

FORSØG

ØL – verdens første svar på anvendt bioteknologi

INDHOLDSFORTEGNELSE

| | | |
|---|---|----|
| | LÆREVEJLEDNING | 3 |
| 1 | DET SJOVE "GÆR + BALLON"-FORSØG..... | 4 |
| 2 | PÅVISNING AF SUKRASEAKTIVITET | 5 |
| 3 | PÅVISNING AF SUKRASEAKTIVITET I UPASTEURISERET ØL | 6 |
| 4 | RENDYRKNING AF GÆR FRA UPASTEURISERET ØL | 7 |
| 5 | GÆRING AF ÆBLEJUICE..... | 10 |
| 6 | VÆKSTFORSØG MED GÆR..... | 12 |
| 7 | RESTRIKTIONSANALYSE AF FORSKELLIGE GÆRSTAMMER..... | 14 |

LÆREVEJLEDNING

Alle forsøgene, der indgår i denne vejledning, har relation til fremstillingen af øl, men med et specielt fokus på den rolle gærceller spiller. Det er meningen, at eleverne skal forstå, at der findes mange simple metoder/analyser til at undersøge enzymaktivitet, vækst og gæring.

Forsøgene i hæftet er alle af varierende længde, og det er på ingen måde nødvendigt at gennemgå alle forsøgene. Det sidste forsøg er det mest omfattende, men meget interessant – og det bruges stadig i bryggeribranchen!

Forsøg 1-3 er alle forholdsvis korte forsøg og kan bruges som en god indledning til forløbet. De er meget hurtigt at sætte op, og der sker noget ret hurtigt. Desuden kan eleverne selv opstille en række kontrolforsøg.

Forsøg 4: Forholdsvis let forsøg, det tager nogle dage før man har kolonier og det er meget vigtigt at arbejde sterilt.

Forsøg 5: Let forsøg og billige materialer.

Forsøg 6: Dette forsøg kræver en del forarbejde, og gerne en hel dag hvor eleverne har mulighed for at udtage prøver.

Forsøg 7: Dette forsøg ser umiddelbart meget omfattende, men det kan sagtens deles over flere dage.

Dag 1: PCR (eleverne blander reagenser, og PCR maskinen sættes igang). PCR reaktionen tager ca. 4 timer (afhængig af maskine), når PCR maskinen er færdig sættes PCR rørene i køleskabet.

Dag 2. Se fragmenter på gel, tilsæt restriktionsenzym (lad stå natten over).

Dag 3. Se fragmenter på gel

Da teorimaterialet der hører til denne øvelsesvejledning ikke indeholder nogle afsnit om PCR samt restriktioner, vil det være en fordel at lade eleverne læse om dette emne inden denne øvelse påbegyndes.

1 DET SJOVE "GÆR + BALLON"-FORSØG

MATERIALER

½ L vandflaske

Almindeligt bordsukker (sukrose)

Vand

1 pakke bagegær (tørgær kan også sagtens bruges)

Ballon

Elastik

FREMGANGSMÅDE

Hæld 25 g sukker i vandflasken og fyld den op med ca. 250 mL vand (det er meget vigtigt at flasken ikke fyldes helt op med vand, da der dannes ret meget skum). Kom ca. halvdelen af gæren i flasken, kom låget på flasken og ryst indholdet godt. Tag låget af flasken og kom ballonen på (sørg for at ballonen sidder så langt nede på flasken som muligt). Fastgør ballonen ekstra godt ved at bruge en elastik. Stil flasken et lun sted, gerne ovenpå en radiator (det går hurtigst hvis temperaturen ligger på ca. 30 °C). Ballonen skulle gerne begynde at fyldes med luft inden for et par minutter.

Den gas, der er dannet i ballonen kan undersøges på forskellige måder:

- Ballon A indeholder gærgas. Fyld en ballon B med udåndingsluft til samme volumen. Slip de to balloner i samme højde og noter hvilken ballon der falder hurtigst.
- Gassen i ballon A kan effektivt bruges til at slukke et fyrfadslys.
- Lad ballon A og B ligge til dagen efter og noter om ballonerne mister volumen.

EFTERBEHANDLING

- Hvorfor produceres der nettogas i ballonen?
- Hvilken gas indeholder ballon A?

2 PÅVISNING AF SUKRASEAKTIVITET

Saccharomyces cerevisiae danner sukrase (invertase) ved tilstedeværelsen af sukrose, idet sukrase nedbryder sukrose til glukose og fruktose. Det udnyttes i denne øvelse at sukrase udskilles ekstracellulært, det vil sige at sukrose nedbrydes enzymatisk til glukose og fruktose før det optages af gærcellen. Sukraseaktiviteten kan påvises ved tilstedeværelse af glukose og måles ved hjælp af glukose-sticks.

MATERIALER

2 glukose-sticks
Alm. bordsukker (sukrose)
2 glas
Vand
5 g gær

FREM GANGSMÅDE

To glas vand fyldes halvt med lunkent vand og der opløses lige mængder sukrose i begge glas (så opløsningerne er mættet).

Glas 1 er "sukrose-kontrollen".

Til Glas 2 tilsættes 5 g gær, og det får lov at stå i fem minutter.

Efter de fem minutter måles glukosekoncentrationen i begge glas.

Hvad er der sket??

EFTERBEHANDLING

Opskriv reaktionen for nedbrydelse af sukrose, og forklar hvorfor man kan bruge glukose-sticks til at påvise sukraseaktivitet

Hvorfor er det vigtigt med kontrolforsøg?

Som en ekstra kontrol kan man i et tredje glas vand kun tilsætte gær.

3 PÅVISNING AF SUKRASEAKTIVITET I UPASTEURISERET ØL

Mange belgiske øltyper er ikke pasteuriserede, hvilket vil sige at øllen stadig indeholder levende gærceller. Dette kan påvises undersøge om der er sukraseaktivitet i øllet.

MATERIALER

Forskellige slags øl (både pasteuriserede og ikke-pasteuriserede)

2 glukose-sticks

Alm. bordsukker (sukrose)

2 glas

Vand

FREMGANGSMÅDE

Det er en fordel at fortynde øllet når det bruges til dette forsøg. Samme fremgangsmåde for forrige forsøg følges.

Der kan opstilles flere forskellige kontrolforsøg.

EFTERBEHANDLING

-Hvorfor kan sukraseaktivitet bruges til at påvise at der er levende gærceller i upasteuriseret øl?

4 RENDYRKNING AF GÆR FRA UPASTEURISERET ØL

Udover at vise, at der er sukraseaktivitet i upasteuriseret øl, kan gær også rendyrkes fra upasteuriseret øl.

Stammer fra forskellige slags øl kan testes for vækst på forskellige carbonkilder, de kan bruges i vækstofforsøg samt man kan lave en DNA fingerprinting analyse af stammerne.

MATERIALER OG APPARATUR

Upasteuriseret øl

Sprit

500 mL konisk kolbe med 100 mL YPD medie med prop (autoklaveret)

Lighter eller bunsenbrænder

Vandbad med omrystning

Agarplader med YPD medie

Podenål

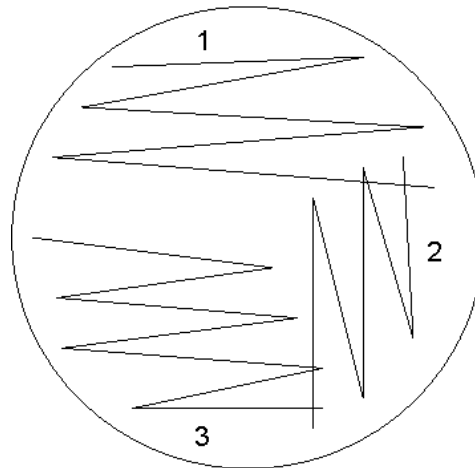
FREMGANGSMÅDE

Start med at spritte bordet af først, sprit derefter ølflasken af. Åben derefter ølflasken og sprit åbningen af, før flaskens åbning indover flammen fra en lighter (meget kortvarigt, ellers risikerer flasken at springe). Hæld flaskens indhold ned i den koniske kolbe med YPD medie (stadig under sterile forhold), sæt proppen på den koniske kolbe og kom kolben i et vandbad med omrystning ved 30°C.

Lad kolben stå under omrystning i ca. en dag.

Efter en dag under omrystning ved 30°C, overføres gærceller fra kolben til agarplader. Dette gøres ved hjælp af en podenål. Podenålen føres ind under en flamme så den bliver rødglødende, lad den køle af (evt. ved at lade den røre agaren i agarpladen, ude i kanten). Før podenålen ned i den koniske kolbe og før derefter podenålen i zig-zag mønster på agarpladen, se Figur 1.

Figur 1. Renstrygning af gærceller

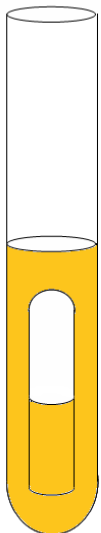


Mellem 1, 2 og 3 (Figur 1) steriliseres podenålen. Dette sikrer at man til sidst får enkelte kolonier. Agarpladerne sættes med bunden i vejret i et varmeskab ved 30°C i 2-3 dage. Når pæne kolonier er fremkommet kan agarpladerne opbevares i køleskabet. Lav mindst 3-4 plader.

Lugt eventuelt til kolben med øl og YPD medie efter indholdet er blevet brugt til renstrygning. Lugter indholdet surt, er der en risiko for at flasken er blevet kontamineret.

FORSLAG TIL VIDERE FORSØG

-Vækst på forskellige carbonkilder (evt. ved brug af et almindeligt reagensglas og et durhamrør.



- Vækstforsøg
- DNA fingerprinting (restriktionsanalyse)

5 GÆRING AF ÆBLEJUICE

FORMÅL:

Formålet med øvelsen er at bestemme aktiviteten af *Saccharomyces cerevisiae* som funktion af temperatur.

MATERIALER:

5 koniske kolber (100 ml)

Staniol

Tusch

Analyse vægt

500 ml æblejuice

Gæropslemning:

200 ml æblejuice, 20 gram sukker,

20 gram gær. Fremstillet ca. 1-2 timer før af læreren – stilles varmt – herved er gærcellerne i god vækst.

FREM GANGSMÅDE:

1. På kolberne noteres holdnummer og temperatur.
2. 3 ml gæropslemning hældes i hver kolbe vha. pipette.
3. Æblejuice hældes i kolberne til 100 ml mærket.
4. Kolberne lukkes med et lille stykke staniol (sættes tæt og godt fast).
5. Prik et lille hul (ca. 2 mm i diameter) i staniolen.
6. Vej kolberne T_0 . Noter klokkeslet, antal timer (t) og vægten af kolberne (g).
7. Vej kolberne efter 1 time T_1 . Noter klokkeslet, antal timer, vægt.
8. Vej kolberne sidst på dagen T_2 . Noter klokkeslet, antal timer, vægt.
9. Vej kolberne næste morgen (dag 2) T_3 . Noter klokkeslet, antal timer, vægt.
10. Vej evt. kolberne sidst på dag 2 eller om morgenen dag 3 (T_4). . Noter klokkeslet osv.

RESULTATSKEMA:

| | | Køligt | Stuetemp. | Varmeskab 30°C | Varmeskab 40°C | Varmeskab 50°C |
|-------------------|-----|--------|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Temp. registreret | | °C | °C | °C | °C | °C |
| T_0 | kl. | t | g | g | g | g |
| T_1 | kl. | t | g | g | g | g |
| T_2 | kl. | t | g | g | g | g |
| T_3 | kl. | t | g | g | g | g |

| | | | | | | | |
|-------------------|-----|---|---|---|---|---|---|
| (T ₄) | kl. | t | g | g | g | g | g |
|-------------------|-----|---|---|---|---|---|---|

EFTERBEHANDLING:

Lav et skema indsæt den mængde CO₂ (gram), som kolberne har tabt (dvs. den mængde CO₂ som gærcellerne har produceret). Indsæt tiden i timer.*

Tegn en graf (graf 1), hvor du har gærceleaktiviteten (gram CO₂) som funktion af tiden for hver af de 5 kolber (dvs. de 5 temperaturer).*

Tegn en graf (graf 2), hvor du har gærcele aktiviteten som funktion af temperaturen (ved T₃).

Reaktionsskemaet for dannelsen af alkohol ud fra glucose er:



Kan alkoholkoncentration i æblejuice-opløsningen bestemmes ud fra dette reaktionsskema? Hvilke faktorer har man ignoreret i denne reaktion?

6 VÆKSTFORSØG MED GÆR

Undersøgelse af almindeligt bagegærs vækst. De forskellige vækstfaser sammenholdes med glukosekoncentrationen i mediet.

BESTEMMELSE CELLETAL VHA. SPEKTROFOTOMETER

For encellede organismer er OD (optisk densitet) proportional med antallet af celler. Derfor kan man bruge uklarheden af opløsningen som et alternativ til direkte at tælle antallet af celle. Når man måler OD på gærvækst i YDP medie, måles der ved 600 nm (orange). Proportionaliteten gælder kun indenfor et begrænset område af OD'en, derfor kan det være nødvendigt at fortynde den udtagne prøve. Som en tommelfingerregel siger man at hvis OD'en er over 1,0 skal prøven fortyndes.

Vækstmediet bruges som reference (blank), dvs. at OD'en for rent vækstmedie sættes til 0.

MATERIALER OG APPARATUR:

Spektrofotometer
Pipetter (udtagning af prøver på 1 mL)
Kuvette (en er nok, den samme kan bruges igen)
Konisk kolbe (500 mL)
Vandbad med omrystning
Glukose-sticks
Bagegær

MEDIE (YPD-BASERET):

| | |
|-------------|--------|
| Gærekstrakt | 20 g/L |
| Pepton | 10 g/L |
| Glukose | 20 g/L |

De tre stoffer opløses i deioniseret vand. Det kan godt tage nogen tid at få det opløst, brug eventuelt en magnet omrører eller flaske med skruelåg. Glukosen købes ofte som glucose monohydrate (dvs. $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$), hvis dette er tilfældet skal der istedet tilsættes 22 g/L (så det passer med 20 g/L glukose).

For at undgå kontaminering autoklaveres mediet inden det bruges i vækstforsøget.

Til vækstforsøget tilsættes 100 mL medie til en kolbe, der lukkes med en hætte (evt. en vatprop), før de autoklaveres. Lav en liter medie af gangen enten fordelt på 10 kolber eller autoklaver resten i en glasbeholder med skruelåg og opbevar mediet i køleskab (husk når der autoklaveres, skal låget IKKE skrues helt på flasker med skruelåg, ellers ender du med at have medie i hele autoklaven).

FREMGANGSMÅDE

Inokuler en kolbe med gærkulturen vha. en podenål om aftenen (så sent som muligt), kulturen skal vokse under omrystning ved 30 °C. Dagen efter udtages en prøve kl. 8, kl 10 og derefter en gang timen. OD samt glukosekoncentration måles, husk at måle glukosekoncentration på den uforyndede prøve.

Noter det præcise klokkeslet for prøveudtagningen.

EFTERBEHANDLING

OD og glukosekoncentrationen plottes som funktion af tiden

Beregn fordoblingstiden for gærcellernes vækst

VIGTIGT

-Noter koncentrationen af glukose med det samme, da farven på glukose-sticks falmer ret hurtigt.

-Når prøverne udtages, skal man arbejde sterilt, ellers risikerer man kontaminering.

-Hvis der ikke er tid til at måle OD med det samme, kan prøverne sagtens sættes på is (men husk at whirl dem, når OD'en måles).

-Når gærkulturen er i den eksponentielle fase, er det oplagt at se på prøven i et mikroskop, da der er mulighed for at se knopskydning af gær.

-Kør gerne to parallelle forsøg af gangen (hvis den ene skulle kontamineres).

Forsøget kan udvides, så klassen deles i eksempelvis to hold. Et hold hvor gæren vokser på glukose og et andet hold hvor gæren vokser på en blanding af glukose + galaktose (her vil der opstå to lag faser, en når man starter, og en når den første carbonkilde er udtømt).

7 RESTRIKTIONSANALYSE AF FORSKELLIGE GÆRSTAMMER

Opformering af et bestemt gen eller region på kromosomet vha. PCR og derefter skæring med et bestemt restriktionsenzym bruges ofte til genetisk karakterisering af ølgær.

I denne øvelse bruges denne metode til at teste om forskellige gærstammer er ens genetisk.

MATERIALER

2 agarplader med hver sin gærstamme (brug evt. alm. bagegær og en ølgærstamme)

Pipetter (100 μ L og 20 μ L)

Pipettespidser

Steril tandstik

Sterilt vand

Taq polymerase

Polymerase buffer

dNTP opløsning (koncentration: 200 μ M)

2 primeropløsninger (primer 1 og primer 2) (koncentration: 10 μ M)

2 agarose geler med tilsat EtBr

Loading buffer

DNA ladder

handsker

Restriktionsenzym (*EcoRI*)

EcoRI buffer

pincet

PCR maskine

PCR rør

Gelelektroforesekar med tilhørende strømforsyning

UV lampe (husk at bruge specielle sikkerhedsbriller når UV-lampen er tændt)

Kamera

FREMGANGSMÅDE

Der tilsættes 32 μ L sterilt H₂O til 3 PCR rør. Skrab med en steril tandstik en koloni fra den ene agarplade og opløs kolonien i vandet (mærk røret A), skrab med en ny tandstik en koloni fra den anden agarplade og opløs også denne i vandet (mærk røret B), det sidste PCR rør skal bruges som kontrol (og mærkes K).


Tilsæt nu følgende til hvert rør (brug tjeklisten):

| Rør | A | | B | | K | |
|-----------------------|------------|--|------------|--|------------|--|
| Sterilt vand | 32 μ L | | 32 μ L | | 32 μ L | |
| Polymerase buffer | 10 μ L | | 10 μ L | | 10 μ L | |
| dNTP opløsning | 5 μ L | | 5 μ L | | 5 μ L | |
| Primer 1 | 1 μ L | | 1 μ L | | 1 μ L | |
| Primer 2 | 1 μ L | | 1 μ L | | 1 μ L | |
| <i>Taq</i> polymerase | 1 μ L | | 1 μ L | | 1 μ L | |

Ialt vil volumenet i PCR rørene være 50 μ L

Bland indholdet i PCR rørene ved at suge indholdet op og ned med en pipette (brug en ny pipettespids for hvert rør).

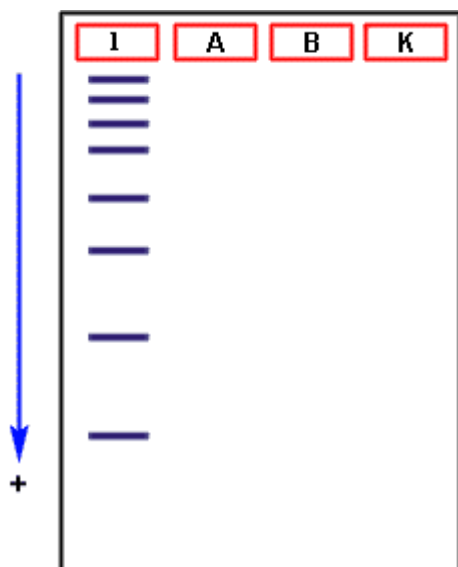
Dernæst placeres PCR rørene i en PCR maskine og følgende program bruges:

| | | | | |
|--------------------|------|-------|--|--|
| Start-denaturering | 94°C | 5 min |  | |
| Denaturering | 94°C | 1 min | | |
| Annealing | 60°C | 1 min | | |
| Elongering | 72°C | 2 min | | |
| Elongering-slut | 72°C | 7 min | | |

Under de nedenstående trin skal man arbejde med handsker! Loading buffer er giftigt og etidium bromid er stærkt kræftfremkaldende.

Dagen efter overføres 5 μ L fra A, B og K røret til hvert sit nye rør (mærk rørene A1, B1 og K1). Der tilsættes 1 μ L loading buffer til A1, B1 og K1 og indholdet blandes (husk at bruge en ny pipettespids for hvert rør).

Indholdet fra A1, B1 og K1 overføres til hver sin brønd i en agarosegel. Brønden yderst til venstre skal bruges til DNA "stigen" se figur, så man kan bestemme størrelsen af fragmenterne. Der tilsættes 10 μ L af DNA stigen.



Når gelen har kørt i 30-45 min ved 75 V, tages der et billede af gelen når det bliver be-lyst med UV lys (husk sikkerhedsbriller).

Noter længde af fragmenter.

Restriktionsanalyse

Tre nye rør mærkes A2, B2 og K2.

Der tilsættes følgende til hvert rør (brug igen tabellen som tjekliste):

| Rør | A2 | | B2 | | K2 | |
|----------------------|-------|--|-------|--|-------|--|
| H ₂ O | 12 µL | | 12 µL | | 12 µL | |
| <i>Eco</i> RI buffer | 2 µL | | 2 µL | | 2 µL | |
| <i>Eco</i> RI | 1 µL | | 1 µL | | 1 µL | |

Til A2 tilsættes 5 µL fra A

Til B2 tilsættes 5 µL fra B

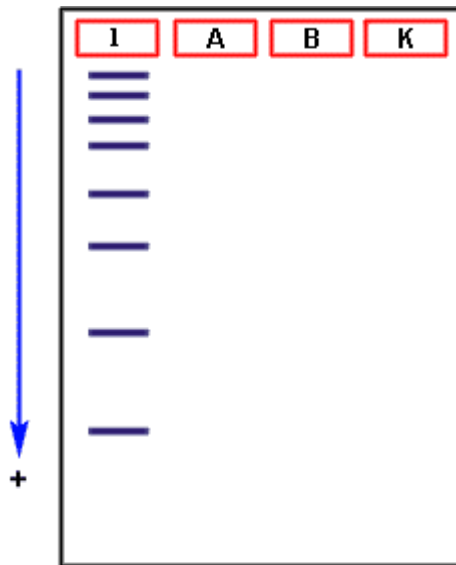
Til K2 tilsættes 5 µL fra K

De tre rør A2, B2 og K2 sættes nu i et varmeskab ved 37°C natten over. Enzymet varme-inaktiveres ved at komme rørene i kogende vand (30 sek, brug en pincet).

Tag handsker på.

5 μL fra A2, B2 og K2 røret til hvert sit nye rør (mærk rørene A3, B3 og K3). Der tilsættes 1 μL loading buffer til A3, B3 og K3 og indholdet blandes (husk at bruge en ny pipettespids for hvert rør).

Indholdet fra A3, B3 og K3 overføres til hver sin brønd i en agarosegel. Brønden yderst til venstre skal bruges til DNA "stigen" se figur, så man kan bestemme størrelsen af fragmenterne. Der tilsættes 10 μL af DNA stigen.



Når gelen har kørt i 30-45 min ved 75 V, tages der et billede af gelen når det bliver belyst med UV lys (husk sikkerhedsbriller).

Noter længde af fragmenter.

EFTERBEHANDLING

Beskriv princippet i en PCR reaktion (inkluder en skitse).

Foklar hvad restriktionsenzym er.

Brug de to gelbilleder (før og efter restriktionsanalyse) til at forklare hvad der er sket med DNA fragmenterne efter restriktionsenzymet har været tilsat. Passer længderne?

Hvorfor er det vigtigt at inkludere en kontrol i forsøget.

Hvorfor er det vigtigt at køre en gel både før og efter man tilsætter restriktionsenzym?