

Arbejdsspørgsmål

1. Opskriv de seks grundlæggende bestanddele i en fermenteringsproces og beskriv, hvad der sker.
2. Vælg det rigtige ord (*høj / lav*):
 - a. Penicillin er et produkt med _____ markedsværdi og _____ molarmasse.
 - b. Vaskemiddelenzym er et produkt med _____ markedsværdi og _____ molarmasse.
 - c. B12-vitamin er et produkt med _____ markedsværdi og _____ molarmasse.
 - d. Insulin er et produkt med _____ markedsværdi og _____ molarmasse.
 - e. Bagergær er et produkt med _____ markedsværdi og _____ molarmasse.
3. Forklar hvorfor et vækstmedie er vigtigt. Hvorfor skal det indeholde næringsstoffer som en kulstofkilde, en energikilde og en nitrogenkilde?
4. Nævn to-tre typiske kulstofkilder til anvendelse i vækstmedier samt to-tre typiske nitrogenkilder.
5. Lav en illustration af mikroorganismers vækst. Forklar de forskellige vækstfaser og deres sammenhæng med mikroorganismernes produktion af vækstrelaterede og ikke-vækstrelaterede produkter.
6. Forklar om loven om massebevarelse gør sig gældende for fermenteringsprocesser. Inddrag 'black box'-modellen i forklaringen.
7. Udfyld felterne:
 - a. Formlen for udbytte: _____
 - b. Formlen for produktivitet: _____
 - c. Formlen for produktkoncentration: _____Forklar hvorfor hhv. udbytte, produktivitet og produktkoncentration er en vigtig koefficient for fermenteringsprocessen.
8. Under iltfrie forhold kan glukose blive forbrugt af gær til at fremstille ethanol og CO_2 ved glykolyse og gæring, eller det kan blive dirigeret mod syntesen af andre produkter gennem andre reaktionsveje i gær. En inokulation af gær bliver tilsat et vækstmedium indeholdende 10 g/L glukose. Efter fire timer er koncentrationen af glukose 1 g/L, mens koncentrationen af ethanol er 3,6 g/L.
 - a. Hvad er udbyttet af ethanol (g/g)?
 - b. Hvad er produktiviteten af ethanol (g/(L·h))?
9. Forklar hvad der menes med, at en produktionsorganisme kan være enten *naturlig* eller *gensplejset*. Nævn et eksempel på en produktionsorganisme, som man i nogle tilfælde bruger som en naturlig producent, og i andre tilfælde som en gensplejset producent.
10. Nævn to-tre strategier, som man kan bruge til at optimere cellers produktion af et givent produkt. Vil strategierne være afhængige af produktet?

11. En producent planlægger at producere et lægemiddel som et rekombinant protein i en stamme af gærsvampen *Pichia pastoris*. Producenten opnår en produktivitet på 2 g/(L·h) ved batchfermentering. Producenten vil producere 1.600 ton af produktet årligt. Antag, at der kan foretages sammenlagt 8.000 timers batchfermentering om året.

a. Hvad er den krævede kapacitet af fermenteringstanke (antal og volumen)?

Producenten vælger at investere sin profit i optimering af gærsvampens produktion af lægemidlet. Det viser sig at være særligt fordelagtigt at udskifte kulstof- og energikilden glukose med glycerol samt at optimere gærsvampens stofskifteprocesser for glycerol. Det lykkes nu producenten at opnå en produktivitet, som er 25% forbedret.

b. Hvad er nu den krævede kapacitet af fermenteringstanke (antal og volumen)? Er produktiviteten forbedret ved hjælp af (1) en procesændring, (2) en biologisk ændring eller (3) en kombination af procesændringer og biologiske ændringer? Forklar.

12. Nævn de vigtigste ligheder og forskelle mellem pro- og eukaryote celler. Overvej om valget af cellefabrik afhænger af det produkt, som man ønsker at producere ved ens fermentering.

13. Sammenlign definerede medier med komplekse medier, og nævn fordele og ulemper.

14. Forklar hvad der menes med, at fermenteringsprocessen som helhed kan inddeles i to delprocesser, dvs. upstream- og downstream-processing. Overvej om der er sammenhæng mellem delprocesserne.

15. Vælg det rigtige ord (*upstream* / *downstream*):

a. Medieforberedelse, sterilisering og podning er dele af _____-processing.

b. Produktoprensning og affaldshåndtering er dele af _____-processing.

c. Selve produktionen (dvs. fermenteringen) er en del af _____-processing.

16. Forklar hvorfor man vokser produktionsorganismen i en eller flere mindre podetanke, inden den overføres til den store fermenteringstank. Hvorfor pøder man ikke fermenteringstanken direkte med produktionsorganismen?

17. Beskriv ligheder og forskelle mellem oprensningstrinene for et intracellulært produkt og et extracellulært produkt.

18. Forklar hvorfor man for produktionen for et højværdi-produkt kan tillade (1) mindre udbytte og (2) større omkostninger end for produktionen af et lavværdi-produkt. Inddrag den følgende formel:

$$\text{pris}_{\text{produkt}} - \left(\frac{\text{pris}_{\text{substrat}}}{\text{udbytte}} \right) - \text{pris}_{\text{produktion}} = \text{profit}$$

19. Forklar hvorfor det er vigtigt, at der ikke sker kontaminering af fermenteringstanken.

- 20.** Lav en illustration af fermenteringstanken og dens udstyr. Beskriv hvilke(t) udstyr der bruges til måling af fermenteringsprocessen, og hvilke(t) udstyr der bruges til at udøve den tilhørende regulering af fermenteringsprocessen.
- 21.** Forklar formålet med en varmekappe. Bruges varmekappen til at opvarme eller nedkøle indholdet i fermenteringstanken?
- 22.** Udfyld felterne:
- a.** Opsætning af fermenteringstanken, hvor der både er et input og et output: _____
 - b.** Opsætning af fermenteringstanken, hvor der hverken er et input eller et output: _____
 - c.** Opsætning af fermenteringstanken, hvor der er et input men ikke et output: _____
- Beskriv fordele og ulemper ved de forskellige typer af opsætning af fermenteringstanken.
- 23.** Nævn et eller flere eksempler på de tre former for målinger, som man kan foretage i fermenteringstanken, dvs. *off*-line målinger, *at*-line målinger og *on*-line målinger.

Fermenteringsøvelse: fra batch til kontinuerlig fermentering

Du arbejder for en medicinalvirksomhed, der fremstiller medicin til behandling af bakterieinfektioner i mennesker. Virksomheden har anskaffet sig en særlig stamme af skimmelsvampen *Aspergillus oryzae*, som producerer et eftertragtet antibiotikum. Netop denne stamme har vist sig at være rigtigt dygtig til at fremstille og udskille det antibiotiske stof i vækstmediet i store mængder. Du har derfor fået til opgave at undersøge skimmelsvampens produktion af antibiotikum ved en fermentering.

Brug evt. det tilhørende dataark, hvor målingerne for fermenteringen er klar til databehandling og -analyse (se filen *Data-til-fermenteringsøvelse*).

Batchfermentering

Du beslutter dig for først at undersøge skimmelsvampens produktion af antibiotikum ved en batchfermentering. Du måler løbende biomasse-, substrat- og produktkoncentrationen i fermenteringstanken.

Tid (t)	Biomasse (g/L)	Glukose (g/L)	Antibiotikum (mg/L)
0	0,00	20,00	
5	0,00	20,00	
10	0,50	19,00	
13	1,00	18,00	
15	1,49	17,02	
17	2,23	15,55	
19	3,32	13,36	
21	4,95	10,09	
23	7,39	5,22	
24	8,50	3,00	
25	9,50	1,00	
27	9,70	0,60	1,00
29	10,20	0,00	3,50
32	9,80	0,00	6,00
35	9,20	0,00	8,50
38	9,10	0,00	11,00

1.1 Plot koncentrationerne af biomasse, glukose og antibiotikum som funktion af tiden. Sørg for, at substrat- og biomassekoncentrationen er plottet på den primære akse, og produktkoncentrationen er plottet på den sekundære akse.

1.2 Hvorfor stiger koncentrationen af biomasse først efter 10 timer – og ikke efter 0 timer?

Ved batchfermentering vil der være rigelige mængder af substrat i fermenteringstanken ved fermenteringens start. Derfor har produktionsorganismen mulighed for at gro ved sin maksimale væksthastighed.

1.3 Udregn logaritmen af biomassekoncentrationen, og plot den som funktion af tiden. En eksponentiel funktion har en ret linje som graf i et koordinatsystem, hvor x-aksen er almindelig, og y-aksen er logaritmisk. Plot kun de punkter, der indgår i den eksponentielle vækstfase.

1.4 Bestem vækstraten for *A. oryzae*. Der er to fremgangsmåder: enten (1) bestemmelse af μ i den eksponentielle funktion $N(t) = N_0 \cdot e^{\mu t}$ ud fra det normale plot, eller (2) bestemmelse af μ i den lineære funktion $\ln(N(t)) = \mu \cdot t + \ln(N_0)$ ud fra det logaritmiske plot. Enheden for vækstraten er $[h^{-1}]$.

Bestem efterfølgende fordoblingstiden for *A. oryzae* – vokser skimmelsvampen hurtigere eller langsommere end f.eks. bakterien *E. coli* eller gæren *S. cerevisiae*? Enheden for fordoblingstiden er $[h]$.

1.5 Hvorfor stopper koncentrationen af biomasse med at stige efter 30 timer?

1.6 Kan man ud fra grafen se, om produktet er en primær eller sekundær metabolit? Tænk over, om produktionsorganismen fremstiller produktet under den eksponentielle eller stationære vækstfase.

1.7 Plot biomassekoncentrationen som funktion af glukosekoncentrationen, og bestem hælningskoefficienten. Denne konstant er udbyttet af biomasse. *Der ses bort fra det negative fortegn*. Enheden for denne koefficient er $[g \text{ biomasse}/g \text{ glukose}]$. Hvad siger denne konstant om forholdet mellem biomasse og glukose?

Kontinuerlig fermentering

På baggrund af resultaterne beslutter du dig for at undersøge, om en kontinuerlig fermentering er bedre egnet til produktion af antibiotikum ved hjælp af skimmelsvampen. Du gentager det forrige eksperiment, men på et tidspunkt begynder du at pumpe friskt vækstmedium til tanken; samtidig begynder du at pumpe brugt fermenteringsvæske fra tanken med den samme rate. Dermed holdes volumen i fermenteringstanken konstant. Du sørger for at holde koncentrationen af det begrænsende substrat så minimalt som muligt.

Du måler igen løbende biomasse-, substrat- og produktkoncentrationen i fermenteringstanken.

Tid (t)	Biomasse (g/L)	Glukose (g/L)	Antibiotikum (mg/L)
0	0,00	20,00	
5	0,00	20,00	
10	0,50	19,00	
13	1,00	18,00	
15	1,49	17,02	
17	2,23	15,55	
19	3,32	13,36	
21	4,95	10,09	
23	7,39	5,22	
24	8,50	3,00	
25	9,50	1,00	
27	9,70	0,60	1,00

29	10,20	0,30	3,50
32	9,80	0,10	6,00
35	9,20	0,10	8,50
38	9,50	0,10	11,00
41	9,80	0,10	10,00
44	9,60	0,10	9,00
47	9,70	0,10	9,50
50	9,80	0,10	9,00
53	9,60	0,10	10,00
56	9,80	0,10	9,00
59	9,60	0,10	9,50
62	9,70	0,10	9,50
65	9,80	0,10	10,00
68	9,60	0,10	9,50
71	9,70	0,10	9,00
74	9,80	0,10	10,00
77	9,60	0,10	9,00
80	9,50	0,10	9,50
83	9,80	0,10	9,50
86	9,60	0,10	10,00

2.1 Lav et lignende plot som i spørgsmål 1.1, men nu med data af den kontinuerlige fermentering fremfor batchfermenteringen. Sørg igen for, at substrat- og biomassekoncentrationen er plottet på den primære akse, og produktkoncentrationen er plottet på den sekundære akse.

Fordi der både er et tilløb til og et afløb fra fermenteringstanken, kan der opnås steady state. Dette er en tilstand, hvor der hverken ophobes substrater, produkter eller biomasse i fermenteringstanken. Dermed er koncentrationerne af disse variable nogenlunde konstante.

2.2 Er der opnået steady state i fermenteringstanken?

En smart ting ved den kontinuerlige fermentering er, at man kan holde substratkoncentrationen ved et minimum. På denne måde fastholder man produktionsorganismen i den stationære fase.

2.3 Hvilken betydning har den lave koncentrationen af substratet (glukose) for produktiviteten af produktet (antibiotikum)?

2.4 Er batchfermentering eller kontinuerlig fermentering bedst egnet til at producere netop dette produkt? Nævn fordele og ulemper ved de to undersøgte former for opsætning af fermenteringstanken. Hvilken faktor gør kontinuerlig fermentering mere egnet end batchfermentering i dette tilfælde?

2.5 Perspektivering: hvordan kan bioteknologi hjælpe med at optimere produktionen?