

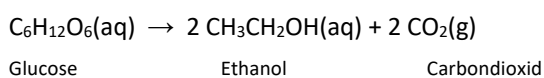


Eksperiment

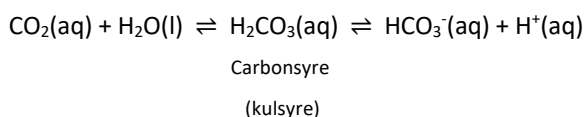
Forsøg med immobiliserede gærceller

Immobilisering af bakterier, mikroalger eller gær i små kugler med calciumalginat er blevet en vigtig industriel procedure. Fx anvendes immobiliserede alger til produktion af biobrændstof, og immobiliseret gær anvendes til ølbrygning og produktion af bioethanol.

Gærs produktion af bioethanol sker ved fermentering af glucose under anaerobe forhold:



Ved processen dannes også carbondioxid (CO_2). Når CO_2 opløses i vand, omdannes det bl.a. til carbonsyre der gør vandet surt ved at afgive en hydron (H^+):



Ved at anbringe immobiliserede gærceller i en opløsning tilsat en pH-indikator kan syredannelsen påvises som en farveændring.

Indikatoren der anvendes, kan med fordel være en universalindikator, se figur 1.

Vejledningen lægger op til at man selv kan designe deres forsøget med gærceller, og den kan derfor være velegnet som projektarbejde.



Figur 1. Anvendelse af en universalindikator gør det nemt at se ændringer af pH pga. gæring.
Foto: Rabbitmindphoto/Shutterstock.com



Materialer

- Natriumalginat-opløsning (1,5 %), $C_5H_7O_4COONa(aq)$
- Calciumchlorid (2 %), $CaCl_2(aq)$
- Glucose (1 %), evt. opløsninger af andre carbohydrater
- Universalindikator, fx Unisol 410
- Phosphatbuffer pH 7,4 med salt (uden EDTA)
- Saltopløsning
- Saltsyre 0,1 M, $HCl(aq)$
- Tørgær
- pH-meter
- Magnetomrører + magnet
- Varmebad 37 °C
- Tesi
- Glasspatel
- Bægerglas (diverse til fremstilling af opløsninger)
- BlueCapflaske til opbevaring
- 1 L målekolbe
- Petriskåle
- Pipetter (2-5 mL)
- Engangssprøjter (10 mL)

Fremstilling af opløsninger

Kan fremstilles i forvejen af læreren eller kan fremstilles af elever som en del af projektet.

Natriumalginat-opløsning (1,5 %):

1. Afmål 100 mL demineraliseret vand i et bægerglas.
2. Afvej 1,5 g natriumalginatpulver og overfør det til vandet.
3. Anbring blandingen på en magnetomrører og lad det omrøre natten over. Der vil dannes en tyk viskøs opløsning.
4. Opløsningen kan tildækkes og opbevares ved stuetemperatur et par dage, og kan derefter omrøres og opvarmes inden fremstilling af alginatkuglerne.

Calciumchlorid-opløsning (2 %):

1. Opløs 2,0 g $CaCl_2$ i 100 mL demineraliseret vand i et bægerglas.
2. Anvend ca. 20 mL af disse for at fremstille 40 alginatkugler hvilket giver ca. 3 mL alginat-cellemix.
3. Hav et lille bægerglas med 20-50 mL af calciumopløsningen klar inden gær og alginat blandes.

Glucose-opløsning (1 %):

Opløs 1,0 g glucose i 100 mL demineraliseret vand i et bægerglas.

**Phosphat-buffer med salt pH 7,4**

Der anvendes følgende til fremstilling af 1 L:

Salt	Masse (g)	Koncentration (mM)
NaCl	8,0	137
KCl	0,20	2,7
Na ₂ HPO ₄	1,44	10
KH ₂ PO ₄	0,24	1,8

1. Opløs ovenstående i 800 mL demineraliseret vand.
2. Juster pH til 7,4 med HCl.
3. Overfør til 1 L målekolbe og tilsæt demineraliseret vand til strengen.
4. Alternativt kan NaCl og KCl opløses i en færdiglavet phosphatbuffer med pH 7,4. Denne må dog ikke indeholde EDTA.

Saltopløsning

Der anvendes følgende til fremstilling af 1 L:

Salt	Masse (g)	Koncentration (mM)
NaCl	8,0	137
KCl	0,20	2,7

1. Opløs ovenstående i 800 mL demineraliseret vand.
2. Overfør til 1L målekolbe og tilsæt demineraliseret vand til strengen.

Imobillisering af gærceller

1. Anbring alginatopløsningen i varmebad ved 37 °C.
2. Opslæm 0,25 g tørgær i 10 mL hanevand ved hjælp af en glasspatel. Sørg for at det er en ensartet blanding.
3. Bland 5 mL gærsuspension med 5 mL varm natriumalginatopløsning (37 °C) i et lille bægerglas. Vip eller slyng forsigtigt med glasset til der opnås en ensartet blanding.
4. Overfør, vha. en engangssprøjte, gær/alginat-blandingen dråbevis til bægerglasset med 20-50 mL calciumopløsning. Slyng forsigtigt calciumopløsningen, mens dråberne tilsættes. Så snart gær/alginat-blandingen rammer calciumopløsningen, størkner de til små kugler.
5. Fortsæt til hele gær/alginat-blandingen er brugt.
6. Overfør gær/alginatkuglerne til en tesi.
7. Skyl grundigt med hanevand.
8. Opbevar gær/alginatkuglerne i hanevand indtil anvendelse. Overskydende kugler kan opbevares i køleskab nogle dage.



Forløbenes grunddesign

1. Lav et antal glas hvor der tilsættes 1 ml glucoseopløsning til 9 mL af enten fosfatbufferen eller saltopløsningen.
2. Lav en kontrol med 10 mL opløsning uden tilsat glucose.
3. Tilsæt 4 dråber universalindikator til hver opløsning.
4. Tilsæt et veldefineret antal gær/alginatkugler til hvert glas. Start forsøget til $t = 0$, og sammenlign glassets farve med kontrollen til veldefinerede tidspunkter fx hvert kvarter.

Tilrettelæg egne forsøg

Forsøgene kan designes så der testes forskellige variable, fx:

1. Betydning af buffer. Her varieres på om glucosen tilsættes saltopløsningen eller fosfatbufferen.
2. Mængden af gær/alginatkugler.
3. Temperaturen.
4. Forskellige sukkerarter, fx 1 % opløsninger af glucose, fructose, sucrose, lactose.
5. Forskellige typer tørgær.

Kilde: [Transformation-of-Energy-in-Cells-Resource-2-Alginate-Balls-Lab-Preparation.pdf \(gtac.edu.au\)](https://gtac.edu.au/Transformation-of-Energy-in-Cells-Resource-2-Alginate-Balls-Lab-Preparation.pdf)