríklad výrazne znižujú úrodu obilia v afrických krajinách. Potenciál praktického využitia majú strigolaktóny napr. v poľnohospodárstve v boji proti parazitickým burinám, ktoré napádajú hospodársky významné plodiny a tak spôsobujú obrovské straty na úrodách.

ZÁKLADNÉ ZLOŽKY ŽIVÝCH ORGANIZMOV

Živé organizmy obsahujú viacero látok, ktoré je možné deliť podľa rozličných kritérií. Ak je kritériom príslušnosť látky do systému chemických látok, rozdeľujeme ich na anorganické a organické látky. **Organické látky** sú tvorené uhlíkom a ďalšími biogénnymi prvkami (biogénny = tvoriaci živú hmotu). Uhlík (lat. *carboneum*) patrí medzi tzv. základné, alebo primárne biogénne prvky, ktorý tvorí základný stavebný kameň všetkých organických zlúčenín a tým aj všetkých živých organizmov. Zlúčeniny uhlíka sú základnou stavebnou jednotkou primárnych metabolitov, medzi ktoré patria sacharidy, proteíny, lipidy a nukleové kyseliny. Primárny metabolizmus je pre živý organizmus životne dôležitý. Organické látky môžeme rozdeliť na nízkomolekulové a vysokomolekulové. Medzi nízkomolekulové organické látky patri zlúčeniny slúžiace ako zdroj energie (sacharidy a lipidy), základné zložky biologicky dôležitých makromolekúl (aminokyseliny, nukleotidy), zlúčeniny, ktoré sa zúčastňujú regulačných a informačných procesov (vitamíny, hormóny, koenzýmy) a zlúčeniny s osobitnou funkciou (glykozidy, éterické oleje). Medzi vysokomolekulové organické látky patria polysacharidy (glykány), proteíny vrátane enzýmov a nukleové kyseliny. **Anorganické látky** sú jednoduchšie zlúčeniny biogénnych prvkov, ktoré sa v bunke môžu nachádzať viazané vo forme solí (chloridy, fluoridy, uhličitany, fosforečnany a pod.), súčasť enzýmov (železo v hemoglobíne) alebo ako voľné ióny (Na^+ , Ca^{2+}). Zastúpenie látok v živých organizmoch závisí od mnohých kritérií, akými sú vývinové štádium organizmu, typ bunky, vonkajšie prostredie, konkrétny druh organizmu a ďalšie.

Anorganické látky sa zvyčajne ďalej rozdeľujú na vodu, popol a plyny. Voda má pre živé organizmy, aj pre rastliny zásadný význam. Ak sa z nich odstráni sušením, vznikne sušina, ktorá sa skladá z organických a anorganických látok. **Sušinu** získavame dôkladným vysušením materiálu. Spôsob sušenia závisí od materiálu, od účelu ďalšieho použitia sušiny a od vlastností látok, ktoré sa majú stanoviť v sušine. Dlhšie pôsobenie teplôt vyšších (okolo 100 °C) môže vyvolať karamelizovanie sacharidov alebo sacharidy môžu chemicky reagovať s aminokyselinami. Pri príliš nízkych teplotách (okolo 40 °C) a pomalom sušení môžu nastať zmeny v zložení organických látok následkom enzymatickej aktivity. Ak chceme v sušine zachovať látky citlivé na oxidáciu vzdušným kyslíkom, materiál vysušujeme v prúde inertného plynu N_2 . Materiál, v ktorom by sa mohli termicky rozkladať niektoré látky, vysušujeme vo vákuovej sušiarňi pri nižších teplotách, dosušenie do konštantnej hmotnosti robíme pri teplote 105 °C v elektrickej sušiarňi. **Konštantná hmotnosť** je hmotnosť, ktorá sa vážením trikrát po sebe v aspoň v 8 hodinovom intervale nemení, prípadne sa mení iba v rozsahu $\pm 0,1$ mg. Získaná sušina je východiskom pre analýzu rastlinného materiálu stanovením nespáliteľného zvyšku (popola), jeho jednotlivých zložiek i mnohých organických látok. Častokrát používame sušinu ako vzťahovú jednotku. Pri stanovení látok v rastlinnom materiáli a pri porovnaní obsahu látok alebo intenzity fyziologických procesov musíme tieto vyjadriť vzhľadom na nejakú, podľa možnosti konštantnú hodnotu (vzťažnú jednotku). Ako vzťažná jednotka sa v niektorých prípadoch používa aj určitá biologická jednotka (organizmus, orgán, pletivo, plocha listu, bunka). Použitie takejto biologickej jednotky naráža

na mnohé problémy, ako napríklad problémy pri porovnaní rastlín rôzneho vývinového štádia, odbery vzorky v priebehu dňa s rôznym obsahom vody a podobne. Ako vzťažná jednotka sa preto odporúča a stále častejšie sa používa suchá hmotnosť (sušina). Stanovené látky (primárne, sekundárne metabolity) najčastejšie vyjadrujeme vo vzťahu k hmotnosti sušiny.

Spálením a vyžíhaním živej hmoty, teda pri vyšších teplotách ako sa získava sušina, sa získa **popol (nespáliteľný podiel)**. Popol obsahuje anorganické zlúčeniny, ktoré pri žíhaní neprechádzajú do plynného skupenstva. Sušinu rastlín tvoria prevažne organické látky. V priemere iba 5 % z celkového množstva sušiny pripadá na popol. Popol, ktorý dostaneme spaľovaním sušiny, tvoria oxidy a soli rozličných prvkov. Niektoré z nich sa v rastlinách nachádzajú vo väčších množstvách. Označujú sa ako makroelementy. Obsahovo sa pohybujú od 0,1 až do 0,01 % (10^{-1} – 10^{-2} %). Patrí k nim predovšetkým 10 esenciálnych biogénnych prvkov: H, O, C, N, S, P, K, Mg, Ca, Fe, pričom C, O, H a N tvoria až 96 % živej hmoty. K vedľajším makroelementom patria prvky neesenciálne: Na, Al, Si, prípadne Cl a I špecifické pre niektoré rastliny. Dokázateľné sú pomerne jednoduchými analytickými metódami. Okrem vymenovaných prvkov sa v rastline nachádzajú ešte ďalšie prvky v podstatne nižších množstvách, ale pre metabolizmus rastliny majú veľký význam. Označujú sa ako mikroelementy. Ich obsah sa pohybuje od 10^{-3} do 10^{-5} %. Vzhľadom na nízku koncentráciu je ich stanovenie zložitejšie, vyžaduje fyzikálno-chemické metódy, prípadne špeciálne mikroanalýzy. Do tejto skupiny prvkov patria: Cu, Zn, Mn, B, Co, Ba, Li a iné. Stopové prvky nazývame tie prvky, ktorých obsah v rastline je 10^{-6} % a menej. V rastlinách bola zatiaľ dokázaná asi polovica prvkov z periodickej sústavy prvkov. Prevažná časť sušiny, unikajúca spaľovaním vo forme plynov, tvorí **spáliteľný podiel**. Spáliteľný podiel rastlinnej sušiny tvoria rozličné organické látky, v ktorých nachádzame päť základných biogénnych prvkov: C, H, N, O, S. Prítomnosť týchto prvkov v rastlinnom materiáli môžeme dokázať suchou destiláciou, pri ktorej vzniká oxid uhličitý ako dôkaz prítomnosti uhlíka, voda ako dôkaz vodíka a kyslíka, amoniak ako dôkaz prítomnosti dusíka a sírovodík ako dôkaz síry. V spáliteľnom podiele rastliny má najdôležitejší význam dusík. Je základnou stavebnou jednotkou mnohých biologicky dôležitých molekúl ako sú proteíny, aminokyseliny, nukleotidy, nukleové kyseliny, chlorofyl a iné molekuly. Rastliny sú preto na nedostatok dusíka obzvlášť citlivé. Pri analýze materiálu sa vzťahuje obsah stanovených látok na čerstvú alebo suchú hmotnosť. Uhlík je základným prvkom organických látok, medzi ktoré patria proteíny, sacharidy, lipidy a nukleové kyseliny. Štúdiom chemických vlastností uhlikatých zlúčenín sa zaoberá organická chémia.

Jednotlivé prvky v materiáli sa dokazujú a stanovujú po **mineralizácii** (spaľovaní) vzorky. Existujú dva spôsoby mineralizácie: 1) mineralizácia mokrou cestou a 2) mineralizácia suchou cestou. Mineralizácia mokrou cestou sa uskutočňuje v prítomnosti koncertovaných minerálnych kyselín (H_2SO_4 , HNO_3 a iné) a katalyzátorov (soli Zn, Se a iné), kedy sa rastlinný materiál mineralizuje na príslušné soli. Mineralizácia suchou cestou predstavuje klasickú metódu mineralizácie za sucha, t.j. žíhanie sušiny rastlinného materiálu v porcelánových alebo platinových téglkoch v plameni plynového kahana. Pri väčších sériách vzoriek

pracujeme v muflových peciach s regulovanou teplotou. Pri spaľovaní rastlinného materiálu sa nesmie prekročiť teplota 500 °C, aby nenastali väčšie straty prchavých zlúčenín, napr. soli Zn^{2+} , ktoré ľahko prchajú už pri tejto teplote.

Popol môžeme zhodnotiť tak kvalitatívne ako aj kvantitatívne. **Kvalitatívnou analýzou** sa presvedčíme o prítomnosti základných biogénnych prvkov vo vzorke. Väčší význam má však **kvantitatívna analýza** popola. Výsledky analýz pletív alebo tkanív možno použiť ako dôležitý ukazovateľ a meradlo na posúdenie viacerých javov v živote organizmu. V prvom rade sa stáva východiskom pre kontrolu prostredia a následne pre vytvorenie podmienok vhodného prostredia a v prípade rastlín minerálnej výživy. V prípade pestovania rastlín ukazuje na stav prístupných živín v pôde a často napomáha objasniť celkom nepredvídateľne výsledky poľných pokusov. Výsledky chemických analýz majú veľký význam pri určovaní správnej diagnózy ochorenia organizmu vyvolaného napr. aj nadbytkom alebo nedostatkom vybraných prvkov v prostredí.

Úloha č. 1: Stanovenie percenta popola žíhaním v plameni

Teoretický úvod: Pri spaľovaní rastlinného materiálu sa rozkladajú organické zlúčeniny. Uhlík, vodík, kyslík a dusík unikajú vo forme tzv. spáliteľného podielu ako oxidy. Ostatné prvky zostávajú ako oxidy, uhličitany, sírany, fosforečnany alebo chloridy v nespáliteľnom zvyšku – popole.

Objekt: suchý rastlinný materiál (drevo, listy, kôra, semená).

Chemikálie: 10 % (v/v) HCl.

Pracovné pomôcky: téglík, kliešte, triangel, kahan, trojnožka, exsikátor, platinový drôtik.

Pracovný postup: Porcelánový téglík vymyjeme zriedenou HCl, vyžihame, ochladíme v exsikátore a odvážime. Do odváženého téglíka navážime 1 až 2 g sušiny alebo suchého materiálu. Téglik postavíme šikmo na triangel a opatrne žihame v digestore. Dbáme pri žíhaní, aby sušina nevzbĺkla svietivým plameňom, lebo pri prudkom horení nastávajú straty (silné prúdenie vzduchu strháva materiál). Žíhanú sušinu občas opatrne premiešame platinovým drôtikom. Teplota spaľovaného materiálu nesmie prekročiť 500 °C, znamená to, že téglík smie byť rozžeravený len do tmavočerveného žiaru, aby sme predišli stratám prchavých anorganických látok. Táto teplota je vo vrchnej časti nesvietivého plameňa. Ukončenie žíhania (cca 45-60 min) poznáme podľa jasno-sivej farby popola. Téglik s popolom ochladíme v exsikátore a odvážime.

Percento popola vypočítame následne podľa vzorca:

$$\% \text{ popola} = \frac{\text{hmotnosť popola}}{\text{hmotnosť sušiny}} \cdot 100$$

kde hmotnosť sušiny je rozdiel hmotnosti sušiny s téglíkom a hmotnosti prázdneho téglíka a hmotnosť popola je rozdiel medzi hmotnosťou téglíka s popolom a hmotnosť prázdneho téglíka.

Doba trvania: 2 hod.

Výsledky: Najmenej z troch opakovaní vypočítame priemer, smerodajnú odchýlku a stanovíme percento popola, ktorý vzťahujeme vždy na sušinu aj v prípade použitia suchého materiálu. Hodnoty získané z jednotlivých častí rastliny zoradíme do tabuľky a porovnáme.

Úloha č. 2: Dôkaz katiónov v rastlinnom popole

Teoretický úvod: Nespáliteľný podiel (popol) rozpustíme vo vode alebo v zriedenej HCl v závislosti od toho, aký katión v popoli budeme dokazovať. Jednotlivé prvky v roztoku dokazujeme jednoduchými analytickými reakciami.

Objekt: popol z rastlinného materiálu z Úlohy č. 1.

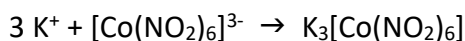
Chemikálie: 5 % (w/v) dusitan sodno-kobaltitý, 5 % (w/v) hexakynožeľeznatán draselný, 5 % (w/v) rodanid amónny, 10 % (w/v) uhličitan amónny, 5 % (w/v) hydrogénfosforečnan disodný, 50 % (v/v) HCl, 5 % (w/v) šťaveľan amónny, 10 % (v/v) kyselina octová, Kalion (0,2 g dipikrylamínu rozpustíme v 2 ml 10 % (w/v) uhličitanu sodného a pridáme 15 ml vody, roztok prefiltrujeme), roztok Magnezon I (4-(4-Nitrophenylazo)-resorcinol) na dôkaz horčička (1 ml Magnezonu I rozpustíme v 100 ml 8 % (w/v) NaOH), 0,1 M NH₄OH.

Pracovné pomôcky: kadička, skúmavky, stojan na skúmavky, aparátúra na filtrovanie, filtračný papier.

Pracovný postup: Na navlhčený filtračný papier v lieviku nasypeme lyžičku popola, premyjeme ho malým množstvom horúcej destilovanej vody a filtrát zachytávame do kadičky. Vo filtráte uskutočníme dôkaz draslíka.

Dôkaz draslíka:

a) Filtrát zneutralizujeme, pridáme niekoľko kvapiek roztoku dusitanu sodno-kobaltitého. Za prítomnosti draslíka v roztoku vznikne žltý zákal od vzniknutého hexanitrokobaltitanu draselného. Reakcia prebieha podľa rovnice:

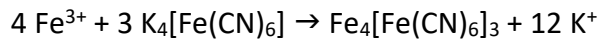


b) Kvapku z filtrátu preniesieme na filtračný papier a pridáme kvapku Kalionu. Filtračný papier vysušíme a ponoríme do 0,1 M NH₄OH. Filtračný papier ožltne, ale v prípade, že sa vo filtráte nachádza draslík, na mieste nanosenia skúmaného roztoku zostane červená škvrna.

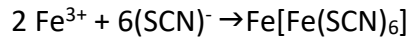
Dôkaz železa:

Na filter prisypeme malé množstvo popola (Úloha č. 1) a premyjeme zriedenou HCl. Filtrát rozdelíme na štyri časti, pričom prvé dve skúmavky využijeme na dôkaz železa (pričom dôkazové reakcie a) a b) dokazujú prítomnosť trojmocného železa a tak si vyberieme len jednu z nich) a ďalšie dve na dôkaz horčička:

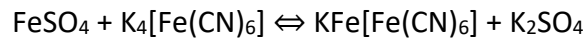
- a) Do skúmavky pridáme niekoľko kvapiek roztoku hexakynoželeznanu draselného. Vzniká modré sfarbenie (berlínska modrá) ako dôkaz prítomnosti trojmocného železa. Reakcia prebieha podľa rovnice:



- b) Do skúmavky pridáme roztok rodanidu draselného, červené sfarbenie dokazuje prítomnosť trojmocného železa. Reakcia prebieha podľa rovnice:

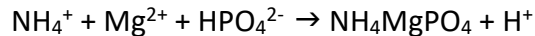


- c) Do skúmavky k filtrátu pridáme po kvapkách roztok hexakynoželeznanu draselného a ako dôkaz prítomnosti dvojmocného železa vzniká výrazne tmavomodrá zrazenina feroferikyanidu, tzv. Turnbullova modrá. Reakcia prebieha nasledovne:



Dôkaz horčíka:

- a) K filtrátu v tretej skúmavke pridáme vodný roztok amoniaku do alkalickéj reakcie a potom vyzrážame vápnik prídavkom uhličitanu amónneho. Vzniknutú bohatú bielu zrazeninu odfiltrujeme. K filtrátu pridáme niekoľko kvapiek hydrogénfosforečnanu disodného. Vznikne biely zákal ako dôkaz prítomnosti horečnatých iónov. Reakcia prebehne podľa rovnice:

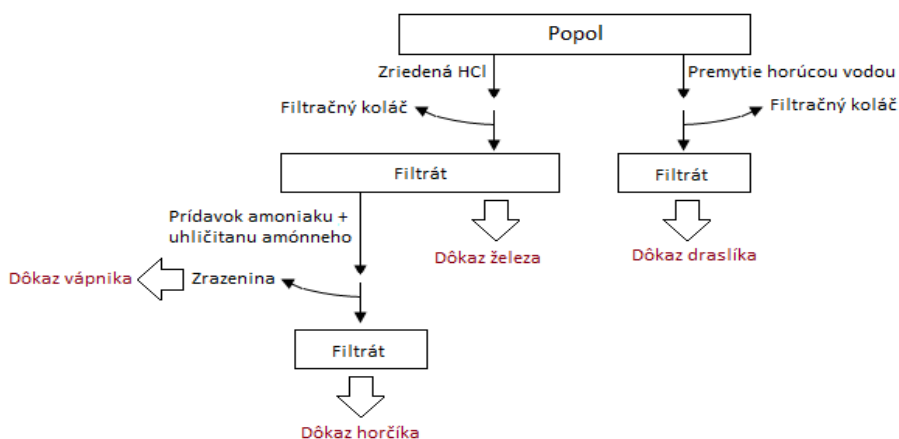


- b) Horčík môžeme dokázať aj pomocou roztoku Magnezon I. Ak ku kvapke filtrátu pridáme 2 kvapky roztoku Magnezon I, tak za prítomnosti horčíka vznikne modré zafarbenie.

Dôkaz vápnika:

Zrazeninu na filtri (CaCO_3) premyjeme zriedenou kyselinou octovou. Vo filtráte dokážeme vápnik šťaveľanom amónnym, vo forme bielej zrazeniny šťaveľanu vápenatého.

Schéma delenia popola:



Doba trvania: 2 hodiny.

Výsledky: Popíšeme, ktoré katióny sme dokázali v našej vzorke popola, aké chemické reakcie pri dôkaze prebiehali a aký produkt je ich výsledkom.

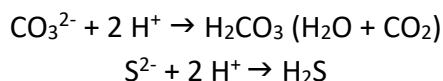
Úloha č. 3: Dôkaz aniónov v rastlinnom popole

Objekt: rastlinný popol z Úlohy č. 2.

Chemikálie: 5 % (w/v) chlorid bárnatý, 1 % (w/v) dusičnan strieborný, 10 % (v/v) kyselina dusičná, 5 % (w/v) hydroxid bárnatý, hydroxid amónny.

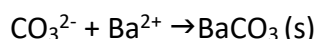
Pracovné pomôcky: ako v Úlohe č. 3.

Pracovný postup: Na malé množstvo popola (na špičku špachtle) na filtračnom papieri pridáme zopár kvapiek riedenej kyseliny dusičnej. Pozorujeme pritom šumenie a vznik nepríjemného zápachu. Šumenie je dôkaz prítomnosti uhličitanov, zápach vzniká rozkladom sulfidov a uvoľňovaním sírovodíka:



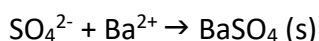
Dôkaz oxidu uhličitého:

Na sklenenú tyčinku naberieme kvapku 5 % (w/v) roztoku hydroxidu bárnatého a podržíme tesne nad šumiacim popolom. Kvapka sa zakalí vzniknutým uhličitanom bárnatým. Reakcia prebieha podľa rovnice:

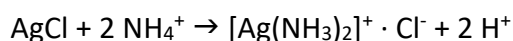
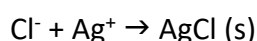


Dôkaz síranu:

Kyslý filtrát rozdelíme na dve časti. K prvej časti pridáme roztok chloridu bárnatého. V prítomnosti síranov vzniká biela zrazenina síranu bárnatého, ktorá sa nerozpúšťa v zriedenej HNO_3 a HCl . Reakcia prebieha podľa rovnice:



K druhej časti roztoku pridáme niekoľko kvapiek dusičnanu strieborného. V prítomnosti chloridov vzniká v roztoku biela zrazenina chloridu strieborného. Chlorid strieborný sa v zriedenom roztoku amoniaku ľahko rozpúšťa za vzniku aminokomplexu striebra. Reakcia prebieha nasledovne:



Doba trvania: 30 min.

Výsledky: Popíšeme, ktoré anióny sme dokázali v našej vzorke popola a aké chemické reakcie pri dôkaze prebiehali a aký produkt je ich výsledkom.

Úloha č. 4: Dôkaz fosforečnanov

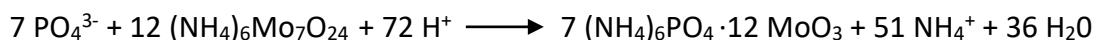
Teoretický úvod: Fosfor dokážeme v rastlinnom popole pomocou reakcie s molybdénanom amónnym a kyselinou dusičnou. V prítomnosti fosforu vzniká žltý produkt, konkrétne molybdatofosforečnan amónny.

Objekt: rastlinný popol z Úlohy č. 1.

Chemikálie: 10 % (w/v) molybdénan amónny, koncentrovaná HNO₃.

Pracovné pomôcky: skúmavka, stojan, lyžička, pipeta, filtračná aparatura, varný kúpeľ.

Pracovný postup: Do skúmavky nasypeme za lyžičku popola a nalejeme 5 ml destilovanej vody. Minútu dôkladne pretrepávame. Prefiltrujeme a k filtrátu pridáme 1 ml koncentrovanej HNO₃ a 2 ml roztoku molybdénanu amónneho. Pomaly zahrejeme. Vytvorí sa citrónovo žltá zrazenina vo forme molybdatofosforečnanu amónneho (NH₄)₂P(Mo₃O₁₀)₄, ktorá je dôkazom prítomnosti fosforu v popoli.



Doba trvania: 10 min.

Výsledky: Zapišeme výsledok reakcie a vysvetlíme princíp vzniku zrazeniny a priebehu dôkazovej reakcie.

Úloha č. 5: Dôkaz vodíka, kyslíka, síry, dusíka a uhlíka

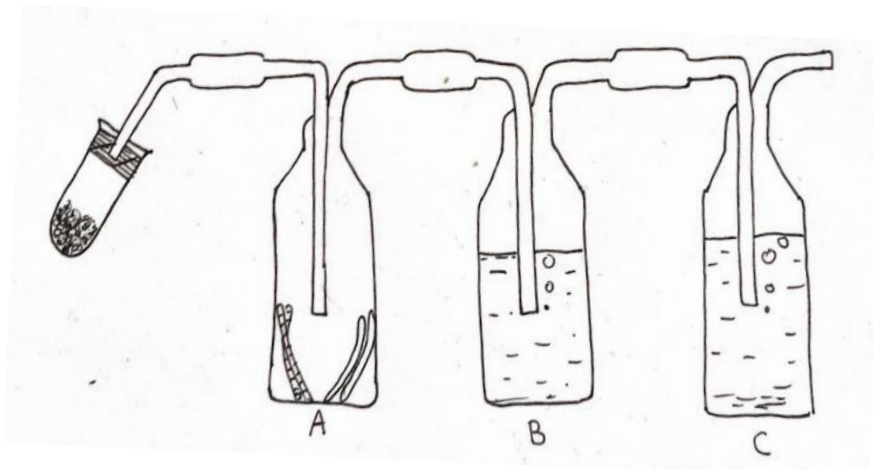
Objekt: zrná pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.).

Chemikálie: 5 % (w/v) hydroxid bárnatý, Nesslerov roztok (4,55 g HgI₂ a 3,5 g KI rozpustíme za stáleho miešania v malom množstve vody, pridáme 11,2 g KOH a doplníme na 100 ml prevarenou destilovanou vodou).

Pracovné pomôcky: plynový kahan, olovnatý papier (filtračný papier nasýtený roztokom octanu olovnatého a následne vysušený v sušiarňi), kobaltnatý papier (filtračný papier nasýtený roztokom chloridu kobaltnatého a následne vysušený v sušiarňi), 3 premývačky (250 ml), skúmavka z ťažko tavitelného skla, gumové hadičky, prevrtané zátky, kahan, sklené rúrky.

Pracovný postup: 5 g pšeničných zrn nasypeme do skúmavky. Skúmavku uzavrieme zátkou s otvorom na sklenú rúrku. Rúrku pripojíme na sústavu troch premývačiek spojených za sebou podľa Obrázku 9. Skúmavku so semenami zahrejeme nad plynovým kahanom. V prvej

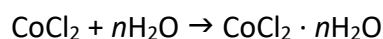
premývačke (A) umiestnime kobaltnatý a olovnatý papier, v druhej (B) Nesslerov roztok v takom objeme, aby bola sklenená rúrka v premývačke ponorená do hĺbky cca 2 cm a v tretej (C) roztok hydroxidu bárnateho v objeme podobnom ako v premývačke (B). Skúmavku so semenami zahrejeme nad plynovým kahanom.



Obrázok 9: Aparatúra na suchú destiláciu rastlinnej vzorky.

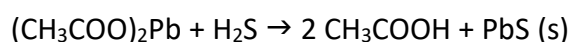
Dôkaz vodíka a kyslíka

Modrý kobaltnatý papier sa sfarbuje do červena, čo je dôkazom prítomnosti vody (vodíka a kyslíka) vo vzorke rastliny. Bezvodý chlorid kobaltnatý je modrý, hydratovaný je ružový až červený.



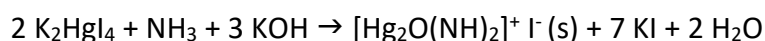
Dôkaz síry

Olovnatý papier sa sfarbuje do čierneho od sulfidu olovnateho, čo predstavuje dôkaz síry.



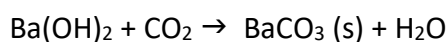
Dôkaz dusíka

V žltom Nesslerovom roztoku vzniká červená zrazenina jodidu oxoamidoortuťnatého, čo je dôkaz prítomnosti dusíka v rastline.



Dôkaz uhlíka

Roztok hydroxidu bárnateho v poslednej premývačke sa za prítomnosti pár CO_2 zakaluje od vznikajúceho BaCO_3 . Bez prítomnosti oxidu uhličitého reakcia neprebíha, takže je to dôkaz prítomnosti uhlíka.



Doba trvania: 2 hod.

Výsledky: Zapišeme priebeh jednotlivých dôkazových reakcií suchej destilácie, získané produkty a ich farebný prejav.

Kontrolné otázky

1. Ako by ste charakterizovali popol a čo obsahuje?
2. Vymenujte makroelementy a mikroelementy v živom organizme.
3. Popíšte princíp suchej destilácie využitý na stanovenie prítomnosti vodíka, kyslíka, síry, dusíka a uhlíka.
4. Uvedte rozdiel medzi spaliteľným a nespaliteľným podielom.
5. Ktorých zlúčenín je v živých organizmoch súčasťou dusík?
6. Ako by ste dokázali prítomnosť fosforečnanov vo vzorke?
7. Ako by ste dokázali prítomnosť železa, horčíka a vápnika vo vzorke?
8. Ako by ste dokázali prítomnosť uhlíka vo vzorke?
9. Ako by ste dokázali prítomnosť síry vo vzorke?
10. Vymenujte spôsoby mineralizácie rastlinného materiálu a krátko ich popíšte.

Zaujímavosť

Rastliny môžu byť zaujímavo využité aj pri získavaní kovov z rúd a iných pevných materiálov. Tento proces sa označuje termínom biomining - ťažba kovov pomocou biologického systému (teda nielen rastlín, ale aj prokaryotov a iných eukaryotov) bez záťaže na životné prostredie. Nenápadná praslička roľná (*Equisetum arvense* L.) tiež podľa literatúry patrí medzi akumulátory zlata. Avšak v súčasnosti existujú vážne pochybnosti o platnosti metódy použitej v štúdií dokazujúcej prítomnosť vysokej koncentrácie zlata v prasličke. Na rozdiel od prasličky však schopnosť akumulovať zlato z rudy bola popísaná pre kapustu sitinovú (*Brassica juncea*) a kukuricu siatu (*Zea mays* L.). Obe rastliny mali schopnosť rásť na hromade oxidovanej rudy obsahujúcej 0,6 g/t zlata a absorbovať mobilizované zlato po ošetrovaní kyanidom a tiokyanátom. *B. juncea* vykazovala najlepšiu schopnosť akumulovať zlato, pričom po predúprave kyanidom sodným poskytla v priemere 39 mg/kg. Laboratórne a skleníkové dôkazy preto naznačujú, že získanie jedného kg zlata rastlinami z jedného hektára pôdy je reálnym úspechom pre rudy s obsahom najmenej 2 g/t zlata. Niektoré rastliny môžu byť aj indikátorom prítomnosti kovu v pôde. Napríklad *Aster venustum*, *Astragalus albulus* a ďalšie druhy rodu *Astragalus* sa považujú za indikátory selénu, ktoré nepriamo indikujú urán (spojený so selénom v karnotitových rudách na Coloradskej plošine).

VODA

Najdôležitejšou anorganickou zlúčeninou každej bunky je **voda**, ktorá tvorí 60 až 90 % (v priemere 65 %) hmotnosti bunky. Jej úloha je nezastupiteľná v mnohých procesoch. Je rozpúšťadlom prevažnej väčšiny anorganických a organických látok, tvorí prostredie pre priebeh chemických reakcií (aktivátor chemických reakcií), rozvádza rozpustené látky do buniek, tkanív a pletív, podmieňuje fyzikálne procesy ako je difúzia a osmóza, má termoregulačnú funkciu a fotolýza vody je súčasťou fotosyntézy.

Obsah vody v bunke nie je stála hodnota. Závisí predovšetkým od dvoch faktorov: 1. ontogenetického štádia (napr. mladé rastliny majú vyšší obsah vody, starnutím sa znižuje obsah vody a narastá obsah sušiny) a 2. typu bunky alebo orgánu, v ktorom sušinu stanovujeme (napr. v prípade rastlín najmenej vody obsahujú suché semená, ďalej drevnaté časti rastlín, stonky, listy, kvety, najvyšší obsah vody majú dužinaté plody rastlín).

Jedinečné funkcie vody vyplývajú z jej vlastností. Stechiometricky je molekula vody tvorená pomerom H:O 2:1. Jej molekulová hmotnosť je 17,008 a atómové jadrá H^+ + H^+ zvierajú s atómovým jadrom O^- uhol asi 105° . Molekula vody nesie celkovo neutrálny elektrický náboj, ale parciálne + a - náboje sú na nej nesymetricky rozložené a preto má dipólový charakter. Je to teda molekula polárna, čo ju robí vynikajúcim polárnym rozpúšťadlom pre rôzne polárne látky. Voda z nich odoberá ióny a obaľuje ich svojimi molekulami, teda ich hydratuje. Vytváranie hydratačných obalov z molekúl vody s celkovo neutrálnym nábojom okolo iónov so silne + alebo - nábojmi umožňuje v pletivách rastlín transport týchto iónov (napríklad minerálnych živín) i na veľké vzdialenosti bez toho, aby predčasne zreagovali. V molekule vody na strane kyslíka zostávajú neobsadené dva páry elektrónov, takže parciálny náboj na tejto strane je elektro-negatívnejší a môže elektrostatickými silami priťahovať kladné vodíkové náboje iných molekúl vody, čím vznikajú vodíkové väzby.

Schopnosť vody vytvárať vodíkové väzby podmieňuje jej termálne, kohézne a adhézne vlastnosti, ktoré sú významné pre život rastlín. **Kohézia** odráža mnohonásobnú príťažlivosť medzi molekulami vody extenzívnym vytváraním vodíkových väzieb a zabezpečuje súdržnosť (pevnosť v ťahu) vodného stĺpca vo vodivých dráhach rastliny. Roztrhnutie vodného stĺpca je jav označovaný ako **kavitácia**. **Adhézia** je obdobná vlastnosť ako kohézia a hovorí o pripútavaní molekúl vody k pevnej fáze (napríklad k bunkovej stene). **Povrchové napätie** je sila, ktorú vyvíjajú molekuly vody na rozhraní voda a vzduch. Molekuly vody sú tu silnejšie pripútavané k susedným molekulám vody ako k plynnej fáze a majú tendenciu minimalizovať povrchovú plochu rozhrania. **Kapilarita** je jav, ktorého vznik podmieňujú spolu kohézia, adhézia a povrchové napätie. V pórovitých materiáloch povrchové napätie generuje silu potrebnú k výtlačku vody. Je to tendencia vody pohybovať sa smerom hore po kapilárnej trubici až dokiaľ sa sila adhézie nevyrovná hmotnosti stĺpca vody. Kapilarita sa uplatňuje pri pohybe vody v bunkových stenách, v sieti mikroskopických medzier medzi vláknitými celulóзовými mikrofibrilami uloženými vedľa seba, ktoré vytvárajú pórovitý materiál pôsobiaci ako súbor kapilár s rozhraniami voda - vzduch.

Vysoké špecifické teplo vody vyjadruje množstvo tepelnej energie potrebnej na zvýšenie teploty vody o jeden stupeň. Voda má najvyššiu tepelnú kapacitu zo všetkých látok, čo chráni rastlinu pred poškodením veľkými výkyvmi teploty. Voda má vysoké **latentné teplo výparu**, ktoré vyjadruje množstvo tepelnej energie potrebnej na oddelenie molekúl vody od jej tekutej fázy, t.j. na zrušenie vodíkových väzieb (10,5 kJ/mol pri teplote vody 25 °C). Táto reakcia ochladzuje rastlinu pri transpirácii a chráni ju pred prehriatím. Voda je najlepším vodičom tepla v porovnaní s inými kvapalinami a nekovmi. Medzi ďalšie vlastnosti vody, ktoré ju predurčujú ako vhodné prostredie pre život, je schopnosť vody prepúšťať žiarenie (fotóny) viditeľného spektra, čo je podmienkou najmä pre **fotosyntetický proces**. Ďalšou zaujímavou vlastnosťou je relatívne vysoký bod varu s veľkým rozsahom teploty medzi bodom varu a bodom tuhnutia (100 °C). Abnormálna expanzia vody pred zamrznutím spôsobuje, že ľad sa tvorí na povrchu hladiny a dno nepremrzá, čo umožňuje rastlinám prežiť a taktiež žiť pod hladinou vody mnohým vodným živočíchom.

Voda vytvára maticu a prostredie, v ktorom prebieha väčšina pre život nevyhnutných biochemických procesov. Štruktúra a vlastnosti vody silne ovplyvňujú štruktúru a vlastnosti proteínov, nukleových kyselín, biomembrán a iných bunkových zložiek. Pri väčšine suchozemských rastlín sa z nich voda neustále stráca do atmosféry. Približne 95 % vody odchádza cez prieduchy a zvyšok cez kutikulu a preto musí byť prijímaná z pôdy koreňmi pomocou apoplazmických a symplazmických dráh.

Pohyb vody cez kontinuum voda-pôda-atmosféra môže prebiehať difúziou, objemovým tokom, osmózou alebo kombináciou týchto troch základných transportných mechanizmov. **Difúziou** sa voda pohybuje v oblasti s vyššou koncentráciou vody do oblasti s nižšou koncentráciou vody a na krátke vzdialenosti, napríklad medzi jednotlivými kompartmentami bunky a medzi susednými bunkami, ale i vo forme pary medzi vnútornými vzdušnými priestormi listu a vonkajším vzduchom mimo listu pri transpirácii. Hnacou silou difúzie je koncentračný gradient. Na dlhé vzdialenosti sa voda pohybuje hromadným pohybom molekuly vody objemovým tokom. **Objemový tok** sa objavuje v dôsledku tlakových rozdielov, a to všade tam, kde sú vhodné dráhy pre objemový tok vody (napríklad v xyléme, v stenách buniek). Hnacou silou objemového toku je gradient hydrostatického tlaku. **Osmóza** je proces, ktorým sa voda pohybuje cez selektívne permeabilné membrány. Tento proces, ktorý v sebe zahŕňa difúziu i objemový tok, závisí od chemického potenciálu vody. **Chemický potenciál vody** je kvantitatívnym vyjadrením vodnej energie vody. V termodynamike voľná energia predstavuje potenciál pre vykonanie práce. Jednotkou chemického potenciálu vody je energia na mól latky (J/mol). Rastlinní fyziológovia definovali iný parameter, ktorý sa nazýva **vodný potenciál** (Ψ). Je to chemický potenciál vody delený parciálnym molárnym objemom vody (18 cm³/mol). Keď sa použije tento parameter, voľná energia vody je vyjadrená v jednotkách tlaku na megapascaly (MPa). Hnacou silou vody pri osmóze je teda gradient vodného potenciálu.

Úloha č. 1: Stanovenie percenta vody a sušiny v rastlinnom materiáli

Teoretický úvod: Zahrievaním rastlinného materiálu sa vyparuje voda. Vysušením do konštantnej hmotnosti dostaneme sušinu.

Objekt: rastlinný materiál (semená, čerstvé listy, orgány klíčiacej rastliny a podobne).

Pracovné pomôcky: elektrická sušiareň, Petriho misky, exsikátor, kliešte, analytické váhy.

Pracovný postup: Čistú Petriho misku vysušíme v sušiarňi pri teplote 105 °C a po ochladení v exsikátore odvážime. Po odvážení vložíme do nej cca 10 g rastlinného materiálu a presnú hmotnosť rastlinného materiálu si zapíšeme. Paralelne pracujeme s tromi miskami a navažujeme do každej rozličný rastlinný materiál pre porovnanie. Pracujeme čo najrýchlejšie, aby sme zabránili stratám, ktoré vzniknú zvýšeným odparovaním na poškodených častiach materiálu (rezné plochy). Otvorenú misku s rastlinným materiálom vložíme do sušiarne vyhriatej na 105 °C. Po ukončení sušenia vložíme otvorenú misku do exsikátora a ochladíme. Po ochladení (cca 5-8 minút) ju odvážime, hodnotu hmotnosti si zapíšeme a znovu dáme sušiť. Sušíme takto do konštantnej hmotnosti ($\pm 0,1$ mg). Vypočítame na konci sušenia podiel sušiny a vody vo vzorke nasledovne:

$$m_{\text{čerstvý materiál}} (g) = m_{\text{čerstvého materiálu s miskou}} - m_{\text{misky}}$$

$$m_{\text{sušina}} (g) = m_{\text{miska s vysušeným materiálom}} - m_{\text{misky}}$$

kde m je hmotnosť. Percento sušiny potom vypočítame z priamej úmery tak ako je znázornené nižšie.

$$\begin{array}{l} \text{hmotnosť čerstvého materiálu} \dots\dots\dots 100 \% \\ \text{hmotnosť sušiny} \dots\dots\dots x \% \end{array}$$

$$x (\%) = \frac{m_{\text{sušina}}}{m_{\text{čerstvý materiál}}} \cdot 100$$

$$\% \text{ vody} = 100 \% - \% \text{ sušiny}$$

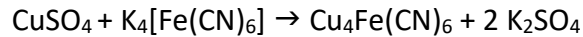
Doba trvania: príprava a váženie 30 min, sušenie do konštantnej hmotnosti v závislosti na materiáli 3 až 48 hodín.

Výsledky: Z jednotlivých misiek vypočítame percento sušiny a percento vody v rastlinných vzorkách a porovnáme jednotlivé varianty.

Úloha č. 2: Traubeho model osmotickej sústavy

Teoretický úvod: Traubeho mechúrik alebo Traubeho bunka je umelá bunka vytvorená spoločnosťou Moritz Traube s cieľom študovať procesy živých buniek vrátane rastu a osmózy. Traubeho bunka nie je skutočná bunka, pretože nie je živá a nemá vlastné skutočné biologické procesy. Princípom utvorenia Traubeho bunky je reakcia kryštálov CuSO_4 s

roztokom ferokyanidu draselného za vzniku semipermeabilnej membrány z ferokyanidu meďnatého, ktorá má tvar mechúrika. Reakcia je znázornená nižšie:



Roztok síranu meďnatého vo vnútri mechúrika je hypertonický voči okolitému roztoku $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, čím vplyvom osmotického tlaku dochádza k nasávaniu vody mechúrikom, ktorý sa zväčšuje až praskne a vyleje sa z neho roztok CuSO_4 . Síran meďnatý opäť okamžite reaguje s $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ za vzniku novej membrány. Takto interakciou dvoch jednoduchších organizovaných sústav (roztokov anorganických látok) vzniká sústava viac komplexná (osmotická sústava) s novými štruktúrami a vlastnosťami: membrány, semipermeabilita, osmóza, mechúriky, rast, pohyb a zmeny tvaru mechúrika.

Pracovné pomôcky: skúmavka, pipeta.

Chemikálie: 5 % (w/v) roztok ferokyanidu draselného $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, kryštalický CuSO_4 .

Pracovný postup:

- a) Do skúmavky napipetujeme 8 ml roztoku ferokyanidu draselného a pridáme niekoľko kryštálov CuSO_4 . Skúmavku netrasíme, ale ponecháme v pokoji. Makroskopicky pozorujeme rast mechúrikov.
- b) Na podložné sklíčko napipetujeme 20 μl destilovanej vody. Umiestnime do nej kryštál CuSO_4 , prikryjeme krycím sklíčkom. Na okraj krycieho sklíčka pripipetujeme 20 μl roztoku $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Pozorujeme pri menšom zväčšení vznik ferokyanidu meďnatého a teda vznik semipermeabilnej membrány.

Doba trvania: 35 min.

Výsledok: Schematicky zakreslíme usporiadanie mechúrikov po 1, 5 a 10 min makroskopického pozorovania. Vysvetlíme pozorovaný jav. Zaznamenáme pozorovanie pod mikroskopom, zakreslíme a vysvetlíme pozorovaný jav.

Úloha č. 3: Chemická lýza

Teoretický úvod: Lýza (z gréckeho lysis = rozpúšťanie) je rozklad alebo deštrukcia, najčastejšie smrť buniek v dôsledku rozpadu jej vonkajšej membrány. Deštrukcia bunkovej membrány môže nastať viacerými príčinami, jednou z nich je pôsobenie chemických látok. Triton X-100 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$) je typický predstaviteľ neiónových tenzidov. Pre svoje fyzikálne a chemické vlastnosti sa v laboratóriu veľmi často využíva na inaktiváciu vírusov obalených lipidovou vrstvou, vo farmaceutickom priemysle, ako súčasť vakcín, permeabilizáciu nefixovaných eukaryotických buniek, pri extrakcii DNA a podobne. Okrem

využitia v biologických laboratóriách je aj súčasťou čistiacich prostriedkov a tenzidov v kovospracujúcom priemysle.

Objekt: kultúra hmyzích buniek Sf9 alebo vnútorná pokožka cibule kuchynskej (*Allium cepa* L.).

Pracovné pomôcky: automatická pipeta, špičky, mikroskúmavka, svetelný mikroskop, potreby na mikroskopovanie.

Chemikálie: 2 % (v/v) vodný roztok Tritonu X-100 (prípadne Tween-20).

Pracovný postup: Na vyčistené podložné sklíčko napipetujeme 5 μ l suspenzie hmyzích buniek a prekryjeme krycím sklíčkom alebo do kvapky destilovanej vody si pripravíme natívny preparát vnútornej pokožky cibule a prekryjeme ho krycím sklíčkom. Pozorujeme typický tvar buniek za fyziologických podmienok. Presávacou technikou vnesieme k preparátu 20 μ l roztoku Tritonu X-100. V preparáte pod mikroskopom vyhľadáme hranicu pôsobenia tritonu, teda miesto, kde môžeme pozorovať postupný rozpad buniek. Zvolíme si jednu konkrétnu bunku, ktorú pozorujeme až do jej úplného rozpadu. Vhodným nastavením mikroskopu môžeme pozorovať „tieň“ bunky v mieste, kde sa nachádzala. Ten je tvorený zbytkami bunkových štruktúr predovšetkým cytoskeletárneho pôvodu.

Doba trvania: 25 min.

Výsledok: Popíšeme pozorované javy a vysvetlíme ich.

Úloha č. 4: Osmotická lýza

Teoretický úvod: Cytoplazmatická membrána je dôležitou štruktúrou v bunke. Tvorí bariéru medzi vnútorným a vonkajším prostredím bunky a zabezpečuje príjem a výdaj látok. Cytoplazmatická membrána je polopriepustná a selektívne prepúšťa potrebné látky z a do bunky. Osmóza je z fyzikálneho hľadiska jednosmerný prechod molekúl rozpúšťadla (solventu) cez semipermeabilnú membránu a v biologickom ponímaní ide o difúziu molekúl vody. Hnacou silou je rozdiel koncentrácií osmoticky aktívnych častíc. Osmóza závisí od koncentračného spádu. Modelovým príkladom osmózy je aplikácia vodného roztoku NaCl na bunku, kde vďaka semipermeabilnej membráne dochádza k prechodu molekúl vody, ale nie Na^+ a Cl^- . Voda sa "snaží" zriediť roztok na opačnej strane membrány, čo možno vidieť na stúpajúcej hladine roztoku NaCl a naopak klesajúcej hladine destilovanej vody.

Objekt: kultúra hmyzích buniek Sf9 alebo vnútorná pokožka cibule kuchynskej (*Allium cepa* L.).

Pracovné pomôcky: automatická pipeta, špičky, mikroskúmavka, svetelný mikroskop, potreby na mikroskopovanie.

Chemikálie: 0,1 M vodný roztok NaCl.

Pracovný postup: Na vyčistené podložné sklíčko napipetujeme 5 μ l suspenzie hmyzích buniek, ku ktorým pridáme 20 μ l 0,1 M roztoku NaCl. Prekryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme osmotickú lýzu buniek. Druhým variantom preparátu je natívny preparát vnútornej pokožky cibule, ktorý vložíme do kvapky 0,1 M roztoku NaCl. Preparát prekryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme pod mikroskopom.

Doba trvania: 25 min.

Výsledky: Popíšeme pozorované javy a vysvetlíme ich.

Úloha č. 5: Plazmolýza (plazmorýza) a plazmoptýza buniek

Teoretický úvod: Plazmolýza (v prípade živočíšnej bunky je to jav označovaný ako zmršťovanie alebo plazmorýza) nastáva v hypertonickom prostredí, kedy je koncentrácia rozpustných látok v okolí bunky vyššia ako vo vnútri bunky a na vyrovnanie tlaku sa bunka začína odvodňovať. Plazmolýza (v prípade rastlinnej bunky, odťahovanie protoplastu od bunkovej steny) je osmotický jav, ktorý nastáva v hypotonickom prostredí, kedy je koncentrácia rozpustených látok v okolí bunky nižšia ako vo vnútri bunky. Na vyrovnanie tlaku nastáva difúzia vody do bunky (bunka bobtná). Na jeho konci nastane izotonický stav. To je prostredie, kedy je koncentrácia rozpustných látok v okolí bunky aj v bunke rovnaká.

Objekt: kultúra hmyzích buniek Sf9 alebo vnútorná pokožka cibule kuchynskej (*Allium cepa* L.).

Pracovné pomôcky: automatická pipeta, špičky, mikroskúmavka, svetelný mikroskop, potreby na mikroskopovanie.

Chemikálie: 1 M vodný roztok NaCl.

Pracovný postup: Na vyčistené podložné sklíčko napipetujeme 5 μ l suspenzie hmyzích buniek, ku ktorým pridáme 20 μ l 1 M roztoku NaCl. Prekryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme zmenu tvaru buniek. Druhým variantom preparátu je natívny preparát vnútornej pokožky cibule, ktorý vložíme do kvapky 1 M roztoku NaCl. Preparát prekryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme pod mikroskopom.

Doba trvania: 25 min.

Výsledky: Zaznamenáme zmenu tvaru buniek, popíšeme pozorované zmeny a vysvetlíme, aký jav sme pozorovali a čo ho spôsobilo.

Úloha č. 6: Imbibičný tlak pri napúčaní semien

Teoretický úvod: Imbibícia je nasakovanie kvapalín, nasiakavosť. Je to jav, pri ktorom sú živé bunky schopné „naťahovať“ vodu z prostredia, v ktorom sa nachádzajú na základe semipermeabilnej schopnosti membrány rastlinnej i živočíšnej bunky. V našej úlohe suché semená prijímajú imbibíciou vodu z vlhkej sadrovej kaše, čím zväčšujú svoj objem a imbibičným tlakom spätne tlačia na sadrový klobúk. Imbibičný tlak je taký veľký, že sadrový klobúk praská. Napučanie semien trvá rôzne dlhú dobu v závislosti od typu semena (niekoľko hodín, zvyčajne 10 i viac). Potom začínajú prebiehať ireverzibilné biochemické procesy spojené s klíčením zárodka. Ak by semeno zostalo dlhodobo ponorené vo vode, začali by prebiehať kvasné procesy.

Objekt: suché semená hrachu (*Pisum sativum* L.).

Pracovné pomôcky: trecia miska, kadička, sklená tyčinka, filtračný papier, Petriho miska, odmerný valec, pipeta, váhy.

Chemikálie: sadra ($\text{CaSO}_4 \cdot n \text{H}_2\text{O}$).

Pracovný postup: Treciu misku vyložíme navlhčeným filtračným papierom. V druhej trecej miske alebo vo väčšej kadičke si rozmiešame sadru s vodou na polotekutú kašu. Časť kaše nalejeme do trecej misky vystlanej papierom. Na povrch tejto vrstvy sadry uložíme suché semená hrachu a zalejeme ich zvyškom sadrovej kaše. Necháme stuhnúť, vyklopíme na Petriho misku. Po týždni pozorujeme.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Popíšeme jav, ktorý sme pozorovali so sadrou i so semenami po 7 dňoch od uskutočnenia úlohy. Vysvetlíme pozorovaný jav.

Úloha č. 7: Škodlivé látky vo vodnom roztoku

Teoretický úvod: Hoci je voda nezastupiteľná pre život, môžu byť v nej rozpustené aj škodlivé látky poškodzujúce zdravie. Napríklad výskyt dusitanov a dusičnanov vo vode je toxický. Do vody sa dostanú či už z umelých hnojív, postrekov alebo zo žúmp, septikov, ba dokonca aj z organického odpadu. Dusičnany sa v ľudskom tele premenia na toxickejšie dusitany bakteriálnou činnosťou. V USA je maximálne povolené množstvo dusičnanov vo vode len 10 mg/l pre dospelého človeka, v nás sú limity pre vodu z vodovodu 50 mg/l pre dusičnany a 0,5 mg/l pre dusitany. Pre dojčenskú vodu sú limity 5-násobne nižšie. Dusičnany vo vodách sa dajú stanoviť aj inými metódami. Prezentovaná metóda, ktorej produktom je vznik modrého zafarbenia vznikom oxidu dusitého, je síce rýchla a jednoduchá, ale nevyužíva sa často, pretože nie je dostatočne presná a vzniknutý oxid dusitý je pomerne nestabilná látka, ktorá sa hneď mení na iné oxidy dusíka.

Objekt: voda z domáceho prostredia (v prípade možnosti voda zo studne).

Pomôcky: kadička, odmerný valec, pipeta, váhy.

Chemikálie: 1 % (w/v) roztok škrobu, 25 % (v/v) roztok kyseliny trihydrogénfosforečnej, jodid draselný.

Postup: K 50 ml vzorke skúmanej vody pridáme 1 ml roztoku škrobu, asi 1-2 ml roztoku kyseliny fosforečnej (podľa pH vody) a 0,2 g jodidu draselného. Po pridaní jodidu draselného odmeriame čas, za ktorý sa skúmaná voda sfarbí do modra. Výsledky vyhodnotíme podľa Tabuľky 2.

Tabuľka 2: Závislosť času potrebného na sfarbenie kvapaliny v závislosti od obsahu oxidu dusitého vo vzorke vody.

Čas potrebný na sfarbenie roztoku	0 sek	10 sek	30 sek	1 min	3 min	10 min
Obsah oxidu dusitého (mg/l)	< 0,50	0,30	0,20	0,15	0,10	0,05

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Na základe tabuľky 3 vyhodnotíme analyzovanú vzorku, prípadne analyzované vzorky vody a stanovíme približný obsah oxidu dusitého. Popíšeme, či je táto chemická látka vhodná alebo nevhodná vo vode.

Úloha č. 8: Vplyv kontaminovanej vody na prieduchové bunky listovej pokožky

Teoretický úvod: Olovo patrilo kedysi k veľmi využívaným kovom v ľudskej populácii. Olovo môže zapríčiniť abnormálny rast rastliny alebo jej predčasné starnutie až uhynutie. Cibuľa (*Allium cepa* L.) patrí medzi rastliny bohaté na síru, ktorá spôsobuje obmedzenie transportu olova z koreňového systému do ostatných častí rastliny, t.j. cibuľa kuchynská je rastlinou s vyššou odolnosťou voči ťažkým kovom. Práve tento fakt umožňuje pozorovať zmeny na pletivovej úrovni aj po expozícii olovom.

Objekt: semená cibule kuchynskej (*Allium cepa* L.).

Pomôcky: Petriho misky, filtračný papier, kadičky, pipeta, odmerný valec, sklená tyčinka, potreby na mikroskopovanie.

Chemikálie: $Pb(NO_3)_2$, genciánova violet, metylénová modrá, Lugolov roztok.

Postup: Semená cibule kuchynskej namočíme na 6 hod. do destilovanej vody, aby napučali. Následne ich rozložíme do 4 Petriho misiek na filtračný papier v počte 20 semien na každú

Petriho misku. Pripravíme si roztoky $Pb(NO_3)_2$ s rôznou koncentráciou na základe Tabuľky 3. Petriho misky si označíme dátum a číslom koncentrácie podľa tabuľky, pričom číslo 4 je kontrola. Semená po dobu 7 dní polievame roztokmi s rôznou koncentráciou olova a kontrolu destilovanou vodou. Po 7 dňoch vyhodnotíme v každej Petriho miske počet vyklíčených semien a z listových čepelí v každej Petriho miske si pripravíme natívne preparáty. Žiletkou list priečne narežeme a strhneme vonkajšiu (vrchnú) pokožku listu. Pozorujeme v kvapke destilovanej vody a následne presávacou technikou aplikujeme vybraného farbivo (genciánova violet, metylénová modrá, Lugolov roztok) v jednotlivých roztokoch. Pozorujeme počet prieduchov, tvar buniek a uloženie jadier v prieduchových bunkách. Výsledky zapíšeme do tabuľky (Tabuľka 3), pozorovania zdokumentujeme fotografiou.

Doba trvania: 80 min.

Výsledok: Na základe makroskopického a mikroskopického pozorovania a na základe údajov v tabuľke vyhodnotíme vplyv koncentrácie Pb na pozorovaný objekt a graficky znázorníme pozorované zmeny.

Tabuľka 3: Koncentrácia Pb v jednotlivých variantoch experimentu a sledované parametre.

Variant	1	2	3	4
Množstvo $Pb(NO_3)_2$ v mg na 100 ml vody	80	50	20	0
Počet vyklíčených semien				
Počet prieduchov na 1 mm ²				
Počet deformovaných prieduchových buniek				
Počet vychýlených jadier prieduchových buniek				

Kontrolné otázky

1. Čo je konštantná hmotnosť a ako ju vieme stanoviť vo vzorke?
2. Vymenujte tri základne mechanizmy transportu vody v živom organizme.
3. Aké dôležité vlastnosti má voda pre živý organizmus?
4. Popíšte proces difúzie a osmózy.
5. Čo je to kohézia vody?
6. Čo charakterizuje povrchové napätie vody?
7. Na čo slúži model Traubeho bunky a čo je jeho princípom?
8. Čo je imbibícia a ako sa prejavuje?
9. Aký je rozdiel medzi plazmorýzou a plazmolýzou?
10. Vďaka ktorým vlastnostiam molekuly vody je rastlina schopná rozvádzať vodu do výšky?

Zaujímavosť

Voda je zaujímavá z pohľadu jej skupenstva. Látky s ťažšími molekulami ako napríklad oxid uhličitý, dusík či molekulový kyslík sú za bežných podmienok v plynnom stave. Voda, ktorá disponuje ľahšou molekulou, je prekvapujúco kvapalná. Vysvetlením je pevnosť

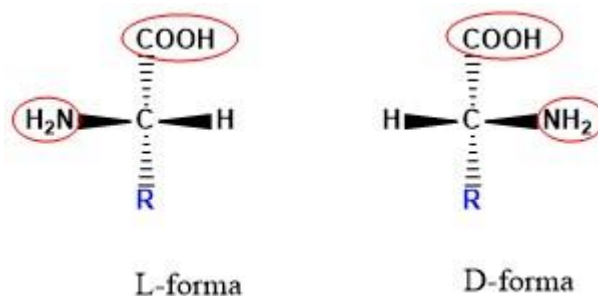
vodíkovej väzby medzi dvoma molekulami vody, ktoré spôsobuje tekutý stav vody pri izbovej teplote. Zaujímavosťou je taktiež, že žiadna iná látka sa v prírodných podmienkach nevyskytuje v troch skupenstvách ako voda. Štrukturálne (alebo termodynamické) a dynamické anomálie kvapalnej formy vody znamenajú, že voda v tekutej forme má vyššiu hustotu ako v pevnom skupenstve, čo je pri väčšine látok práve naopak. Toto zvláštne správanie vody súvisí s štvornásobne koordinovanou priestorovou geometriou, za ktorú sú zodpovedné vodíkové väzby v molekule vody. V bežných látkach poklesom teploty rastie hustota, v prípade vody však platí tento fakt len pri ochladzovaní do 3,95 °C. Ďalším ochladzovaním voda zväčšuje objem, pričom chladnejšie molekuly vody stúpajú nahor, kde zmrznú. Ľahší ľad tak pláva na hladine. Táto vlastnosť vody umožňuje prežitie mnohým vodným organizmom. Voda má výnimočne vysokú mernú tepelnú kapacitu, čo znamená, že oproti iným látkam potrebuje molekula vody viac energie na zmenu teploty. Vďaka tomu si mohutné morské prúdy uchovávajú teplo a podobne sa ani živé organizmy ľahko neprehrievajú či nepodchladia. Voda má výnimočne veľké povrchové napätie. To spôsobuje, že tvorí veľké kvapky, po vodnej hladine sa môžu pohybovať niektoré druhy hmyzu a v tenkých kapilárach vysokých stromov vie voda stúpať do obrovských výšok. Vďaka špecifickým chemickým vlastnostiam je voda univerzálnym rozpúšťadlom pre mnoho látok vrátane plynov.

PROTEÍNY

Bielkoviny alebo proteíny patria medzi primárne metabolity, ktoré plnia v organizme významné funkcie ako stavebnú, katalytickú, regulačnú, obrannú, transportnú alebo zásobnú. Sú to tuhé látky, ich rozpustnosť vo vode je veľmi odlišná, môžu tvoriť koloidné roztoky. Zdroje proteínov sú najmä rastliny (hlavne strukoviny, obilniny – ich semená, semeno konopy siatej, maku siateho, chia) a tiež živočíchy (mäso a mliečne výrobky).

Sú to biomakromolekuly zložené z aminokyselín (AMK) pospájaných kovalentnými peptidovými väzbami, čím sa vytvára tzv. **polypeptidový reťazec**. **Peptidová väzba** sa vytvára medzi α -aminoskupinou jednej aminokyseliny a α -karboxylom druhej aminokyseliny za súčasného uvoľnenia vody. Podľa počtu AMK zvyškov rozlišujeme a) dipeptidy (dve AMK), b) tripeptidy (tri AMK), c) oligopeptidy (do 10 AMK), d) polypeptidy (viac ako 10 AMK).

Proteinogénne AMK sú zložkami v proteínoch. V nich sa vyskytujú len L- α -aminokyseliny, ktoré obsahujú na α -uhlíku dve funkčné skupiny, karboxylovú skupinu (-COOH) a aminoskupinu (-NH₂). AMK sú opticky aktívne látky, ktoré majú schopnosť otáčať rovinu polarizovaného svetla. Vytvárajú tak D- a L-formy. Rozdiel v geometrii prezentuje Obrázok 10. Uhlíkový atóm, na ktorom sú naviazané štyri rôzne substituenty sa označuje ako **chirálny**. S výnimkou glycínu, ktorý má miesto R atóm vodíka, sú všetky štyri skupiny viazané na α -uhlík AMK odlišné.



Obrázok 10: Zobrazenie štruktúrneho vzorca AMK v L- a D-forme.

AMK môžeme rozdeliť z chemického hľadiska na neutrálne, kyslé a zásadité. Neutrálne majú najmenej jednu voľnú karboxylovú skupinu a jednu voľnú aminoskupinu, kyslé majú dve karboxylové skupiny a jednu aminoskupinu a zásadité naopak majú jednu karboxylovú a dve aminoskupiny. Celkový náboj AMK závisí od pH alebo protónovej koncentrácie okolitého roztoku. Schopnosť meniť náboj AMK zmenou pH sa využíva pri separácii proteínov. Hodnota pH, pri ktorej nemá AMK žiaden náboj sa nazýva izoelektrické pH alebo častejšie sa využíva termín **izoelektrický bod**. AMK môžeme tiež rozdeliť na esenciálne a neesenciálne. **Esenciálne** sú také, ktoré živočíšny organizmus nedokáže syntetizovať *de novo* a musia byť obsiahnuté v strave v dostatočnom množstve. Ich syntéza je veľmi zložitá a energeticky náročná. AMK, ktoré sú pre živočíchy esenciálne, dokážu syntetizovať rastliny a baktérie, ktoré sú zdrojom týchto AMK pre všetky ostatné organizmy. Esenciálne AMK sú pre človeka valín, leucín, izoleucín, metionín, treonín, fenylalanín, tryptofán, lyzín a histidín. Neesenciálna AMK je taká, ktorú si živočíšny organizmus dokáže sám syntetizovať.

Vzájomné pôsobenie AMK vytvára komplikovanú, ale prísne determinovanú **trojrozmernú štruktúru** so špecifickou funkciou. V prípade proteínov boli zavedené štyri hierarchické úrovne štruktúrnej organizácie polypeptidového reťazca a to primárna, sekundárna, terciálna a kvartérna štruktúra. **Primárna štruktúra** je daná poradím jednotlivých AMK v polypeptidovom reťazci. Je najzákladnejšou štruktúrou proteínu. Zapisuje sa od N-konca po C-koniec, typicky jednopísmenovými skratkami AMK a teda hodnotí sumárne zloženie molekuly proteínu a z toho vyplývajúce vlastnosti a biologickú funkciu. **Sekundárna štruktúra** charakterizuje priestorové usporiadanie peptidového reťazca. Z jej vznikom súvisí tvorba vodíkových väzieb medzi -CO- a -NH- a usporiadanie atómov v blízkosti peptidovej väzby. Najčastejšie sekundárne štruktúry sú β -skladaný list a α -helix. **Terciálna štruktúra** zahŕňa celý polypeptidový reťazec a charakterizuje spôsob usporiadania polypeptidového reťazca v priestore, ktorý je stabilizovaný aj rôznymi nekovalentnými väzbami ako sú vodíkové, iónové a pod. Terciálna štruktúra (konformácia) predstavuje definitívne priestorové usporiadanie α -helixov a β -skladaných listov v priestore, poprepájaných rôzne zvlákným polypeptidovým vláknom. **Kvartérna štruktúra** predstavuje usporiadanie subjednotiek daného proteínu v priestore, pričom tieto subjednotky môžu byť rovnaké alebo rozličné. Vyskytuje sa iba u niektorých zložitých proteínov, ktoré sú tvorené z viacerých proteínových podjednotiek. Kvartérna štruktúra predstavuje definitívne usporiadanie takýchto podjednotiek v priestore do jednej komplexnej makromolekuly proteínu. Toto spojenie polypeptidových reťazcov je spôsobené slabými medzimolekulovými interakciami.

Proteíny môžeme ďalej rozdeliť podľa ich tvaru na **globulárne** proteíny, kam zaraďujeme množstvo enzýmov a tiež **vláknité (fibrilárne)** proteíny. Globulárne proteíny majú složené polypeptidové reťazce usporiadané do klobka, zatiaľ čo vláknité (fibrilárne) proteíny majú pretiahnutý (paličkovitý) tvar. Okrem **linerálneho** reťazca môžu polykondenzáciou AMK vzniknúť aj uzavreté reťazce, ktoré nemajú voľnú karboxylovú alebo aminoskupinu a nazývajú sa **cyklické**. Proteíny môžu byť tiež **konjugované**. Takéto sa veľmi často vykytujú v živých organizmoch a obsahujú aj nepeptidovú zložku (prostetickú skupinu). Príkladom sú glykoproteíny (resp. mukoproteíny) – prostetické skupiny sú galaktóza, manóza, fukóza; lipoproteíny – triglyceridy alebo cholesterol; metaloproteíny – ióny kovov; fosfoproteíny – kyselina fosforečná; nukleoproteíny – nukleové kyseliny; chromoproteíny – pigmentová zložka ako majú napr. hemoproteíny, flavoproteíny a špeciálnu skupinu tvoria vírusové proteíny (kapsidové bielkoviny, príp. proteíny).

Rozrušenie natívneho stavu proteínu, teda narušenie sekundárnej, terciárnej a prípadne kvartérnej štruktúry sa nazýva **denaturácia**. Ide o takú zmenu trojdimenzionálnej štruktúry proteínu, ktorá vedie ku strate jej funkcie. Dochádza k rozrušeniu nekovalentných väzieb (vodíkové, hydrofóbne interakcie, elektrostatické sily), ktoré podmieňujú priestorovú štruktúru. Denaturácia môže byť vratná (reverzibilná) alebo nevratná (irevizibilná). V prípade vratnej denaturácie je možné obnovenie štruktúry proteínu jeho opätovnou redenaturáciou po odstránení denaturačného faktora. Nevratná denaturácia spôsobí nenávratnú zmenu, resp. poškodenie proteínu, pričom jeho štruktúra sa už nedá obnoviť. Denaturácia môže

nastať: i) mechanickými faktormi (napr. dlhodobý mechanický pohyb pri miešaní vaječného bielka), ii) fyzikálnymi faktormi (zvýšenou teplotou, sušením, rôznymi druhmi žiarenia, zmenou pH) alebo iii) chemickými faktormi (kyselinami, zásadami, soľami ťažkých kovov, organickými rozpúšťadlami ako etanol a acetón, denaturačnými činidlami ako močovina, guanidín, hydrochloridy a detergenty).

Úloha č. 1: Izolácia proteínov z mlieka

Teoretický úvod: Kravské mlieko obsahuje približne 3,3 % proteínov. Okrem nich sa v mlieku nachádza aj mliečny cukor a mliečne tuky. Z jednotlivých proteínov sa v mlieku nachádza najmä kazeín a mliečny albumín. Proteín kazeín (patrí medzi fosfoproteíny) sa v čerstvom mlieku nachádza viazaný s iónmi Ca^{2+} . Pridaním kyseliny octovej (ocot je jej zriedený roztok) sa zmení pH roztoku na takú hodnotu, pri ktorej sa dosiahne tzv. **izoelektrický bod** kazeínu ($\text{pI} = 4,8$) a vyzráža sa biela zrazenina - voľný kazeín, ktorý je takmer úplne bez vápnika. Pre proteíny platí, že sú najmenej rozpustné v roztokoch s pH rovnajúcim sa ich izoelektrického bodu. Po odfiltrovaní zrazeniny ostáva vo filtráte ďalší proteín - mliečny albumín. Tento je rozpustný vo vode a denaturuje sa pri $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ionizované funkčné skupiny podmieňujú hydrofilný charakter proteínových molekúl, ktoré sú vodných roztokoch silne hydratované. Proteín môže viazať vodu v množstve 30 až 50 % svojej hmotnosti. Prídavkom organických rozpúšťadiel alebo solí sa hydratácia proteínov spravidla najskôr zväčšuje (vsoľovací efekt), prechádza maximom a následne klesá (vysoľovací efekt). Pri vysolovacom efekte dochádza k vzájomnej interakcii molekúl proteínov, resp. ich jednotlivých ionizovaných skupín, čo vedie k agregácii a vyzrážaniu proteínov z roztoku. Na tomto princípe sa zakladá zrážanie proteínov z roztoku s využitím organických rozpúšťadiel ako je etanol alebo acetón alebo roztoku neutrálnych solí ako je chlorid sodný, ale najčastejšie s použitím síranu amónneho. Vyzrážanie proteínov z roztoku je podmienené tým, že molekuly proteínu sa vzájomne neodpuďujú (sú bez náboja) a majú tendenciu asociovať sa, čím klesá ich rozpustnosť v roztoku. Tento termín sa používa napríklad v biochémií, pri určení vlastností AMK v roztoku. AMK sú amfolyty, teda látky, ktoré sa správajú aj ako kyseliny, aj ako zásady v závislosti od hodnoty pH. To je určené ich funkčnou karboxylovou a aminoskupinou. V roztoku pri pI tvorí AMK obojaký ión, obe funkčné skupiny sú ionizované, je elektroneutrálna.

Objekt: mlieko.

Pracovné pomôcky: Kadičky, tyčinka, kvapkadlo, filtračná aparatura, skúmavka, držiak na skúmavku, vodný kúpeľ.

Chemikálie: 8 % (v/v) roztok kyseliny octovej (CH_3COOH).

Pracovný postup: K 50 ml mlieka v kadičke prikvapkáme niekoľko kvapiek roztoku kyseliny octovej, kým nám nevznikne zrazenina v dôsledku dosiahnutia izoelektrického bodu kazeínu.

Premiešame jemne a vzniknutú zrazeninu kazeínu odfiltrujeme. Následne filtrát zahrejeme nad kahanom alebo vo vodnom kúpeli. Pozorujeme zrazeninu proteínov, najmä albumínu na filtračnom papieri a zmeny vo filtráte po zahrievaní.

Doba trvania: 30 min.

Výsledky: Popíšeme pozorované javy na filtračnom papieri a aj vo filtráte po zahrievaní. Vysvetlíme.

Úloha č. 2: Dôkaz peptidovej väzby v proteínoch

Teoretický úvod: Dôkaz prítomnosti proteínov v kultúre pekárenských kvasníc je možné uskutočniť na základe biuretovej reakcie, kedy dochádza k zmene sfarbenia roztoku z hnedej farby na červenú, modrofialovú až fialovú. Biuretovu reakciu okrem proteínov dáva glukóza a iné med' redukujúce látky ako napr. sulfhydrylové skupiny proteínov (keratín), vysoké koncentrácie amónnych iónov a niektoré fosfáty, používané pri purifikácii proteínov. Zlúčeniny obsahujúce dve a viac peptidových väzieb (teda obsahujúce dve a viac AMK) vytvárajú komplex s Cu^{2+} iónmi a dávajú charakteristické zafarbenie. Táto reakcia neprebíha s voľnými AMK. Intenzita zafarbenia závisí od molekulovej hmotnosti proteínu a tiež od počtu peptidových väzieb zúčastňujúcich sa reakcie. Polypeptidy sú fialovej farby a menšie peptidy sú červenej farby.

Objekt: pekárenské kvasnice.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, pipeta, tyčinka, nôž.

Chemikálie: 10 % (w/v) roztok KOH, 5 % (w/v) roztok CuSO_4 .

Pracovný postup: 0,3 g kvasníc odvážeme a vložíme do skúmavky, pridáme 5 ml destilovanej vody a rozmiešame. Pre porovnanie do druhej skúmavky napipetujeme 5 ml destilovanej vody. Do oboch skúmaviek napipetujeme po 1 ml KOH a po pretrepaní 0,5 ml CuSO_4 . Znovu pretrepeme a po 10 minútach pozorujeme.

Doba trvania: 30 min.

Výsledky: Popíšeme pozorované javy v skúmavke s objektom a porovnáme s kontrolou. Vysvetlíme pozorovaný jav.

Úloha č. 3: Farebné reakcie proteínov

Teoretický úvod: Ionizované funkčné skupiny proteínov sú schopné reagovať s rozličnými iónmi v roztoku, čo sa využíva pri farbení proteínov kyslými alebo zásaditými organickými farbivami. Ide vlastne o dôkazové reakcie proteínov. Funkčné skupiny a iné zložky proteínov

(-NH₂, fenolová skupina, indolové jadro, tiolová skupina a i.) reagujú s organickými farbivami a iónmi za vzniku charakteristického zafarbenia.

Objekt: Zdroje proteínov ako napríklad vajce, mlieko, jogurt, kvasnice, strukoviny.

Pracovný postup: Pripravíme si extrakty proteínov nasledovne:

1. kadička: roztok vaječného bielka (1 bielok v 50 ml destilovanej vody),
2. kadička: mlieko (50 ml mlieko),
3. kadička: kadička: roztok kvasníc (5 g kvasníc v 50 ml destilovanej vody),
4. kadička: roztok strukoviny (10 g pomletých suchých strukovín v 50 ml destilovanej vody, prefiltrovať),
5. kadička: roztok komerčného proteínu (5 g proteínov v 50 ml destilovanej vody),
6. kadička: roztok vaječného žltka (vaječný žltok v 50 ml destilovanej vody),
7. kadička: roztok sacharidu (5 g sacharózy v 50 ml destilovanej vody),
8. kadička: destilovaná voda ako kontrola.

a) Biuretová reakcia

Teoretický princíp: Biuretová reakcia je založená na reakcii peptidovej väzby proteínu (-CO-NH-) s meďnatými iónmi v alkalickom prostredí, pričom vzniká červené až modrofialové zafarbenie. Intenzita zafarbenia závisí od molekulovej hmotnosti proteínu alebo polypeptidu. Čím je molekula proteínu menšia, tým je výsledné zafarbenie intenzívnejšie. Pri použití nadbytočného množstva síranu meďnatého vzniká v priebehu reakcie hydroxid meďnatý ako svetlozelená zrazenina, ktorá ruší vyhodnotenie. Citlivosť metódy je v rozsahu 5-160 mg/ml proteínov. Názov "biuretová reakcia" je odvodený od biuretu ((H₂N-CO-)₂NH), ktorý vzniká zohrievaním močoviny, pričom sa uvoľňuje amoniak. Vznikajúci biuret má peptidovú väzbu, preto aj pri proteínoch, hoci biuret neobsahujú, je reakcia pozitívna.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan, pipety, kvapkadlo.

Chemikálie: 1 % (w/v) roztok CuSO₄, 20 % (w/v) roztok KOH (prípadne 20 % (w/v) roztok NaOH).

Pracovný postup: Pripravíme si do stojana 8 skúmaviek. Označíme si ich a do každej napipetujeme po 2 ml roztoku z kadičiek 1-8 obsahujúcich rôzne vzorky. Do každej skúmavky následne pridáme 2 ml roztoku KOH a opatrne po kvapkách pridávame roztok CuSO₄.

Doba trvania: 15 min.

Výsledky: Vyhodnotíme farebnú reakciu v každej skúmavke a vysvetlíme rôzne odozvy jednotlivých vzoriek.

b) Xantoproteínová reakcia

Teoretický princíp: V molekule proteínov sú viazané aromatické aminokyseliny (tyrozín, tryptofán, fenylalanín) s benzénovým jadrom. Jadro sa kyselinou dusičnou (HNO_3) reaguje za vzniku žltu sfarbených zlúčenín. Neutralizáciou kyslého prostredia (napr. amoniakom) sa zmení farba na oranžovú.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, sklenená tyčinka, pipeta, vodný kúpeľ.

Chemikálie: koncentrovaná kyselina dusičná (HNO_3), 10 % (v/v) hydroxid amónny.

Pracovný postup: Pripravíme si do stojana 8 skúmaviek. Označíme si ich a do každej napipetujeme po 2 ml roztoku z kadičiek 1-8 obsahujúcich rôzne vzorky. Do každej skúmavky pridáme opatrne 1 ml koncentrovanej kyseliny dusičnej. Zahrejeme a pozorujeme prípadnú farebnú zmenu. Skúmavky ochladíme a roztok zneutralizujeme hydroxidom amónnym.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Vyhodnotíme farebnú reakciu v každej skúmavke a vysvetlíme rôzne odozvy jednotlivých vzoriek.

c) Raspailová reakcia

Teoretický princíp: Skúmaný roztok obsahujúci proteíny sa pri tejto reakcii sfarbí na červeno (prípadne až na purpurovo). Je to preukazná, aj keď nie celkom špecifická, reakcia na proteíny.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, kvapkadlo.

Chemikálie: koncentrovaná kyselina sírová (H_2SO_4), nasýtený roztok sacharózy.

Pracovný postup: Pripravíme si do stojana 8 skúmaviek. Označíme si ich a do každej napipetujeme po 2 ml roztoku z kadičiek 1-8 obsahujúcich rôzne vzorky. Do každej skúmavky pridáme niekoľko kvapiek roztoku sacharózy a rovnaké množstvo kyseliny sírovej. Pozorujeme zmeny.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Vyhodnotíme farebnú reakciu v každej skúmavke a vysvetlíme rôzne odozvy jednotlivých vzoriek.

d) Ninhydrínová reakcia

Teoretický princíp: S ninhydrínom reagujú všetky AMK, peptidy a proteíny, ktoré majú voľnú karboxylovú alebo aminoskupinu. V prvej fáze reakcie sa vytvorí Schiffova báza (ketimín), ktorá sa potom oxidačne dekarboxyluje za vzniku aldimínu. Ten hydrolyzuje na nestálu formu amínu, ktorá reaguje s ďalšou molekulou ninhydrínu a vzniká (zvyčajne)

intenzívne sfarbená tzv. Ruhemanova violeť. Farebné produkty reakcií však závisia od použitej AMK a/alebo proteínu. Ninhydrínová reakcia je nielen kvalitatívnym testom na dôkaz AMK či proteínov, ale je aj zdrojom absorbujúceho materiálu, ktorého absorbancia sa môže kvantitatívne stanoviť. Ninhydrínová farebná reakcia sa tiež používa na stanovenie polohy AMK pri ich separácii pomocou chromatografickej metódy. Vo forenznej chémii sa ninhydrínový test používa na detekciu odtlačkov prstov. Hydratovaný uhlík 2,2-dihydroxyindán-1,3-diónu je značne elektrofilný a je atakovaný nukleofilným amínom za vzniku imínu, ktorý dekarboxyláciou a hydrolýzou poskytne amino-1,3-diketón. Jeho kondenzáciou s ninhydrínom vzniká príslušný chromofór. Výsledkom dôkazu prítomnosti proteínov je v tomto prípade intenzívne modré až fialové zafarbenie.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, vodný kúpeľ.

Chemikálie: alkoholový roztok ninhydrínu (1 g ninhydrínu rozpustíme v 10 ml 96 % (v/v) etanolu a doplníme destilovanou vodou na objem 100 ml).

Pracovný postup: Pripravíme si do stojana 8 skúmaviiek. Označíme si ich a do každej napipetujeme po 2 ml roztoku z kadičiek 1-8 obsahujúcich rôzne vzorky. Do každej kadičky pridáme 1 ml alkoholového roztoku ninhydrínu. Inkubujeme vo vriacom vodnom kúpeli 15-20 sekúnd. Vyhodnotíme.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Vyhodnotíme farebnú reakciu v každej skúmavke a vysvetlíme rôzne odozvy jednotlivých vzoriek.

e) Adamkiewiczova (glyoxálová) reakcia

Teoretický princíp: Adamkiewiczova reakcia využíva kondenzáciu tryptofánu, ktorý sa uvoľňuje pri hydrolýze proteínov s kyselinou glyoxylovou v silne kyslom prostredí kyseliny sírovej za vzniku červenofialového produktu. Reakcia slúži na detekciu indolovej skupiny tryptofánu. Červenofialový až purpurový prsteň na rozhraní roztokov dokazuje tryptofán v analyzovanom proteíne.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, pipety.

Chemikálie: koncentrovaná kyselina octová (CH_3COOH), koncentrovaná kyselina sírová (H_2SO_4).

Pracovný postup: Pripravíme si do stojana 8 skúmaviiek. Označíme si ich a do každej napipetujeme po 2 ml roztoku z kadičiek 1-8 obsahujúcich rôzne vzorky. Do každej skúmavky pridáme 1 ml koncentrovanej kyseliny octovej (býva znečistená kyselinou glyoxálovou, ktorá túto reakciu spôsobuje) a dobre zamiešame. Po stene skúmavky veľmi opatrne a jemne nalejeme 0,5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej, aby sa roztoky v skúmavke nepremiešali.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Vyhodnotíme farebnú reakciu v každej skúmavke a vysvetlíme rôzne odozvy jednotlivých vzoriek.

Úloha č. 4: Dôkaz síry v proteínoch

Teoretický úvod: AMK obsahujúce síru (cysteín, metionín) a proteíny obsahujúce tieto AMK uvoľňujú pôsobením alkalických hydroxidov za tepla sírovodík, ktorý možno dokázať reakciou s olovnatými soľami, napr. octanom olovnatým ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), pričom vzniká čierna nerozpustná zrazenina sulfidu olovnatého (PbS).

Objekt: vodné roztoky proteínov priripavené v kadičkách 1-8 z Úlohy č. 4, prípadne 20 % (w/v) vodný roztok aminokyselín s obsahom síry (cysteín, metionín).

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, pipeta, vodný kúpeľ.

Chemikálie: 5 % (w/v) octan olovnatý ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), 50 % (w/v) NaOH.

Pracovný postup: Pripravíme si do stojana 10 skúmaviek. Označíme si ich a do skúmaviek 1-8 napipetujeme po 5 ml roztoku z kadičiek 1-8 obsahujúcich rôzne vzorky. Do skúmavky 9 a 10 napipetujeme po 5 ml vodného roztoku AMK cysteínu a metionínu. Do každej skúmavky pridáme niekoľko kvapiek octanu olovnatého, aby vznikla zrazenina. Následne pridáme do každej skúmavky rovnaké množstvo NaOH, kým sa zrazenina nerozpustí. Skúmavky opatrne zahrievame, kým nepozorujeme hnedé až čierne zafarbenie od vzniknutého PbS .

Doba trvania: 30 min.

Výsledky: Popíšeme pozorované farebné zmeny v skúmavkách na konci reakcie a vyhodnotíme, v ktorých skúmavkách bola prítomná AMK, príp. proteín s obsahom síry.

Úloha č. 5: Denaturácia proteínov vaječného bielka

Teoretický úvod: Proteíny obsiahnuté vo vaječnom bielku (vaječné bielko obsahuje 12 % proteínov, pričom 70 % z nich tvorí vaječný albumín) reagujú citlivo na soli ťažkých kovov, etanol a aj na zvýšenú teplotu. Organickými rozpúšťadlami (napr. etanol) a niektorými soľami (napr. CuSO_4) sa proteíny vratne zrážajú. V prípade pôsobenia vysokej teploty nastáva u proteínov denaturácia, pri ktorej sa narúša sekundárna a terciárna štruktúra, aktívne miesta strácajú svoje špecifické priestorové usporiadanie a teda sa znižuje alebo stráca biologická aktivita molekuly. Denaturácia je v tomto prípade nevratná reakcia. V roztoku vaječného bielka v našom experimente sa pôsobením modrej skalice, teda pentahydrátu síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) vytvorí bledomodrá zrazenina. Roztok v druhej skúmavke sa po pridaní etanolu zakalí a rovnako sa zakalí aj obsah tretej skúmavky, ktorú sme zahrievali.

Objekt: slepačie vajce.

Pracovné pomôcky: Kadička, lyžička, príp. sklená tyčinka, odmerný valec, pipeta, skúmavky, držiak na skúmavky, teplomer, vodný kúpeľ.

Chemikálie: 30 % (w/v) vodný roztok modrej skalice ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), príp. izopropanol.

Pracovný postup: Zo slepačieho vajca oddelíme vaječný bielok a rozpustíme ho miešaním v kadičke v 30 ml destilovanej vody. Do troch skúmaviek si pripravíme po 5 ml roztoku vaječného bielka. Potom do prvej skúmavky pridáme 1 ml roztoku modrej skalice, do druhej skúmavky pridáme 1 ml etanolu (alebo izopropanolu) a obsah tretej skúmavky zahrievame vo vodnom kúpeli (nie vriacom, teplotu udržiavame cca na 60 °C, kontrolujeme pomocou teplomera). Pozorujeme zmeny v skúmavkách. Skúmavky si odložíme do konca cvičenia a výsledok reakcie skontrolujeme.

Doba trvania: 30 min.

Výsledky: V protokole porovnáme výsledok reakcie ihneď po jej uskutočnení a na konci laboratórneho cvičenia.

Úloha č. 6: Koagulácia proteínov

Teoretický úvod: Koagulácia proteínov predstavuje proces zrážania teplom, zhukovanie, zrážanie tuhej látky z roztoku. Koaguláciu proteínov je možné spôsobiť zvýšením koncentrácie solí v roztoku, tzv. vysolovaním, čoho výsledkom je vznik zrazeniny proteínov. Tento proces môže byť vratný (reverzibilný) alebo nevratný (ireverzibilný). Zrazenina vzniknutá vratnou (reverzibilnou) koaguláciou sa pridaním vody rozptýli na pôvodný koloidný roztok. Takáto zrazenina vzniká napríklad pôsobením neutrálnych solí, konkrétne chloridu sodného. Naopak, zrazeniny, ktoré vznikli nevratnou (ireverzibilnou) koaguláciou nie je možné rozpustiť. Vnikajú napríklad pôsobením solí ťažkých kovov, účinkom vyššej teploty, ožiarení, pôsobením roztokov kyselín a zásad. V takomto prípade dochádza k ireverzibilným zmenám sekundárnej a terciárnej štruktúry, takzvaná denaturácia, pri ktorej proteíny strácajú svoju biologickú aktivitu.

Objekt: vodné roztoky proteínov z Úlohy č. 4.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, pipeta, kvapkadlo, vodný kúpeľ.

Chemikálie: ľadová kyselina octová, kryštalický NaCl, metanol.

Pracovný postup: Pripravíme si do stojana 8 skúmaviek. Označíme si ich a napipetujeme po 5 ml roztoku z kadičiek. Do každej skúmavky pridáme 5 kvapiek ľadovej kyseliny octovej a zahrejeme na 100 °C. Vytvorí sa zrazenina proteínov. Potom pridáme niekoľko kryštálov NaCl a prilejeme 5 ml metanolu. Pozorujeme prejav proteínov.

Doba trvania: 30 min.

Výsledky: Popíšeme pozorované zmeny vplyvom jednotlivých reakcií v skúmavkách a porovnáme s kontrolou (destilovaná voda). Vysvetlíme pozorované javy a vlastnosti proteínov.

Úloha č. 7: Zrážanie proteínov ťažkými kovmi

Teoretický úvod: Zrážanie proteínov je proces realizovaný rôznymi vonkajšími činiteľmi ako je teplota, žiarenie alebo prítomnosť ťažkých kovov. Ide o zmenu terciárnej štruktúry proteínu. V závislosti od vonkajšieho faktora ide o zmeny v štruktúre proteínu vratné alebo nevratné.

Objekt: vodné roztoky proteínov z Úlohy č. 4.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, pipeta, kvapkadlo, vodný kúpeľ.

Chemikálie: 5 % (w/v) octan olovnatý ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), 10 % (w/v) ferokyanid draselný, kyselina octová, 3 M kyselina trichlóroctová, 1 M kyselina trichlóroctová.

Pracovný postup: Pripravíme si do stojana 4 rady po 8 skúmaviiek. Označíme si ich. Do všetkých skúmaviiek napipetujeme po 2 ml roztoku z kadičiek 1-8 obsahujúcich rôzne vzorky. V prvom rade k roztokom proteínov pridáme 6 ml octanu olovnateho. Proteíny vytvoria nerozpustnú zrazeninu. V druhom rade k roztokom proteínov pridáme ferokyanid draselný a niekoľko kvapiek kyseliny octovej. Pozorujeme vznik nerozpustnej zrazeniny. V tretom rade pridáme k roztokom proteínov 2 ml destilovanej vody a 2 ml 3 M kyseliny trichlóroctovej. Roztok necháme stáť v chladničke cca 30 min (až hodinu). Vyzrážané proteíny centrifugujeme pri 2 000 až 4 000 g. Zrazeninu premyjeme 1 M kyselinou trichlóroctovou a znovu centrifugujeme.

Doba trvania: 40 min + 60 min čakanie.

Výsledky: Pozorujeme zrážanie proteínov spôsobené rôznymi činiteľmi. Vysvetlíme pozorované javy.

Kontrolné otázky

1. Popíšte základné funkcie proteínov v organizme živočíchov a rastlín.
2. Aké sú to proteínogénne aminokyseliny a akú môžu mať konfiguráciu?
3. Popíšte primárnu a sekundárnu štruktúru proteínu.
4. Popíšte terciárnu štruktúru proteínu s dôrazom na výskyt chemických väzieb v štruktúre.
5. Popíšte význam kvartérnej štruktúry proteínu.
6. Čo viete o denaturácii proteínov?
7. Ako by ste dokázali prítomnosť síry v proteínoch?
8. Aký je význam biuretovej reakcie a čo je jej pozitívnym prejavom?
9. Ktorá dôkazová reakcia proteínov sa využíva vo forenznej chémii a aký je jej princíp?

10. Ako by ste charakterizovali pojem izoelektrický bod a aký je jeho význam v súvislosti s aminokyselinami?

Zaujímavosť

V posledných rokoch rastie záujem spájať znalosti získané z oblasti biológie, hlavne z molekulovej biológie, s inžinierstvom. Jedným z trendov v tomto smere je vývoj tzv. biopočítačov. Počítače novej generácie by mohli byť podstatne menšie ako doteraz, čo by bolo možné pomocou malých biologických kostier, ktoré držia naše bunky pohromade. Tímy vedcov vyvíjajú spôsob výroby počítačových čipov pomocou cytoskeletónov – proteínových lešení, ktoré bunkám dodávajú tvar a je možné ich použiť namiesto tradičných kremíkových nosičov čipov. Cytokíny sú tvorené proteínovými štruktúrami, ktoré sú široké iba 25 nm, čo je zhruba polovica dĺžky vírusu hepatitídy. Počítačové signály by sa mohli vysielat' cez dva proteíny, ktoré tvoria cytokíny – aktín a tubulín. Tieto proteíny prenášajú signály cez bunku pomocou pohybov atómov a elektrónov a tým je možné manipulovať a vykonávať základné operácie v počítači. Podľa nového teoretického modelu by sa signály mohli použiť na výrobu logických brán, jednej zo základných jednotiek digitálnych počítačov. Ak sa tieto čipy vyvinú, môžu priniesť nový vek počítačov, v ktorom čipy budú omnoho menšie a efektívnejšie. Cytoskelety sú veľmi malé a preto spotrebujú málo energie, čo ich robí omnoho účinnejšími ako sú tradičné kremíkové čipy. Zároveň tieto čipy by bolo možné zabudovať do 3D štruktúry na rozdiel od kremíkových, ktoré musia byť na plocho, čím by bolo možné hromadiť do reťazcov milióny procesorov bez toho, aby zaberali veľa priestoru.

SACHARIDY

Sacharidy sú stálou zložkou všetkých buniek živých organizmov a patria medzi primárne metabolity. V bunkách majú rozmanité funkcie, ale vo všeobecnosti je možné povedať, že sú zdrojom energie, medziproduktami metabolizmu, tvoria štruktúrnu kostru RNA a DNA, sú zložkami bunkových stien baktérií a rastlín a kovalentne sa viažu s mnohými lipidmi a proteínmi. Molekula sacharidu sa skladá z uhlíka, vodíka a kyslíka. Ich pomer je $C_nH_{2n}O_n$ alebo $C_n(H_2O)_n$ a z tohto vzorka vznikol aj terminologicky nesprávny názov „uhlíohydráty“ alebo „uhlíkovodany“. Deriváty sacharidov obsahujú fosfor, dusík a prípadne aj síru. Rozpustné sacharidy sa nazývajú cukry. Cukry teda predstavujú istú podskupinu sacharidov.

Podľa počtu sacharidových jednotiek delíme sacharidy na **monosacharidy** (jednoduché sacharidy s 1 sacharidovou jednotkou), **oligosacharidy** (2 až 10 monosacharidových jednotiek) a **polysacharidy** (spájanie väčšieho počtu monosacharidov). Polysacharidy rozdeľujeme ďalej na **homopolysacharidy**, ktoré sa skladajú len z jedného druhu monosacharidu a **heterosacharidy**, ktoré sa skladajú z viac ako jedného druhu monosacharidu. Zložené sacharidy vznikajú spojením monosacharidov glykozidickou väzbou. Touto väzbou sa sacharidy môžu spájať aj s inými, nie sacharidovými látkami, ako sú napr. lipidy alebo proteíny. Označujeme ich ako glykolipidy, preoglykány alebo glykoproteíny.

Monosacharidy sú jednoduché sacharidy, ktoré sa hydrolyticky neštiepia na menšie jednotky. Podľa počtu uhlíkov ich delíme na triózy (3C), tetrózy (4C), pentózy (5C), hexózy (6C), heptózy (7C), októzy (8C) a nonózy (9C). Triózy a tetrózy sa v čistej forme vyskytujú zriedkavo, dôležité sú ako metabolické medziprodukty. Medzi triózy patrí glyceraldehyd a medzi tetrózy zaradujeme napríklad erytrózu, ktorá je dôležitým medziproduktom v metabolizme sacharidov a substrát pre biosystézu aromatických látok. Monosacharidy sa ďalej delia podľa toho, či majú aldehydovú ($-CH=O$) alebo ketoskupinu ($>C=O$) na polyhydroxyaldehydy alebo aldózy (napr. glukóza) a polyhydroxyketóny alebo ketózy (napr. fruktóza). Monosacharidy sú zvyčajne bezfarebné kryštalické látky, ktoré sú dobre rozpustné vo vode alebo v zriedenom roztoku etanolu, avšak sa nerozpúšťajú v organických rozpúšťadlách. Sú charakteristické sladkou chuťou s rôznou intenzitou. Do metabolických reakcií monosacharidy vstupujú často vo fosforylovej forme, ktorá vyžaduje prítomnosť makroergickej zlúčeniny ATP a enzýmy (kinázy). Medzi významné monosacharidy už okrem spomínanej glukózy a fruktózy, patria tiež arabinóza, xylóza, ribóza, manóza alebo galaktóza.

Monosacharidy vytvárajú izoméry, čo znamená, že sacharidy s rovnakým sumárnym vzorcom majú iné štruktúrne usporiadanie atómov v molekule. Práve prítomnosť chirálneho uhlíka umožňuje tvorbu izomérov. Známa je najmä D- a L-izoméria, ktorú určuje poloha $-OH$ skupiny na chirálnom uhlíku. Monosacharidy vyskytujúce sa v organizmoch patria do D-formy.

Pentózy a hexózy dokážu vytvárať pyranózové a furanózové kruhové štruktúry reakciou aldehydovej alebo ketoskupiny s hydroxylovou skupinou za vzniku poloacetálu alebo poloketálu. Pri vlastnostiach sacharidov zohráva dôležitú úlohu **voľná poloacetálová hydroxylová skupina** ($-OH$), ktorá vzniká pri intramolekulovej adícii hydroxylovej skupiny na

karbonylovú. Táto skupina na prvom uhlíku v prípade aldóz je mimoriadne reaktívna a reaguje s mnohými látkami. Jej reaktívnosť je aj základom pre stanovenie prítomnosti vybraných sacharidov na základe ich redukčných vlastností. Takéto sacharidy označujeme ako redukujúce. Vystavením varu mono- a disacharidov obsahujúcich voľnú poloacetálovú hydroxyskupinu v silno alkalickom prostredí vznikajú ako medziprodukty tzv. reduktóny, ktoré redukujú komplexne viazané ióny ťažkých kovov (Cu^{2+} , Bi^{3+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ag^+) a niektoré iné látky (kyselinu pikrovú, metylénovú modrú). Sacharidy, ktoré nemajú voľnú poloacetálovú hydroxylovú skupinu, nemajú redukčné vlastnosti a nazývame ich neredukujúce sacharidy.

Oligosacharidy delíme podľa počtu monomérov na disacharidy (2 monosacharidy, napr. sacharóza), trisacharidy (3 monosacharidy) a podobne. Monosacharidové jednotky sa spájajú glykozidovou väzbou, ktorá sa pôsobením kyselín alebo enzýmov ľahko štiepi a vznikajú tak monosacharidy. Medzi najznámejšie oligosacharidy patrí sacharóza, čo je disacharid zložený z glukózy a fruktózy a tiež sa označuje ako repný cukor. Ďalej je to disacharid laktóza, alebo mliečny cukor, zložená z galaktózy a glukózy, disacharid maltóza označovaná ako melasový alebo sladový cukor pozostávajúci z dvoch molekúl glukózy. Medzi známe trisacharidy zaraďujeme rafinózu, ktorá je súčasťou repného cuktra a je zložená z galaktózy, fruktózy a glukózy. Inulíny sú tvorené z 2 až 140 fruktózových jednotiek. Pôsobením kyselín alebo činnosťou enzýmov sa ľahko hydrolyticky štiepia na monosacharidy. Majú podobné fyzikálne a chemické vlastnosti ako monosacharidy. Ich redukčné vlastnosti závisia od toho, či majú voľnú poloacetálovú hydroxylovú skupinu. Sacharóza, ktorá je najznámejším disacharidom, má tieto v molekule spojené tak, že nemá voľnú poloacetálovú hydroxylovú skupinu, preto sacharóza neredukuje príslušné ľahko redukovateľné látky (CuSO_4 , AgNO_3 a podobne).

Polysacharidy majú reťazcové molekuly zložené z veľkého počtu monosacharidových jednotiek (molekúl). Stavebnou jednotkou polysacharidov býva veľmi často glukóza. Nekryštalizujú a vo vode a v organických rozpúšťadlách sa iba ťažko rozpúšťajú, a to iba na nepravý koloidový roztok. Nemajú redukčné vlastnosti a sú bez chuti. V kyslom prostredí alebo pôsobením enzýmov sa štiepia na oligosacharidy alebo až na monosacharidy. Medzi najznámejšie polysacharidy rastlinného pôvodu patria celulóza (základná štruktúrna látka rastlín), škrob (základná zásobná látka rastlín), inulíny, pektíny, kyselina algínová. Polysacharidy živočíšneho pôvodu reprezentuje napr. glykogén (základná zásobná látka živočíchov, húb a baktérií), chitín (základná štruktúrna látka hmyzu, kôrovcov a húb), kyselina hyalurónová, heparín (zabraňuje zrážaniu krvi).

Úloha č. 1: Dôkaz sacharidov - Tymolova skúška

Teoretický úvod: Sacharidy sa v prostredí silných minerálnych kyselín menia na fural a jeho deriváty, ktoré reagujú s tymolom, pričom pozorujeme karmínové zafarbenie.

Objekt: neznáme vzorky vo forme roztokov.

Pomôcky: skúmavky, stojan, pipety, kvapkadlo, vodný kúpeľ.

Chemikálie: 3 % roztok tymolu v etanole, koncentrovaná HCl, kryštalický NaCl.

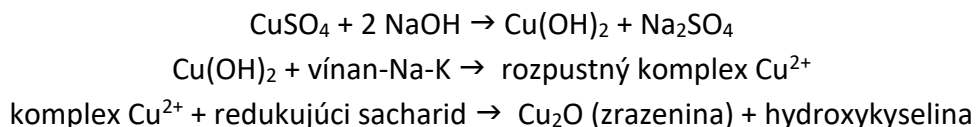
Postup: K 1 ml neznámej vzorky pridáme 5 kvapiek tymolového roztoku, 10 ml koncentrovanej HCl a niekoľko kryštálov NaCl. Zmes opatrne zahrievame vo vodnom kúpeli. Prítomnosť sacharidov dokážeme karmínovým zafarbením.

Doba trvania: 20 min.

Výsled: Na základe výsledkov (pozitívna alebo negatívna Tymolova skúška) identifikujeme možné typy sacharidov v neznámych vodných roztokoch.

Úloha č. 2: Dôkaz redukujúcich sacharidov

Teoretický úvod: Prítomnosť redukujúcich sacharidov je možné stanoviť pomocou Fehlingovej skúšky alebo Tollensovej skúšky. Pri vzniku Fehlingovho činidla dochádza najskôr k reakcii medzi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a NaOH, kedy vzniká svetlo modrá zrazenina hydroxidu meďnatého, ktorá je v nadbytku rozpustná za vzniku komplexu Cu^{2+} s vínanom. V prípade prítomnosti redukujúceho sacharidu (napr. glukóza) dochádza k oxidácii aldehydovej alebo ketoskupiny na danom sacharide a zároveň k redukcii Cu^{2+} na Cu^+ . Tento jav môžeme pozorovať ako zmenu zafarbenia – z modrej na oranžovú alebo červenú až hnedočervenú. Fehlingova reakcia ako komplexotvorné činidlo používa Seignettova soľ (vínan sodnodraselný). Zakladá sa na reakciách:



V prípade neredukujúceho sacharidu (napr. sacharóza) nedochádza k zmene farby. Fehlingova reakcia má istú nevýhodu, že Fehlingovo činidlo je nestále. Činidlo treba preto pripravovať v skúmavke vždy čerstvé.

V prípade dôkazu redukujúcich sacharidov Tollensovou skúškou dochádza najskôr k reakcii dusičnanu strieborného a zriedeného roztoku amoniaku a vzniká šedá zrazenina oxidu strieborného, ktorá sa rozpúšťa v nadbytku zriedeného roztoku amoniaku, vytvára sa bezfarebný komplex (diamín strieborný kation). V prípade prítomnosti redukujúceho sacharidu (napr. glukóza) dochádza k oxidácii aldehydovej skupiny či ketoskupiny na danom sacharide, zároveň sa Ag^+ redukuje na Ag^0 . Pri tejto reakcii dochádza k vytvoreniu tzv. strieborného zrkadla na stenách skúmavky. Neredukujúce sacharidy (napr. sacharóza) nebudú reagovať s Tollensovým činidlom. Môžeme pozorovať bezfarebný roztok v skúmavke.

Poznámka: Zahrievaním roztoku sacharózy s Tollensovým roztokom nad kahanom alebo vo vodnom kúpeli, môže dochádzať k hydrolýze sacharózy. Sacharóza sa hydrolyzuje za vzniku glukózy a fruktózy – po dlhšej dobe dochádza i v tomto prípade k tmavnutiu obsahu skúmavky, ktoré je spôsobené reakciou glukózy a fruktózy s Tollensovým činidlom.

Objekt: neznáme vzorky vo forme roztokov.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan, pipety, vodný kúpeľ.

Chemikálie: Fehling I (69,3 g síranu meďnatého sa rozpustí v 1 l destilovanej vody), Fehling II (346 g vínanu sodno-draselného (Seignettova soľ) sa zmieša s 120 g hydroxidu sodného a doplní do 1 l destilovanou vodou), Tollensov roztok (Do kadičky sa pridá 50 ml 0,1 M AgNO_3 a zmieša sa s 26 % NH_4OH . Vytvorí sa hnedá zrazenina. Pridáva sa postupne NH_4OH , až kým roztok nie je číry. Následne sa pridá 25 ml 0,8 M KOH a opäť sa pridáva NH_4OH , až kým sa roztok nevyčíri. Roztok musí byť pripravovaný vždy tesne pred analýzou, aby bol čerstvý!).

Pracovný postup:

- Fehlingova skúška: Do skúmavky napipetujeme 1 ml neznámej vzorky a pridáme rovnaké množstvo Fehlingovho roztoku (získame ho zmiešaním roztoku I a II). Skúmavku zahrievame vo vodnom kúpeli. V prítomnosti redukujúcich sacharidov vzniká červenohnedá zrazenina oxidu meďnatého.
- Tollensova skúška: Do skúmavky napipetujeme 1 ml neznámej vzorky. Pridáme 3 kvapky Tollensovho roztoku a mierne zahrejeme vo vodnom kúpeli. Roztok, ktorý obsahuje sacharidy, stmavne vylúčením striebra, prípadne sa na stenách skúmavky vytvorí kovové strieborné zrkadlo.

Doba trvania: 30 min.

Výsledky: Na základe výsledkov (pozitívna alebo negatívna reakcia) identifikujeme možné typy sacharidov v neznámych vodných roztokoch.

Úloha č. 3: Rozlíšenie aldóz a ketóz – Selivanova reakcia

Teoretický úvod: Test je založený na skutočnosti, že pri zahrievaní dochádza pri ketózach k rýchlejšej dehydratácii ako pri aldózach. Pri zahrievaní ketózy dochádza k dehydratácii účinkom koncentrovanej HCl. Dehydratáciou ketóz vzniká derivát furfuralu (5-(hydroxymetyl)furan-2-karbaldehyd) v prípade hexózy a furfural v prípade pentózy, ktorý kondenzuje s resorcínom za vzniku tmavo červeného kondenzačného produktu. Aldózy poskytujú slabo ružové zafarbenie, pretože u aldóz dochádza k dehydratácii pomalšie. V prípade aldóz musí dôjsť najskôr k izomerizácii na ketózu (ketoheptózu – D-fruktózu). Sacharóza môže poskytovať tiež pozitívny výsledok Selivanovej reakcie, nakoľko v prostredí zvýšenej teploty dochádza k hydrolýze sacharózy na monoméne jednotky, ktoré podliehajú reakcii s rezorcínom za tvorby daného kondenzačného produktu červenej farby.

Objekt: neznáme vzorky vo forme roztokov.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan, pipety, vodný kúpeľ.

Chemikálie: 25 % (v/v) HCl, resorcín.

Pracovný postup: Do skúmavky napipetujeme 1 ml neznámej vzorky. Pridáme 1 ml 25 % HCl a niekoľko kryštálikov rezorcínu. Zahrejeme krátko a mierne vo vodnom kúpeli. Prítomnosť ketóz pozorujeme červeným sfarbením, aldózy červené zafarbenie nedávajú.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Na základe výsledkov (pozitívna alebo negatívna Salivanova reakcia) identifikujeme možné typy sacharidov v neznámych vodných roztokoch.

Úloha č. 4: Rozlíšenie pentóz od hexóz

Teoretický úvod: Pôsobením HCl z pentóz vzniká fural, ktorý s fluoroglucínom dáva višňovo červené zafarbenie. Hexózy sa menia na deriváty furalu, ktoré v tejto reakcii dávajú žlté zafarbenie.

Objekt: neznáme vzorky vo forme roztokov.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan, pipety, vodný kúpeľ.

Chemikálie: 25 % (v/v) HCl, fluoroglucín.

Pracovný postup: Do skúmavky napipetujeme 1 ml neznámej vzorky. Pridáme 1 ml zriedenej 25 % HCl a pár kryštálikov fluoroglucínu. Zahrejeme vo vodnom kúpeli do varu. Následne ochladíme. V roztoku s pentózou vzniká červeno-višňové zafarbenie. Hexóza tvorí žlté zafarbenie.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Na základe výsledkov identifikujeme možné pentózy a hexózy v neznámych vodných roztokoch.

Úloha č. 5: Bialova reakcia na dôkaz pentóz

Teoretický úvod: Fural, ktorý vzniká z pentóz v silne kyslom prostredí dáva s arómami farebný derivát so širokým absorpčným pásom okolo 670 nm a úzkym okolo 610 nm. Hexózy takéto absorpčné spektrum nedávajú.

Objekt: neznáme vzorky vo forme roztokov.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan, pipety, vodný kúpeľ.

Chemikálie: Bialov roztok (1,5 g orcinolu rozpustíme v 500 ml koncentrovanej HCl, pridáme 20 až 30 kvapiek 10 % (v/v) FeCl₃).

Pracovný postup: Do skúmaviek napipetujeme po 0,5 ml roztokov neznámych vzoriek. Pridáme 0,5 ml Bialovho roztoku a krátko zahrejeme vo vriacom vodnom kúpeli. Vznikne tmavozelené zafarbenie dokazujúce prítomnosť pentózy.

Doba trvania: 20 min.

Výsledky: Na základe výsledkov identifikujeme možné pentózy v neznámych vodných roztokoch. Porovnáme výsledky z Úlohy č. 4 a č. 5, či sme pozorovali zhodu v reakcii jednotlivých neznámych vzoriek.

Úloha č. 6: Redukčné vlastnosti sacharidového roztoku a jeho hydrolýza

Objekt: neznáme vzorky vyselektované z predchádzajúcich úloh ako polysacharidy.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan, pipety, kvapkadlo, vodný kúpeľ, lakmusové papieriky.

Chemikálie: Fehling I a Fehling II, koncentrovaná HCl, NaOH.

Pracovný postup: K 5 ml neznámej vzorky pridáme 10 kvapiek koncentrovanej HCl a vložíme na 5 min do vriaceho vodného kúpeľa. Následne rozdelíme obsah skúmavky do dvoch skúmaviek po 2,5 ml roztoku. Jednu skúmavku neutralizujeme pevným NaOH a urobíme Fehlingovu skúšku ako v Úlohe č. 2 (Fehlingova skúška). V prítomnosti redukujúcich sacharidov vzniká červenohnedá zrazenina oxidu meďnatého. Do druhej skúmavky vložíme niekoľko kryštálikov rezorcínu. Zahrejeme vo vodnom kúpeli pár minút. V prípade pozitívnej reakcie – teda hydrolýzy polysacharidu a dôkaze monosacharidov – pozorujeme červené zafarbenie.

Doba trvania: 25 min.

Výsledky: Na základe výsledkov identifikujeme neznáme vzorky.

Úloha č. 7: Vlastnosti škrobu a hydrolýza škrobu

Teoretický úvod: Škrob je rastlinná zásobná látka. Skladá sa z dvoch polysacharidov – lineárna amyulóza (tvorí asi 20 % škrobu) a rozvetvený amylopektín (asi 80 % škrobu). Stavebnou jednotkou oboch zložiek je glukóza, ktoré sú navzájom v reťazci škrobu pospájané α -1,4 a α -1,6 glykozidovou väzbou. Škrob je biela kryštalická látka. Vyskytuje sa v rastlinách (zemiaky, obilie, rôzne plody a listy rastlín) ako rezervná látka. Patrí medzi biologicky a aj hospodársky najvýznamnejšie sacharidy. Má obrovský význam pre výživu ľudstva. V priemysle sa používa na výrobu lepidiel, na škrobenie prádla a v potravinárstve. Škrob reaguje s jódmi, ktorý sa nachádza v Lugolovom roztoku a vzniká intenzívne modré sfarbenie. Kratšie dextríny reagujú s Lugolovým roztokom za vzniku ružového sfarbenia. Tzv. „rozpuštný škrob“ v škrebe na prádlo, niektorých práškových potravinových produktoch (ako

sú napr. pudinky) alebo v lepidle Herkules dávajú s Lugolovým roztokom práve toto zafarbenie, pretože sa v týchto výrobkoch nevyskytuje škrob, ale jeho kratšie reťazce, tzv. dextríny, ktoré sú lepšie rozpustné vo vode než škrob. Podstata tejto reakcie je v tom, že sa molekuly jódu dostávajú do dutín závitnice, čím sa mení ich schopnosť absorbovať svetlo. Zahriatím škrob mazovatie a tým vytvára viskózný roztok, ktorý ochladením tuhne na gél.

Objekt: roztok škrobu.

Pracovné pomôcky: skúmavky, stojan, pipety, kvapkadlo, vodný kúpeľ, lakmusové papieriky.

Chemikálie: Lugolov roztok, Fehling I a Fehling II, koncentrovaná HCl, 25 % (v/v) HCl, granulovaný NaOH, rezorcín.

Pracovný postup:

- a) K 10 ml roztoku škrobu pridáme 10 kvapiek Lugolovho roztoku. Roztok sa farbí intenzívne na modro, čo je dôkaz väzby jódu v molekule škrobu. Pri zahriatí nad 60 °C sa zafarbenie stráca, po ochladení sa znovu objavuje. Súvisí to so zmenou chemickej štruktúry a reakciou amylozy a amylopektínu, ktoré rôzne reagujú na teplotu.
- b) Urobíme Fehlingovu skúšku. Použijeme 2 ml roztoku škrobu a ďalej postupujeme ako v Úlohe č. 2 (Fehlingova skúška). Škrob nemá redukčné vlastnosti, nedochádza k farebnej reakcii.
- c) K 10 ml škrobového roztoku pridáme 5 kvapiek koncentrovanej HCl a skúmavku vložíme do vodného kúpeľa s vriacou vodou. Každých 5 min odoberieme sklenenou tyčinkou vzorku z hydrolyzovaného škrobového roztoku a na miske sledujeme reakciu s vodným roztokom jódu, ktorý postupne spôsobuje zafarbenie na fialovo, červeno, až sa zafarbenie stráca – v závislosti od stupňa hydrolýzy. Po ukončení hydrolýzy (teda reakcia je bezfarebná) odpipetujeme do dvoch skúmaviek po 2 ml roztoku. V jednej skúmavke urobíme Selivanovu skúšku bez pridania HCl s negatívnym výsledkom. V druhej urobíme po neutralizácii granulovaným NaOH Fehlingovu skúšku, ktorá bude pozitívna.

Doba trvania: 45 min.

Výsledky: Pozorujeme reakcie škrobového roztoku a popíšeme princíp jednotlivých realizovaných reakcií a z neho vyplývajúce vlastnosti škrobu.

Úloha č. 8: Vlastnosti a hydrolýza celulózy

Teoretický úvod: Celulóza (buničina) je stavebnou látkou rastlinných pletív. Je zložená rovnako ako škrob z glukózy, ale má iný typ glykozidovej väzby, konkrétne $\beta(1-4)$ -glykozidovú väzbu. Živočíchym nemajú enzým, ktorý by dokázal rozštiepiť β -1,4 väzby medzi jednotlivými glukózovými jednotkami. Preto je pre väčšinu živočíchov (aj človeka) celulóza nestráviteľná a v potrave tvorí tzv. vlákninu, ktorá prejde cez tráviacu sústavu takmer bezo

zmeny, avšak tráviteľná je baktériami v hrubom čreve. Baktérie majú schopnosť celulózu štiepiť a metabolizovať. Pri hydrolytickom štiepení celulózy vznikajú produkty štiepenia (cellopentóza, cellotetróza, cellotrióza, cellobióza) až po glukózu. Človek využíva celulózu na výrobu papiera (v dreve sa nachádza až 50 % celulózy). Trinitrát celulózy, získaný jej nitráciou je základom pre výrobu strelného prachu. Celulóza je úplne nerozpustná vo vode. Kyslou enzymatickou hydrolyzou sa celulóza štiepi až na monosacharidy, ale tiež je ju možné rozložiť kyslou hydrolyzou s využitím silných kyselín.

Objekt: vata buničitá.

Pracovné pomôcky: kadičky, sklená tyčinka, pipeta, odberná banka, odmerný valec, vodný kúpeľ.

Chemikálie: koncentrovaná kyselina sírová, NaOH, Fehling I a II, rezorcín.

Pracovný postup: Do 50 ml kadičky vlejeme 5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej a za stáleho pretrepávania pridáme 0,5 g celulózy vo forme vaty buničitej. Pri rýchlom pridávaní a nedostatočnom miešaní roztok rýchlo zhnedne a má zápach karamelu. Rozpúšťanie trvá cca 10 min. Roztok následne vlejeme za stáleho miešania do kadičky s 20 ml destilovanej vody. 10 ml z tohto roztoku vlejeme do skúmavky a 10-15 min hydrolyzujeme vo vriacom vodnom kúpeli. Následne v 5 ml roztoku urobíme Selivanovu skúšku (Úloha č. 3), ale bez pridania HCl (na stanovenie ketóz) s negatívnou reakciou. Druhých 5 ml zneutralizujeme v skúmavke pomocou NaOH (pozor na prudkú reakciu!) a urobíme Fehlingovu skúšku (Úloha č. 2) s pozitívnym výsledkom.

Doba trvania: 35 min.

Výsledky: Pozorujeme a popíšeme princíp hydrolyzy polysacharidu celulózy a zároveň popíšeme aj výsledok hydrolyzy a princíp dôkazových reakcií získaných výsledných produktov hydrolyzy celulózy.

Kontrolné otázky

1. Čo sú sacharidy a aké sú ich funkcie v organizme?
2. Aké je rozdelenie monosacharidov a ich základné vlastnosti?
3. Čo viete o polysacharidoch?
4. Na čo slúži voľná poloacetálová hydroxylová skupina monosacharidov?
5. Uvedte príklady monosacharidov, oligosacharidov a polysacharidov.
6. Akými postupmi by ste dokázali prítomnosť sacharidov vo vzorke?
7. Akými metódami by ste dokázali rozlíšiť aldózy od ketóz?
8. Ako je možné hydrolyzovať polysacharidy?
9. Z čoho je zložený škrob a aké väzby sa vykytujú v polymére?
10. Z čoho je zložená celulóza a aké väzby sa vyskytujú v polymére?

Zaujímavosť

Glukóza patrí medzi najrozšírenejšie sacharidy v prírode, avšak len zriedkavo ju konzumujeme v jej čistej forme. Zvyčajne ju v strave prijímame vo forme oligosacharidov alebo polysacharidov. Fruktóza, ktorá sa bežne vyskytuje v mede a ovocí, je najsladším monosacharidom. Ak ju ochutnáme v jej kryštalickej forme, je 2-krát tak sladká ako je sacharóza, ktorá sa najbežnejšie používa ako cukor v domácnostiach. Cukrová trstina a cukrová repa sú známe rastliny aj z toho dôvodu, že majú najvyššiu koncentráciu sacharidov. Tie sú ľahko separovateľné a výsledkom je čistá sacharóza. V ovocí sa nevyskytuje len fruktóza, ale aj sacharóza a glukóza. Zaujímavosťou tiež je, že v ovocnom džúse sa nachádza 12 g sacharidov na 100 ml, pričom napríklad colový nápoj obsahuje 8 g/100 ml. Sacharidy sa tiež používajú ako konzervanty v džemoch, pretože ich vysoká koncentrácia inhibuje rast mikroorganizmov.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Anderson, C., Moreno, F., Meech, J.: A field demonstration of gold phytoextraction technology. In *Minerals Engineering*, 2005, 18, 4, 385-392.

Ankeny, R.A., Leonelli, S.: What's so special about model organisms? In *Studies in History and Philosophy of Science Part A*, 2010, 42(2), 313–323.

Brooks, R.R.: Indicator plants for mineral prospecting – a critique. In *Journal of Geochemical Exploration*, 1980, 12, 67-78.

Campbell, N.A., Reece, J.B.: *Biologie* (český preklad). 1. vydanie, Brno : Computer Press, 2006, ISBN 80-251-1178-4.

Dadová, J.: Olovo v životnom prostredí. In *Acta Universitatis Matthiae Belli, séria Envirometnálne inžinierstvo*, 2015, 17(1): 1-9.

Duška, F., Trnka, J.: *Biochemie v souvislostech: I. díl – základy energetického metabolismu*, 1. vydanie, Praha : Karolinum, 2006, ISBN 80-246-1116-3.

Eisenberg, D., Kauzmann, W.: *The structure and properties of water*. 1. vydanie, Oxford : Oxford University Press, 2005, ISBN: 9780198570264.

Fargašová, A.: Distribúcia kovov v životnom prostredí. Globálne znečistenie kovmi, 2010, 1-25. Dostupné online: https://enviro-edu.sk/pluginfile.php/171/block_html/content/Globalne%20znečistenie%20kovmi_def.pdf?time=1547519690305.

Ferenčík, M., Škárka, B., Novák, M., Turecký, L.: *Biochémiá*. 1. vydanie, Bratislava : Slovak Academic Press, 2000. ISBN 80-88908-57-4.

Finney, J.L.: Water? What's so special about it? In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2004, 359, 1145-1165.

Girling, C.A., Petersen, P.J.: Gold in plants. In *Gold Bulletin*, 1980, 13, 151-157.

Heaven, D.: Tiny supercomputers could be made from the skeleton inside your cells. 2018. Dostupné online: <https://www.newscientist.com/article/2183165-tiny-supercomputers-could-be-made-from-the-skeleton-inside-your-cells/>.

Heber U., Heldt H.W.: The chloroplast envelope: structure, function, and role in leaf metabolism. In *Annual Review in Plant Physiology*, 1981, 32, 139-168.

Heidcamp, W.H.: *Cell Biology Laboratory Manual*. 3. vydanie, Saint Peter, Minnesota, USA : Gustavus Adolphus College, 2008, ISBN: 0805302468.

Helms, D.R., Helms, C.W., Kosinski, R.J., Cummings, J.R.: *Biology in the laboratory*. 3. vydanie, New York : W.H. Freeman Custom Publishing, 1998, ISBN-13: 978-0716731467.

Horáková, K., Hudecová, D., Jantová, S., Nádaská, M.: Biológia. Návody na cvičenia. 1. vydanie, Bratislava : Vydavateľstvo STU v Bratislave, 1996, ISBN 80-227-0888-7.

Hudák, J., Dvořák, M., Herichová, A., Lux, A., Nátr, L., Peterková, I.: Biológia rastlín. 1. vydanie, Bratislava : SPN Bratislava, 1991, ISBN 80-08-01598-5.

Cholvadová, B., Erdelský, K., Masarivičová, E.: Praktikum z fyziológie rastlín. 1. vydanie, Bratislava : Vydavateľstvo UK, 1999, ISBN 80-223-1326-2.

Lehotay, J.: Separáčné metódy v analytickej chémii. 1. vydanie, Bratislava : STU, 2009, ISBN 978-80-227-3026-5.

Mišúrová, E., Solár, P.: Molekulová biológia, 1. vydanie, Košice : Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, 2007, ISBN 978-80-7097-671-5.

Murchie, E.H., Pinto, M., Horton, P.: Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. In *New Phytologist*, 2008, 181, 532-552.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.: Harperova biochemie. 23. vydanie, Appleton & Lange, a Publishing Division of Prentice Hall, 1998, ISBN 80-85787-38-5.

Müller, L.M., Floková, K., Schnabel, E., Sun, X., Fei, Z., Frugoli, J., Bouwmeester, H.J., Harrison, M.J.: A CLE-SUNN module regulates strigolactone content and fungal colonization in arbuscular mycorrhiza. In *Nature Plants*, 2019, 5, 933-939.

Pendarvis, M.P., Crawley, J.L.: Exploring Biology in the Laboratory. 3. vydanie, Englewood, CO : Morton Publishing Company, 2018, ISBN 1617317551.

Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol.: Fyziologie rostlin. 1. vydanie, Praha : Academia Praha, 1998, ISBN 80-200-0586-2.

Sirotiak, M., Blinová, L., Bartošová, A.: Basic operation in chemical laboratory in terms of accuracy and safety – volumetry (Proceeding of the International Scientific Conference). 1. vydanie, Žilina : Strix, 2016, ISBN 978-80-89753-11-6.

Ondrejovič, M., Chmelová, D.: Laboratórne cvičenia z biochémie. 1. vydanie. Trnava : Univerzita sv. Cyrila a Metóda v Trnave, 2015, ISBN 978-80-8105-748-9.

Ondrejovič, M., Chmelová, D., Michalcová, E.: Izolačné a purifikačné metódy. Teoretická časť k návodom na laboratórne cvičenia. 1. vydanie, Trnava : Univerzita sv. Cyrila a Metóda v Trnave, 2013, ISBN 978-80-8105-473-0.

Rosypal, S. a kol.: Nový přehled biologie. 1. vydanie, Praha : Scientia Praha, 2003, ISBN 978-80-86960-23-4.

Rosypal, S. a kol.: Přehled biologie, 1. vydanie, Praha : SPN, 1987, SPN 6-43-11/1.

Sedlák, E., Varhač, R., Danko, P., Paulíková, H., Podhorský, D.: Praktické cvičenia z biochémie. 1. vydanie, Košice : UPJŠ, 2020, ISBN 978-80-8152-902-3.

Laboratórne cvičenia z biológie II.

Vodopich, D.S, Moore, R.: Biology – Laboratory Manual. 9. vydanie, McGraw-Hill Companies, Inc. : North Texas, USA, 2011, ISBN 0-07-746252-1.

PRÍLOHA – Vzor protokolu Laboratórných cvičení z biológie II

Katedra biotechnológií	Laboratórne cvičenia z biológie II.	Vypracoval(a): <i>(meno a priezvisko)</i>
Fakulta prírodných vied	Laboratórny protokol č.: <i>(vyplniť číslo protokolu)</i>	Dátum: <i>(deň.mesiac.rok odovzdania protokolu)</i>
Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave	Názov laboratórneho cvičenia: <i>(napísať názov cvičenia)</i>	
Akademický rok: <i>(vyplniť roky, napr. 2021/2022)</i>		

Dôležité upozornenie: Text celého protokolu píšeme v Times New Roman. V prípade tabuliek a legendy pod obrázkom je možné použiť veľkosť písma 10 alebo 11.

Cieľ: Napísať presné zadanie laboratórnej úlohy podľa podkladov vyučujúceho.

Úloha: Napísať presný názov úlohy podľa študijného materiálu.

Teoretický úvod: Stručná teória ku každej úlohe podľa študijného materiálu (rozsiahlejšie ako jednou vetou), aby bolo jasné podľa teoretického úvodu, čo je cieľom danej úlohy. Ak majú úlohy spoločnú teóriu, spoločný princíp, stačí napísať jeden teoretický princíp. Nepatrí sem postup práce, zadanie ani pozorovanie. Teoretický princíp Vám má pomôcť tiež pri písaní pozorovania, takže sa netreba zbytočne rozpisovať, ale písať k veci.

Objekt: Popísať presne objekt, ktorý bol v úlohe použitý. Definujeme druh organizmu a použitý orgán. V prípade rastlinného druhu uvedieme celý názov, nielen rodový, ale aj druhový. Môžeme doplniť aj latinský názov.

Pomôcky: Čo všetko ste pri danej úlohe potrebovali, použili – presne popísať a špecifikovať laboratórne sklo, plasty, použitie vodného kúpeľa a podobne.

Chemikálie: Popísať presne názov a koncentráciu použitých chemikálií. Zapísať tie koncentrácie látok, ktoré sa reálne použili v prípade zmeny v postupe skripta.

Pracovný postup: Stručne, v bodoch alebo odrážkach (1., 2., ...) zachytiť základné kroky. Teda ako bol realizovaný experiment od prípravy vzorky až po získanie výsledku. Pozorovanie a teória sem nepatria.

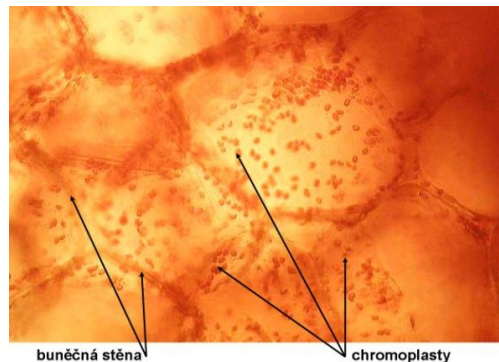
Výpočty: Ak je potrebné, uviesť vzorový príklad výpočtu.

Výsledky: Výsledky opisujú len to, čo sledujete, vidíte, pozorujete. Žiadna teória ani postup do tejto časti protokolu nepatria. Do pozorovania sa zahŕňajú obrázky (odkazy na obrázky, čo je na nich, ako

pozorovaný objekt vyzerá, príp. ako mal vyzeráť a prečo nie je/ je výsledok porovnateľný s literatúrou a podobne).

Obrázky: Každý obrázok musí mať popis (názov obrázku, napr. Obrázok 1 a popis obrázku sa píše vždy dole pod obrázok) a zároveň musí byť spomenutý v texte pozorovania a diskusie (teda je nutné sa odkázať na každý obrázok použitý v texte protokolu). V prípade odkázania sa na obrázok v texte protokolu, uvádzame tiež príklady: Na Obrázku 1 môžeme vidieť..., Obrázok 1 dokumentuje..., Farebné zmeny sme pozorovali (Obrázok 1)... a podobne. V prípade, že je potrebné alebo možné na niečo poukázať v obrázku, tak šípkami doplniť ako je to znázornené na vzorovom obrázku nižšie. Vždy, keď sa jedná o obrázok získaný pomocou mikroskopu, je dôležité napísať, pri akom celkovom zväčšení bol obrázok získaný. V prípade, že použijete obrázok z internetu, je potrebné uviesť aj zdroj, buď priamo k popisu alebo na konci protokolu v zozname použitej literatúry.

Ak protokol obsahuje tabuľku, číslovanie tabuľky a jej nadpis je nad tabuľkou (Např. Tabuľka 1: koncentrácie roztokov použitých na stanovenie osmotického hodnoty bunky).



Obrázok 1: Chloroplasty v bunkách plodu papriky ročnej (zväčšenie 100x).

Diskusia: Diskusia obsahuje vlastné myšlienky, pozorovania, čo by sa mohlo zmeniť, inak vypracovať, prečo nám experiment nevyšiel alebo vyšiel. Je vhodné jednoducho diskutovať o danej téme, ktorá bola realizovaná počas laboratórnej práce. Diskusia môže obsahovať aj Vaše vlastné myšlienky, nápady k téme a stanoviská. Tiež môže obsahovať porovnanie Vašich získaných výsledkov s literárnymi údajmi. Táto časť nie je povinná.

Záver: Záver by mal byť stručný, jasný, nie je vhodné, aby ste sa rozpisovali. Nepísať sem pozorovanie ani postup. Len stručne zhodnotiť laboratórnu prácu (napr. Oboznámila som sa s mikroskopom a s prácou s ním. Alebo: Osvojila som si základy mikroskopovania, ktoré využijem v nasledujúcich cvičeniach.). Záver by mal byť odpoveďou na cieľ práce.

Poznámka: Keď si niekto zoberie do rúk Váš protokol, musí vedieť podľa teórie porozumieť, čomu sa venujete v práci (aký je princíp, aký má laboratórna práca význam), podľa Vášho postupu musí vedieť, ako má postupovať, keby chcel robiť niečo podobné, podľa pozorovania vidieť, čo ste sledovali, pozorovali (napr. farebné zmeny), na čo si má dať pozor, ako experiment uskutočniť, prípadne sa podľa vašich komentárov vyhnúť chybám. Z protokolu je pre čitateľa potrebné pochopiť, aký je význam obrázkov, ktoré v texte máte a čo obrázky presne znázorňujú. Po formálnej stránke je potrebné, aby celý text bol písaný precízne, bez formálnych a gramatických chýb a preklepov. V celom

Laboratórne cvičenia z biológie II.

texte je potrebné použiť rovnakú formu, t.j. použiť prvú osobu množného čísla v minulom čase (pripravili sme, použili sme, navázili sme...).

LABORATÓRNE CVIČENIA Z BIOLÓGIE

II

Autorský kolektív:

doc. RNDr. Michaela Havrlentová, PhD. (UCM, AH)

Mgr. Veronika Gregusová (UCM, AH)

RNDr. Daniela Chmelová, PhD. (UCM, AH)

Recenzenti:

doc. RNDr. Beáta Piršelová, PhD.

doc. Ing. Tibor Maliar, PhD.

Vydavateľ: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, 2021

Vydanie: prvé

Počet strán: 117

ISBN: 978-80-572-0186-1