

# Organisch-chemisches Praktikum für Studierende des Lehramts

WS 08/09

Praktikumsleitung: Dr. Reiß

Assistent: Beate Abé

Name: Sarah Henkel

Datum: 27.11.2008

## Gruppe 6: Alkohole

### Versuch: Vergleichende Gäraktivitäten immobilisierter und nichtimmobilisierter Hefezellen

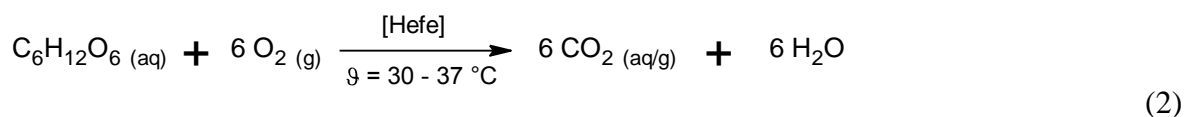
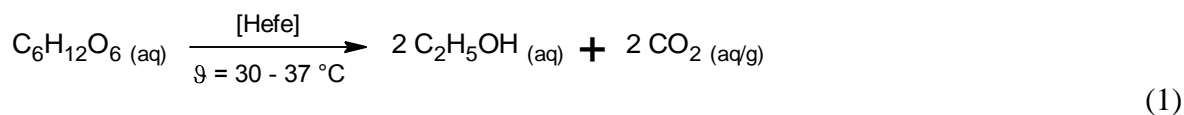
#### Zeitbedarf

Vorbereitung: 50 Minuten

Durchführung: 1 Stunde, 10 Minuten

Nachbereitung: 15 Minuten

#### Reaktionsgleichungen



#### Chemikalien

Tab. 1: Verwendete Chemikalien.

Eingesetzte Stoffe	Menge	R-Sätze	S-Sätze	Gefahrensymbol	Schul-einsatz
Natriumalginat	4 g	-	-	-	S I
Entionisiertes Wasser	Ca. 100 mL	-	-	-	S I
Calciumchlorid-Lösung mit Kristallwasser $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) =$ 0,2 mol/L	200 mL	36	2-22-24	Xi	S I

Frische Backhefe	10 g	-	-	-	S I
Glucose-Lösung $c(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}) =$ 0,45 mol/L	300 mL	-	-	-	S I
Calciumchlorid-Lösung mit Kristallwasser $c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) =$ 0,04 mol/L	In den 300 mL Gluco- se-Lösung enthalten	36	2-22-24	Xi	S I
Gesättigte Calciumhydro- xid-Lösung ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )	Ca. 10 mL	41	2-22-24- 26-39	Xi	S I

### Geräte

- 2 Bechergläser (100 mL)
- 2 Bechergläser (250 mL, niedrige Form)
- Becherglas (600 mL, hohe Form)
- Messzylinder (100 mL)
- Magnetrührer mit Rührfisch (2 kleine, 2 größere)
- Kontaktthermometer
- Glasstab
- Spatel
- Waage
- Einwegspritze (5 mL)
- 2 Einwegspritzen (20 mL)
- Haushaltssieb
- Kristallisierschale
- Hebebühne
- 2 Stickstoffkolben (250 mL) mit Hahn und Schliffstopfen
- Kolbenprober mit Dreiwegehahn und passendem Halter
- 2 Saugrohre mit durchbohrten Gummistopfen
- Gewinkelte Glasrohre (Schenkellängen: 7 cm), (Schenkellängen: 3,5 cm, 20 cm)
- 2 Pulvertrichter
- Glastrichter

- Faltenfilter
- Weithalsserlenmeyerkolben
- PVC-Schlauch
- Stoppuhr
- Toilettenpapier

## Aufbau



Abb. 1: Herstellung der Calciumalginat-Hefe-Kugeln.



Abb. 2: Versuchsaufbau bei Verwendung der immobilisierten Hefe-Zellen.



Abb. 3: Niederschlag von CaCO<sub>3</sub> im Kalkwasser.



Abb. 4: Versuchsaufbau bei Verwendung der Hefe-Suspension.



Abb. 5: Niederschlag von  $\text{CaCO}_3$  im Kalkwasser.

## Durchführung

### **1 Herstellung eines Natriumalginat-Sols**

Um 50 mL Natriumalginat-Sol herzustellen werden zunächst 40 mL entionisiertes Wasser unter Rühren auf 70 °C erhitzt. Dann wird die Heizung ausgeschaltet und die Rührgeschwindigkeit wird so stark erhöht, dass sich um den Rührfisch ein Vortex bildet. Auf diese Vortexwand werden 4 g Natriumalginat mithilfe eines Haushaltssiebes gebracht. Es wird solange gerührt, bis sich alles gelöst hat. Nachdem das Sol auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird der Rührfisch entfernt und mit entionisiertem Wasser auf 50 mL aufgefüllt. Es wird noch einmal mit einem Glasstab durchmischt.

### **2 Immobilisierung von Hefe in Calciumalginat**

In einem 100 mL-Becherglas werden 5 g Backhefe mit 5 mL entionisiertem Wasser suspendiert. Dann werden 20 mL des zuvor hergestellten Natriumalginat-Sols in die Hefe-Suspension eingerührt. Zum Abmessen des Natriumalginat-Sols eignet sich eine Einwegspritze. In einem 600 mL-Becherglas werden 200 mL Calciumchlorid-Lösung vorgelegt. Die Lösung wird langsam gerührt. Die Mischung aus Natriumalginat-Sol und Hefe-Suspension wird in eine vom Stempel befreite 20 mL-Einwegspritze gegeben, die mit einer Stativklemme so befestigt ist, dass sie sich etwa 3-4 cm über der Flüssigkeitsoberfläche der Calciumchlorid-Lösung befindet. In regelmäßigen Abständen tropft die Mischung aus Natriumalginat-Sol und

Hefe-Suspension in die Calciumchlorid-Lösung und bildet dort gleichmäßige Calciumalginat-Hefe-Kugeln. Nachdem der letzte Tropfen in die Lösung gegangen ist, lässt man noch etwa 5 Minuten rühren und trennt die Kugeln dann mithilfe eines Haushaltssiebes von der Lösung. Sie werden noch einmal mit etwas Wasser abgespült und dann mit Toilettenpapier trocken getupft.

### **3 *Quantitative Bestimmung der Gäraktivitäten von Hefe-Immobilisaten von freien Hefe-Zellen***

Zunächst wird die Apparatur wie in Abbildung 2 und 4 aufgebaut. Das Wasserbad wird auf eine Temperatur von 37 °C vorgeheizt. Anschließend werden 150 mL der Glucoselösung mit Calciumchloridanteil in den Stickstoffkolben gefüllt und auf Wasserbadtemperatur gebracht. Die Temperatur wird kontinuierlich mit einem Kontaktthermometer überprüft. Sobald die Temperatur erreicht ist, wird das Hefe-Immobilisat mithilfe eines Pulvertrichters in den Stickstoffkolben gebracht. Der Kolben muss anschließend schnell und gut verschlossen werden. Dann wird der Hahn des Kolbenprobers auf die Nullmarke gestellt und die Stoppuhr wird gestartet. Die Mischung wird 30 Minuten mit mäßiger Rührgeschwindigkeit gerührt. Alle 30 Sekunden wird das Volumen des entstandenen Gases am Kolbenprober abgelesen. Anschließend wird bewiesen, dass es sich bei dem entstandenen Gas um Kohlenstoffdioxid handelt, indem der Dreiweghahn so umgestellt wird, dass das im Kolbenprober enthaltene Gas in das Saugrohr mit Calciumhydroxid-Lösung gebracht werden kann.

Für die Gärung mit nichtimmobilisierter Hefe werden 5 g Backhefe in 5 mL entionisiertem Wasser suspendiert. Die Hefe wird dann 20 Minuten zum Quellen stehen gelassen (dies entspricht in etwa der Eintropf- und Aushärtezeit des Calciumalginat-Hefe-Immobilisats).

Anschließend wird genauso verfahren, wie zuvor mit dem Immobilisat.

Am Ende des Versuches wird die unterschiedliche Abtrennbarkeit der immobilisierten und der nichtimmobilisierten Hefe-Zellen vom Reaktionsmedium überprüft. Das Immobilisat lässt sich mit einem Haushaltssieb von dem flüssigen Medium trennen. Für die nichtimmobilisierten Hefezellen verwendet man einen Glastrichter mit Faltenfilter.

## Beobachtung

Bei der Herstellung des Natriumalginat-Sols entstand durch das Zugeben des pulverförmigen Natriumalginats in Wasser eine gelartige Masse, die sehr viskos war. Beim Mischen mit der braunen Hefe-Suspension entstand ein dickflüssiger brauner Brei, der dann in die klare Calciumchlorid-Lösung getropft werden konnte. Durch das gleichmäßige Eintropfen bildeten sich gleichgroße Kugeln, die sich nicht mit der Calciumchlorid-Lösung mischten. Die Kugeln blieben als Feststoff in der Lösung.

Bei der Gärung war sowohl bei dem Immobilisat als auch bei der Hefe-Suspension eine Gasentwicklung im Stickstoffkolben sichtbar. Das Gas ging in den Kolbenprober über, indem dann das Volumen des gebildeten Gases abgelesen werden konnte.

Der Kohlenstoffdioxid-Nachweis war in beiden Fällen positiv. Die klare Calciumhydroxidlösung wurde beim Einleiten des Gases sehr trüb, da Calciumcarbonat als Feststoff ausgefallen ist.

## Entsorgung

Die verwendeten Lösungen können alle in den Ausguss gegeben werden. Das Hefe-Immobilisat sowie übrig gebliebene Hefe wird in den Hausmüll gegeben.

## Fachliche Auswertung der Versuchsergebnisse

Alginat ein Algenpolysaccharid und damit eine Strukturkomponente der Braunalgen und kann aus manchen Arten der großwüchsigen Phaeophyta der Ordnungen Laminariales und Fucales gewonnen werden. Zu diesen Arten zählen *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea* und *Ascophyllum nodosum*. Die Ernte dieser Phaeophyta verläuft maschinell, indem Braunalgen mit einer Länge bis zu 50 Metern mithilfe von Spezialschiffen abgeerntet werden. Sie arbeiten als sogenannte „Unterwasser-Mähmaschinen“. Frische Braunalgen enthalten bis zu 90 % Wasser, sodass die Ausbeute des Alginats im trockenen Zustand der Braunalge bei etwa 15 bis 40 Massenprozent liegt. Zwei besondere Eigenschaften des Alginats werden bei der Gewinnung ausgenutzt, um die Ausbeute so hoch wie möglich zu halten. Zum einen ist Natriumalginat gut wasserlöslich und zum anderen herrscht eine charakteristische Gelbildungsfähigkeit der Alginat-Polyanionen mit Calcium-Ionen und mit Säure. Die Gewinnung der Alginat-Polyanionen erfolgt deswegen durch einen langen Prozess, der in Abbildung 6 dargestellt ist.

### **Geerntete Braunalgen**

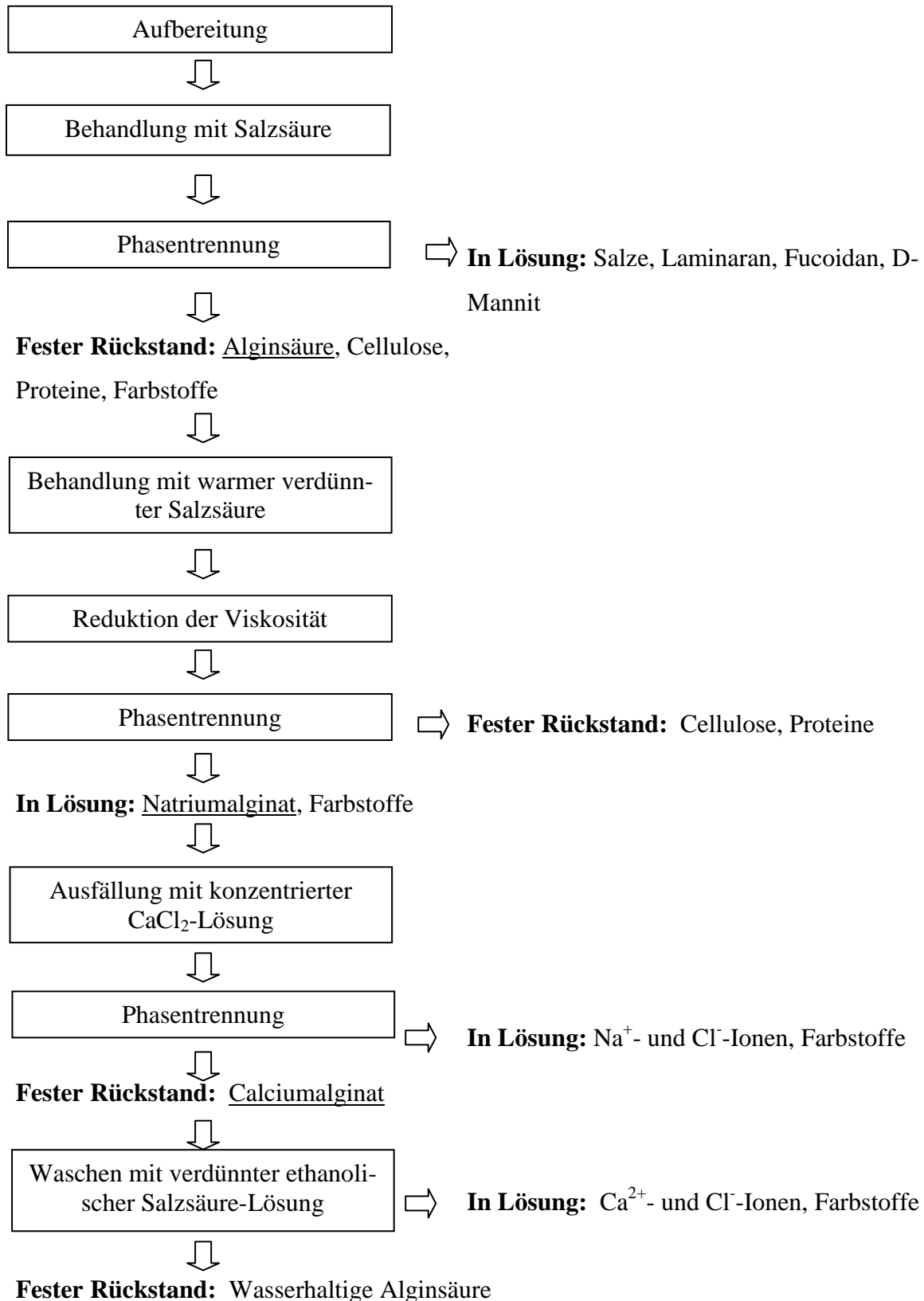


Abb. 6: Prinzip der großtechnischen Gewinnung von Alginsäure aus Braunalgen. <sup>[7]</sup>

In der Biotechnologie verwendet man Alginat insbesondere zur Immobilisierung von Biokatalysatoren. Biokatalysatoren sind enzymatisch aktive Materialien, die chemische Reaktionen katalysieren, die eigentlich in einem Organismus stattfinden. Manche dieser Reaktionen sind auch in der Technik wunderbar einzusetzen. Als Biokatalysatoren können nicht nur Enzyme, sondern auch Zellorganellen, ganze Zellen von Mikroorganismen und höhere Pflanzen eingesetzt werden. Der Nachteil dieser Biokatalysatoren liegt vor allem darin, dass sie sich nur schwer von der Reaktionslösung abtrennen lassen und somit nicht kontinuierlich genutzt werden können. Aus diesem Grund werden sie immobilisiert, d.h. an eine feste Matrix gebunden. Üblicherweise benutzt man für diese Zwecke Calciumalginat zur Immobilisierung. Bei diesem Verfahren wird zunächst eine Suspension der zu immobilisierenden Zellen mit Natriumalginat-Sol hergestellt, das dann in eine Calciumchlorid-Lösung getropft wird. Beim Eintropfen in die Lösung bildet sich an der Oberfläche der Natriumalginat-Zell-Suspension eine dünne Hülle aus Calciumalginat-Gel. Die Struktur des Alginats ist in Abbildung 7 veranschaulicht. Durch Verknüpfung dieser „Matrix“ mit Calcium-Ionen und Biokatalysator-Zellen kommt es zur Bildung eines Gels, das sich nicht mit der Reaktionslösung vermischt.

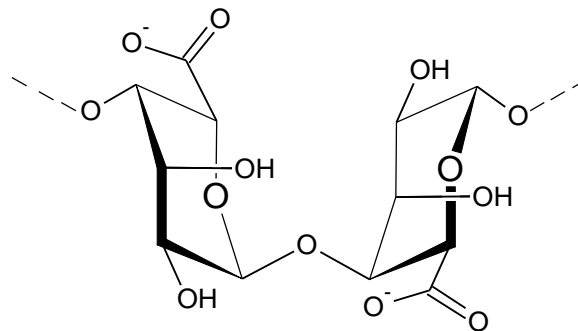
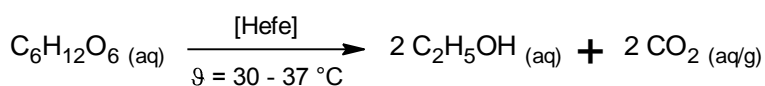


Abb. 7: Strukturformel von Alginat.

In diesem Versuch wird Backhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) mit Calciumalginat immobilisiert. Der Verwendungszweck liegt hierbei in der Produktion von Ethanol aus Glucose und anderen verwertbaren Substraten sowie der Herstellung von Schaumwein. Für die klassische Gärung von Bier und Wein wird ebenfalls diese Art Hefe verwendet. Der Unterschied liegt in der Immobilisierung.

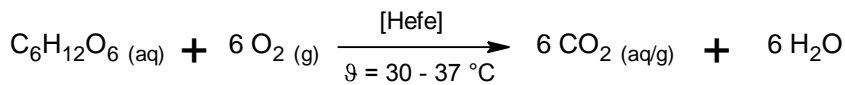
*Saccharomyces cerevisiae* sind darauf spezialisiert, unter anaeroben Bedingungen Glucose zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid umzusetzen. Bei diesem Vorgang läuft eine Reaktion ab, die mit der in Gleichung (1) wiedergegebenen Reaktionsgleichung zusammenzufassen ist:



Wdh. (1)



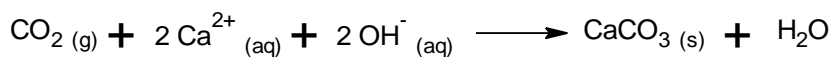
Ist jedoch Sauerstoff gegenwärtig, so erfolgt keine Ethanolproduktion sondern die einfache Zersetzung zu Kohlenstoffdioxid und Wasser.



Wdh. (2)

Um diese zweite Reaktion zu vermeiden wird, soweit möglich in einer Stickstoffatmosphäre gearbeitet.

Das entstehende Gas Kohlenstoffdioxid wird im Versuch mit Calciumhydroxid-Lösung nachgewiesen. Bei dieser Reaktion entsteht das schwerlösliche Calciumcarbonat, welches in der Reaktion ausfällt und zu einer milchig-weißen Trübung der Lösung führt.



(3)

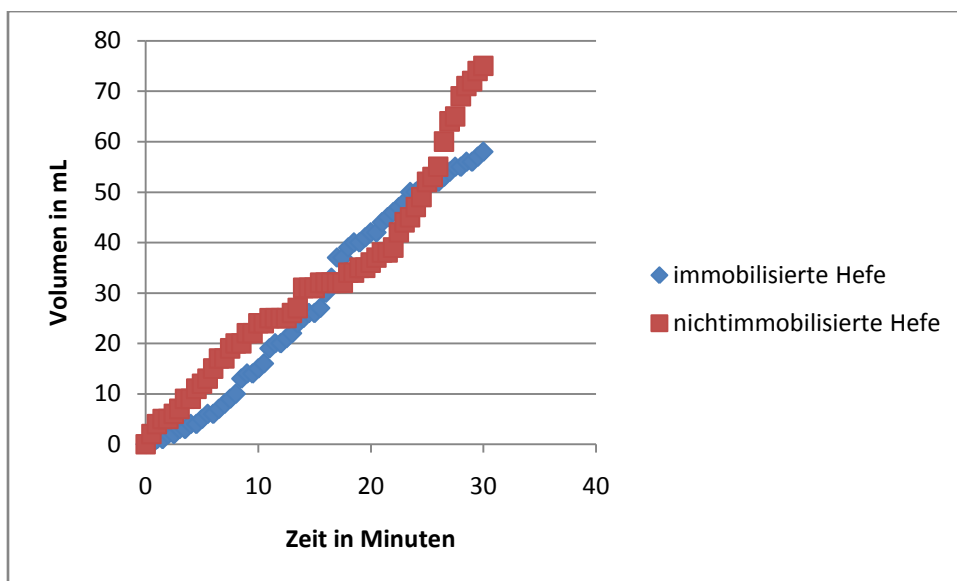


Abb. 8: Vergleich der Gärleistung immobilisierter und nichtimmobilisierter Hefe

Im Diagramm ist zu sehen, dass die nichtimmobilisierte Hefe eine deutlich bessere Leistung bringt als die immobilisierte. Der Grund dafür kann darin liegen, dass in der Versuchsdurchführung durchgängig gerührt wurde. Eventuell würde die Leistung der immobilisierten Hefe gegenüber der nichtimmobilisierten Hefe größer sein, wenn keine Durchmischung mehr stattfindet. Dieses Versuchsergebnis wurde in der Lehrerfortbildung zum Thema Alginate Teil 2 festgehalten. Dort wird die nichtimmobilisierte Hefe aufgrund der fehlenden Durchmischung in ihrer Arbeitsfähigkeit deutlich eingeschränkt, sodass die immobilisierte Hefe diese in der

Leistung überholt, da sie anscheinend nicht von der Rührleistung abhängig ist. Der Grund für die Inaktivität der nichtimmobilisierten Hefe wurde darin gefunden, dass die Hefe auf den Boden des Stickstoffkolbens sinke und dort dann verklumpe. Die immobilisierte Hefe sei dagegen vor dieser Zusammenballung geschützt, sodass sie nicht in ihrer Gäraktivität gehemmt würde.

## Methodisch-Didaktische Analyse

### **1 Einordnung**

Das Themengebiet der Alkohole wird laut Lehrplan im zweiten Halbjahr der Jahrgangsstufe 10 durchgeführt. Der Versuch steht mit der Synthese von Alkohol relativ weit am Anfang der Thematik. Da das Thema Kohlenhydrate erst im zweiten Halbjahr der Jahrgangsstufe 11 verbindlich unterrichtet wird, kennen die Schüler Glucose nur aus dem Biologieunterricht. Dort wird nach hessischem Lehrplan in der Jahrgangsstufe 7 und später noch einmal ausführlicher in der Jahrgangsstufe 11 über Fotosynthese und Zellatmung gesprochen. Der Versuch der alkoholischen Gärung allgemein kann als Verdeutlichung der Herstellung von Wein dienen. Die Schüler sehen, was die Ausgangsstoffe sind und können den Alkohol am Ende des Versuchs am Geruch erkennen.

### **2 Aufwand**

Der Aufwand dieses Versuchs liegt relativ hoch. Sowohl der apparative als auch der zeitliche Aufwand sind mit der Durchführung in der Schule fast gar nicht vereinbar. Die Durchführung mit Stickstoffkolben müsste in der Schule wahrscheinlich auf die normale Verwendung von einfachen Rundkolben durchgeführt werden. Auch ist es kaum möglich, in der Schule unter Stickstoff zu arbeiten, da Stickstoff leichter ist als Sauerstoff und somit schnell verflüchtigt. Natriumalginat ist zwar relativ kostengünstig zu erhalten (50 g kosten bei Fluka 12,10 € (Bestellnummer: 71238)), aber die Calciumalginat-Hefe-Kugeln müssten vorher vom Lehrer hergestellt werden, da der zeitliche Aufwand für eine Schulstunde sonst zu hoch wäre.

### **3 Durchführung**

Bei der Durchführung in der Schule sollte der Lehrer alle Chemikalien, die benötigt werden, fertig vorbereitet haben. Die Herstellung der Calciumalginat-Hefe-Kugeln und der Hefe-Suspension, die 20 Minuten stehen soll, würde den Rahmen einer Schulstunde sprengen. Möglich wäre eine Einteilung in Gruppen, bei der jede Gruppe sich immer nur mit einer Art der Gärung beschäftigt (entweder immobilisierte Hefe oder nichtimmobilisierte Hefe). Die

Versuchsergebnisse können anschließend zusammengetragen werden. Als besondere Leistung können zwei freiwillige Schüler einen Graphen erstellen, aus dem ein Vergleich der beiden Gäraktivitäten ersichtlich ist. Verbunden damit können auch Schülerreferate über das Thema Alginat und ihre Verwendung in der Biotechnologie gehalten werden. Dies ist allerdings nur möglich, wenn genügend Zeit vorhanden ist, um sich einen solchen Exkurs zu erlauben. Sinnvoll wäre eine Durchführung nur in einer Doppelstunde, um sowohl vorher als auch nachher noch kurz Zeit für eine Besprechung zu haben.

## Literatur

- [1] PdN Chemie in der Schule 6/52 Jg. **2003**. Seite 12-13.
- [2] Soester Liste. Version 2.7.
- [3] Hessischer Lehrplan: Chemie. **2008**.
- [4] Hessischer Lehrplan: Biologie. **2008**.
- [5] Vollhardt, K. P. C. und Neil E Schore: Organische Chemie. Übersetzungs-Hrsg: Holger Butenschön. Vierte Auflage. WILEY-VCH. Weinheim **2005**.
- [6] Mortimer, Charles, E. und Ulrich Müller: Das Basiswissen der Chemie. 8., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage. Thieme Verlag. Stuttgart **2003**.
- [7] Marburger, Anke, Elisabeth Rickelt und Michael Schween: Alginat – Gewinnung aus Braunalgen und Verwendung in der Lebensmittelindustrie, Biotechnologie und Medizin. Lehrerfortbildungskurs, Teil 2. 14.März **2001**.

## Anhang

Tab. 2: Messwerte der Volumenzunahme durch das Kohlenstoffdioxid bei immobilisierter Hefe.

<b>Zeit in Minuten</b>	<b>Volumen in mL</b>
0	0
0,5	0
1	1
1,5	1
2	2
2,5	2
3	3
3,5	3
4	4
4,5	4
5	5
5,5	6
6	6
6,5	7
7	8
7,5	9
8	10
8,5	13
9	14
9,5	14
10	15
10,5	16
11	19
11,5	20
12	20
12,5	21
13	22
13,5	24
14	25
14,5	26
15	26
15,5	27
16	30
16,5	33
17	37
17,5	37
18	39
18,5	40
19	40
19,5	41
20	42

20,5	42
21	44
21,5	45
22	46
22,5	47
23	48
23,5	50
24	50
24,5	51
25	51
25,5	52
26	52
26,5	53
27	54
27,5	55
28	55
28,5	56
29	56
29,5	57
30	58

Tab. 3: Messwerte der Volumenzunahme durch das Kohlenstoffdioxid bei nichtimmobilisierter Hefe.

<b>Zeit in Minuten</b>	<b>Volumen in mL</b>
0	0
0,5	2
1	4
1,5	5
2	5
2,5	6
3	7
3,5	9
4	9
4,5	11
5	12
5,5	13
6	15
6,5	17
7	17
7,5	19
8	20
8,5	20
9	22
9,5	22
10	24
10,5	24

11	25
11,5	25
12	25
12,5	25
13	26
13,5	27
14	31
14,5	31
15	31
15,5	32
16	32
16,5	32
17	32
17,5	32
18	34
18,5	34
19	35
19,5	35
20	36
20,5	37
21	38
21,5	38
22	39
22,5	42
23	44
23,5	45
24	47
24,5	49
25	52
25,5	53
26	55
26,5	60
27	64
27,5	65
28	69
28,5	71
29	72
29,5	74
30	75