

# 2014 年第十一屆國際國中科學奧林匹亞競賽 --實驗測驗(I)

國立臺灣師範大學 科學教育中心

## 第一部分：葡萄糖的酒精發酵(25 分)

### 【實驗簡介】

發酵可被視作有機物的分解，過程中會迅速釋出大量氣體，是為生物利用葡萄糖、果糖及蔗糖獲取能量的一種生物反應，在酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae*(圖 1)可於缺氧的環境下進行，酵母菌屬真菌界之真核生物，他們為單細胞不具有鞭毛，外觀呈圓形或橄欖形，直徑為 5 到 10 $\mu\text{m}$ 。酒精發酵(得名於其產物為酒精)為許多生物科技的應用之基本製程，例如製作含酒精的飲料，如紅酒、啤酒及西打，也可用於生產麵包，近年更被應用於大規模生產酒精，當作生質燃料。

本實驗中使用的酵母菌為(*Saccharomice scerevisiae*)，其代謝過程如公式 1 所示，此過程中，細胞可獲得能量並產生酒精和二氧化碳氣體。藉由測量代謝過程中的氣體釋放量，可推估葡萄糖的消耗量，及酒精的生成量，並可對產生的氣體作定性分析。

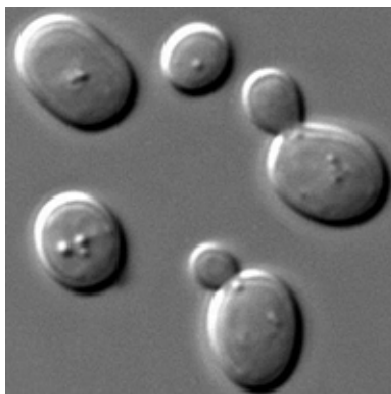
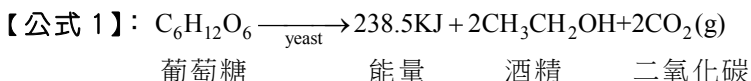


圖 1 *Saccharomices cerevisiae* (干擾相位差顯微鏡影像)



### 【試劑及材料】

ID #	安全設備	數量	ID #	安全設備	數量
A	乳膠手套	8	B	護目鏡	3
C	紙巾捲	1	D	廢物容器	2

ID #	實驗中使用之材料	數量	ID #	實驗中使用之材料	數量
1	長方體的容器	1	7	1000 ml 燒杯	1
2	1000 ml 量筒	1	8	玻璃棒	1
3	250 ml 燒杯	2	9	-10 °C to 150 °C 溫度計	1
4	實驗架	1	10	1000ml 含有橡皮塞及橡皮管的有側管錐形反應瓶	1
5	三指實驗夾	1			
6	15 x 15 cm 橡膠墊	1	11	碼錶	1

ID #	實驗使用之試劑	數量
I	10 L 水	1
II	25 ml 溴瑞香草芬藍	1
III	75 °C, 1 L 熱水保溫瓶	1
IV	4 g 葡萄糖粉末	4
V	50 g 酵母粉	2
VI	25 ml 氫氧化鈣飽和溶液	1

### 【實驗步驟】

#### A. 根據圖 2 組裝氣體測量設備之指示

本設備將被用於監測發酵過程中產生之其中一種氣體

A.1 將容器(ID# I)中的水倒入長方體容器(ID#1)至半滿。(圖 2a)

A.2. 利用 250 ml 燒杯(ID# 3)將量筒 (ID# 2) 注滿水 (圖 2b)

A.3. 將三指實驗夾(ID# 5)固定在實驗架(ID# 4)後，將兩者移近長方體容器(圖 2c)

A.4. 用手掌按住橡膠墊將量筒開口封住 (圖 2d)

A.5. 在量筒被橡膠墊封住的情況下，將量筒倒置。

A.6. 將量筒置入長方形容器中，如圖 2e 所示

(注意：可能會有少量氣體在移開橡膠墊時進入量筒，但應盡量減少其數量。)

A.7. 如圖 2e 所示，在量筒口及容器底部間，保留 2 公分的空隙。

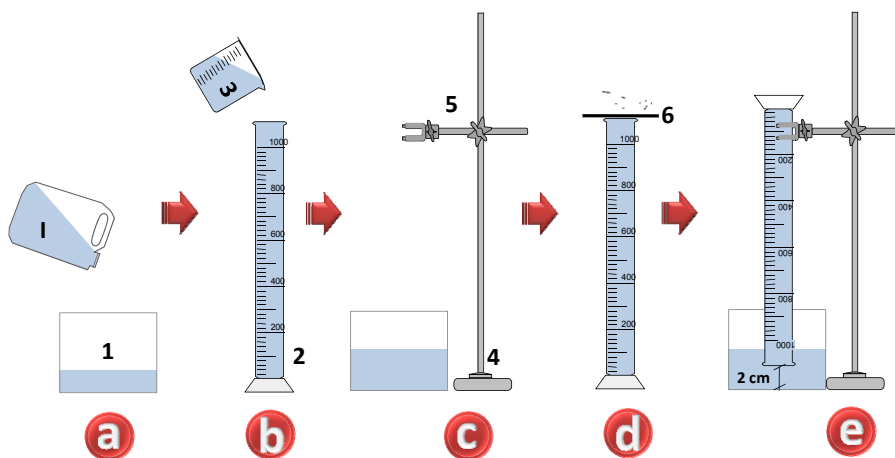


圖 2

## B. 根據圖 3 組裝發酵反應瓶之指示

B.1. 在 1000 ml 的燒杯(ID# 7) 中調配 750 ml 溫度介於 35-40 °C 的溫水，過程中，需使用 1 公升熱水瓶(ID# III)中的熱水(約 75 °C)，及 10 公升容器(ID# I)中的冷水，調配過程中，使用溫度計(ID# 9)監測溫度，並在答案卷上記錄下來

B.2. 將兩個 250 ml 燒杯(ID# 3)分別標上“A”和“B”

B.3. 用步驟 B.1 調配出的溫水，按下述方法配製懸浮液 A 及溶液 B。

懸浮液 A：在標為 A 的燒杯(ID# 3)中，倒入 50 公克的酵母粉(ID# V)，利用 150 ml 的溫水(35-40°C)溶解，過程中，使用玻璃棒(ID# 8)攪拌均勻，用溫水調整最終體積至 250 ml(圖 3a)。

溶液 B：在標為 B 的燒杯(ID# 3)中，倒入 4 公克的葡萄糖(ID# IV)，利用 150 ml 的溫水(35-40°C)溶解，過程中，使用玻璃棒(ID# 8)攪拌均勻，用溫水調整最終體積至 250 ml(圖 3a)。

B.4. 將懸浮液 A 及溶液 B 倒入反應瓶(ID# 10)中，為確保能將最大量的酵母菌轉到反應瓶內，可用部分溶液 B 沖洗 A 燒杯，不要把沖洗液拋棄，而是將之倒入反應瓶中，輕柔地圓弧搖晃至均勻，將反應瓶置放於先前曾使用過的橡膠墊(ID# 6)上(圖 3b)。

**重要：**全數的懸浮液 A 及溶液 B 均要倒入反應瓶中，但不要用多餘的水沖洗燒杯後再倒入。

B.5. 核對混合溶液的溫度，並記錄在答案卷中的表 1.1 中(圖 3c)。

B.6. 反應瓶用橡膠塞密封好(圖 3d)。

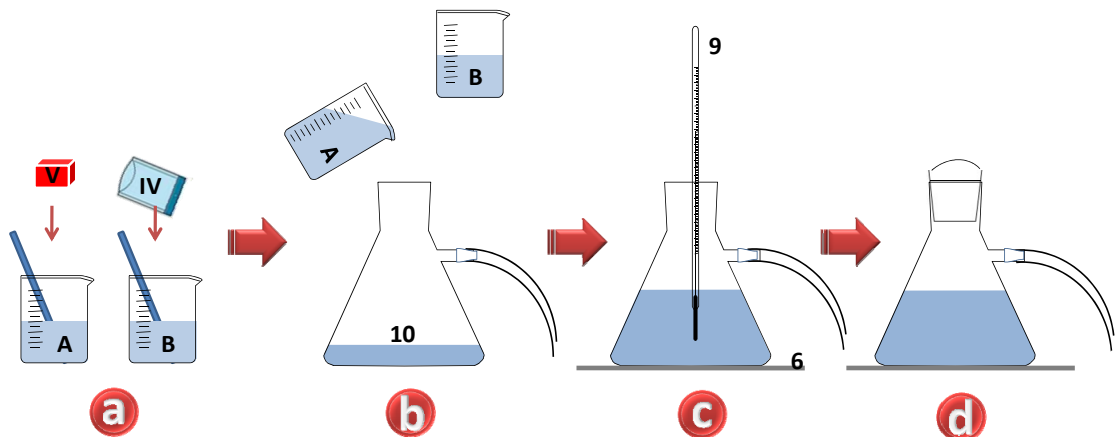


圖 3

## C. 根據圖 4 組裝發酵反應瓶及氣體測量裝置之指示

C.1. 將橡皮管的開口端放入倒置的量筒內(圖 4)，管口必須放在倒置量筒的最頂端。

- C.2. 輕柔地圓弧搖晃反應瓶，使困在膠管中的氣體釋出，記下此時之液面，當做尺標中 0 的位置，此尺標將用以測量二氧化碳  $\text{CO}_2(\text{g})$  的生成。

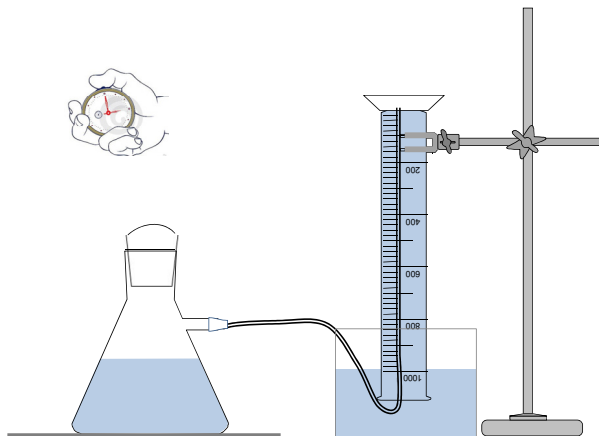


圖 4

#### D. 紀錄發酵實驗數據的指示

D.1. 當發酵瓶及氣體測量裝置組合完成後(圖 4) 儘速啟動計時器(ID# 11)。

D.2. 整個實驗過程中，每分鐘輕柔地圓弧搖晃反應瓶 5 秒鐘。

(注意：要小心的搖晃，避免橡皮管自量筒中脫出。)

當發酵在反應瓶中進行時，會有氣態代謝產物釋出，它們會經由橡皮管移入量筒中，並表留在量筒的頂端。可藉以測量其體積或由量筒中水的排出，觀察到代謝氣體的累積，部分的代謝氣體會溶於反應瓶內的溶液中。

D.3. 每 2 分鐘於答案卷的表 1.1 上記錄一次氣體的累計體積

(重要：使用再啟動程序，不要停止碼錶的運作。)

表 1.1 發酵實驗數據的紀錄[8.5 分=7.0(數據紀錄)+1.5(流量計算)]

用來配置懸浮液 A 及溶液 B 的溫水溫度：		
懸浮液 A 加上溶液 B 開始時的溫度(在反應瓶內)		
時間(分)[min]	累計氣體體積 $V_a(t)$ ; [ml]	流量 $F(t)$ , [ml/min]
0		
2		
4		
6		
8		
10		
12		
14		

16		
18		
20		
22		
24		
26		
28		
30		
32		
34		
36		
38		
40		

### E. 發酵再活化實驗數據紀錄指引

- E.1. 發酵後 40 分鐘，握住反應瓶，把橡皮管折彎捏緊，勿讓氣體通過。
- E.2. 把反應瓶的橡皮塞拿掉  
(重要：別讓橡皮管滑出量筒。)
- E.3. 將第二份葡萄糖固體(ID# IV)加入反應瓶並以橡皮塞塞住，確保緊密封閉。
- E.4. 鬆開橡皮管使氣體通過。
- E.5. 以圓弧輕晃反應器 30 秒以確保新加入的葡萄糖溶解。  
(重要：如果量筒空了，可以 Section A 的步驟再填滿。如果沒有空則不必動量筒裝置。)
- E.6. 反應器一定要以圓弧方式輕輕晃動，每一分鐘搖晃五秒並記錄數據。
- E.7. 累積的氣體體積必須每 2 分鐘記錄一次直到 10 分鐘為止，記錄在答案紙上的表 1.2。

表 1.2 發酵再活化數據[2.5 分=2.0(記錄數據)+0.5(流量計算)]

時間[ <i>min</i> ]	累積氣體體積 $V_a(t)$ ; [ <i>ml</i> ]	流量 $F(t)$ , [ <i>ml/min</i> ]
42		
44		
46		
48		
50		

### F. 辨識氣態代謝產物

- F.1. 與  $\text{Ca(OH)}_2$  反應
  - F.1.1. 再活化 10 分鐘後由量筒中拿出橡皮管插入飽和  $\text{Ca(OH)}_2$  溶液(ID# VI) 如圖 5 所示。

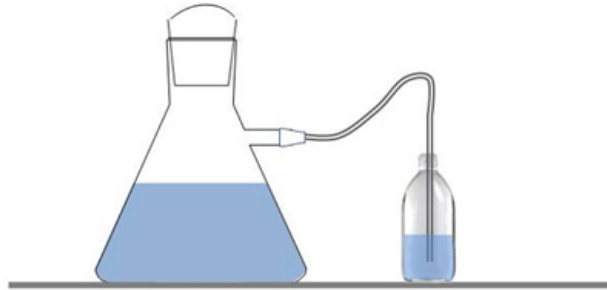


圖 5

F.1.2. 將反應器以圓弧輕晃 60 秒使生成氣體之氣泡通過  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  溶液。

F.1.3. 觀察測定溶液( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )是否有任何改變。

請選擇正確答案並在答案卷上的表格中畫記號。[0.5 分]

- 看到白色沉澱
- 看到黑色沉澱
- 看不到沉澱


F.1.4. 在答案卷上寫下計量平衡的化學反應方程式[0.5 分]

F.2. 與溴瑞香草酚藍指示劑反應

F.2.1. 將橡皮管由  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  溶液拿出然後浸入溴瑞香草酚藍溶液(ID# II)如圖 6 所示。

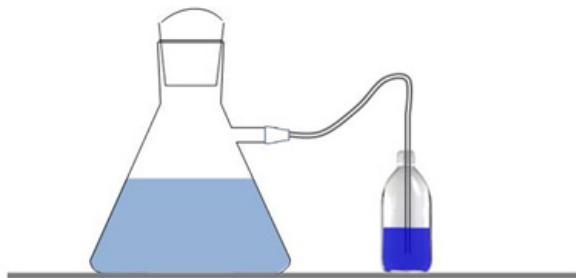


圖 6

F.2.2. 將反應器以圓弧輕晃 60 秒使產生氣體的氣泡通過溴瑞香草酚藍溶液。

F.2.2.1. 觀察測定溶液是否有任何改變。

請選擇正確答案並在答案卷上的表格中畫記號。[0.2 分]

- 看見黃色
- 看見藍色
- 看見紅色
- 看見白色


F.2.2.2. 溴瑞香草酚藍的顏色改變代表[0.20 分]：

- pH 上升
- pH 下降
- pH 不變


F.2.2.3. 寫下 CO<sub>2</sub> 溶於水中解離的反應式，如此可說明指示劑溶液的顏色變化。[0.6 分]

### G. 數據處理與分析：

填完並計算答案卷上表 1.1 與表 1.2 的數據。(寫在答案卷上)

G.1. 根據公式 2 計算每個時間間隔(Δt=2 min)的代謝氣體流量(F)。

$$F = \frac{V_a(t) - V_a(t - \Delta t)}{\Delta t} \quad \text{公式 2}$$

其中：

- F：產生氣體流量[ml/min]
- V<sub>a</sub>(t)：在時間 t 所累積的體積[ml].

G.2. 將表 1.1 與表 1.2 的數據依迪卡耳座標系統作圖於答案卷方格紙上。[2.5 分]

G.2.1. 圖 A：累積氣體體積(V<sub>a</sub>(t)；[ml]) 對發酵時間[min]。

G.2.2. 圖 B：產生氣體流量(F(t)；[ml/min]) 對發酵時間[min]。[1.8 分=1.5 分(作圖) + 0.3 定出發酵階段]

G.3. 在圖 A 的發酵曲線上 t = 40 min 處畫一個(X)。

一開始放入的葡萄糖經過 40 分鐘發酵後一部分被代謝掉，未被代謝掉的部分留在反應瓶的溶液中稱為“殘餘葡萄糖”，代謝的葡萄糖被轉換成 CO<sub>2</sub> 與酒精，大部分 CO<sub>2</sub> 經橡皮管被通入量筒，剩下的代謝氣體 CO<sub>2</sub> 溶解於反應器的溶液中。

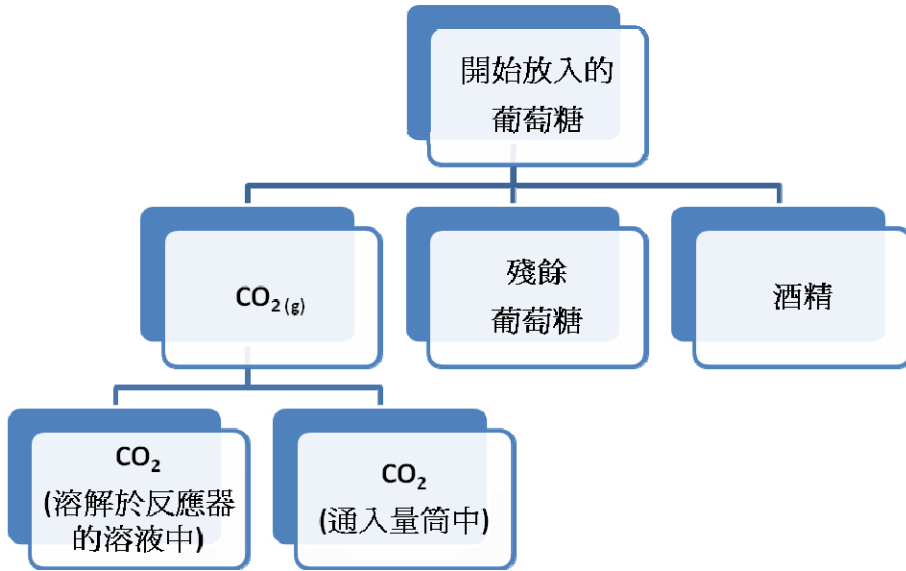


圖 7

在答案卷上進行以下計算

G.3.1. 計算被代謝產生  $\text{CO}_2$  的葡萄糖重量(單位:公克), 考慮累積 40 分鐘的  $\text{CO}_2$  體積, 以化學計量、公式 1 與下列數據計算之: [1.0 分]

Element 元素	Relative Atomic Mass 相對原子量
C	12.010
H	1.008
O	16.000
該反應條件下的 $\text{CO}_2$ 莫耳體積	22.4 L/mol

G.3.2. 殘餘葡萄糖的量可用以下程序估算:

G.3.2.1. 在圖 B 中指出到 40 分鐘為止的發酵階段(a, b and c):

- 氣體產生率增加
- 氣體產生率減慢
- 氣體產生率固定

在答案卷圖 B 上畫記號或粗線以指出不同的發酵階段並寫下相對應的英文字母。

G.3.2.2. 計算在“氣體產生率下降階段”(階段 b, 圖 B)所測得代謝氣體流量(F)的自然對數(ln), 將計算值填入答案卷中的表 2.1。



表 2.1 計算在”代謝氣體產生率下降階段”所測得數據的自然對數(ln) [0.5 分]

Time [min]	F [ml/min]	ln(F)

G.3.2.3. 將表 2.1 的數據 ln F 對 time [min]畫於直角坐標方格紙上(圖 C)。(1.0 分)

G.3.2.4. 在圖 C 上畫出最貼近數據的直線。(1.0 分)

G.3.2.5. 計算圖 C 上直線的斜率(A)與截距(B)，並填寫於答案卷中的表 2.2。 [0.7 分]

表 2.2 校正曲線之線性方程式

線性方程式	
斜率(A)	
y-截距(B)	

G.3.2.6. 殘餘葡萄糖也可以有一個假設 CO<sub>2</sub> 體積 (V<sub>h</sub>)，如果殘餘葡萄糖被代謝則此 CO<sub>2</sub> 體積可以流入量筒中，以公式 3 計算並記錄 V<sub>h</sub> 在答案卷上。 [0.2 分]

$$V_h = -\frac{e^{[A \times t_h + B]}}{A} \quad \text{公式 3}$$

其中：

- $t_h = 40 \text{ min}$
- $V_h$ ：假設的 CO<sub>2</sub> 體積[ml]
- A：在 G.3.2.5 所得直線斜率
- B：在 G.3.2.5 所得直線截距

- G.3.2.7. 依化學計量關係由  $\text{CO}_2$  體積  $V_h$  計算葡萄糖質量，此為反應器中殘餘的葡萄糖量。[0.4 分]
- G.3.2.8. 計算在 40 分鐘內發酵的葡萄糖總質量，計算並記錄值於答案卷上。[0.2 分]
- G.3.2.9. 計算在 G.3.2.8.所生成的  $\text{CO}_2$  總質量，記錄值於答案卷上。[0.4 分]
- G.3.2.10. 計算在 40 分鐘發酵所生成並排入量筒的  $\text{CO}_2$  質量，用  $V_a$  (40 min) 作計算，記錄值於答案卷上。[0.4 分]
- G.3.2.11. 計算溶於反應瓶內的  $\text{CO}_2$  質量，記錄值於答案卷上，假設整個過程中， $\text{CO}_2$  沒有溶解於反應瓶之外的水中。[0.2 分]
- G.3.2.12. 計算反應瓶內的  $\text{CO}_2$  溶解度(in g/l)記錄值於答案卷上。[0.3 分]
- G.3.3. 根據化學計量關係與公式 1 計算在時間  $t=40$  min 所生成乙醇量(莫耳)，寫下計算過程與答案於答案卷上。[0.4 分]
- G.3.4. 利用在 G.3.3.所得之乙醇量，計算在  $t=40$  min 時反應瓶內的乙醇濃度 (in g/100 ml)，寫下計算與答案於答案卷上。[0.5 分]
- G.3.5. 因下述的一些原因，氣體生成速率在圖 B 的 b 階段減緩，考慮前段(G.3.4)所算的乙醇濃度與對酵母有毒的濃度為 14 g/100 ml。[0.5 分]  
請在答案卷上選取主要的理由，在格子內打勾。
- a. 酵母菌死亡
  - b. 因酒精濃度導致對酵母菌的抑制
  - c. 缺乏可供發酵的基質


(待續)