

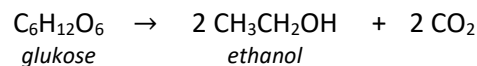
Forsøgsvejledning – Vækstbetingelser og fermentering med cellekulturer

Fermenteringsteknologi

Introduktion

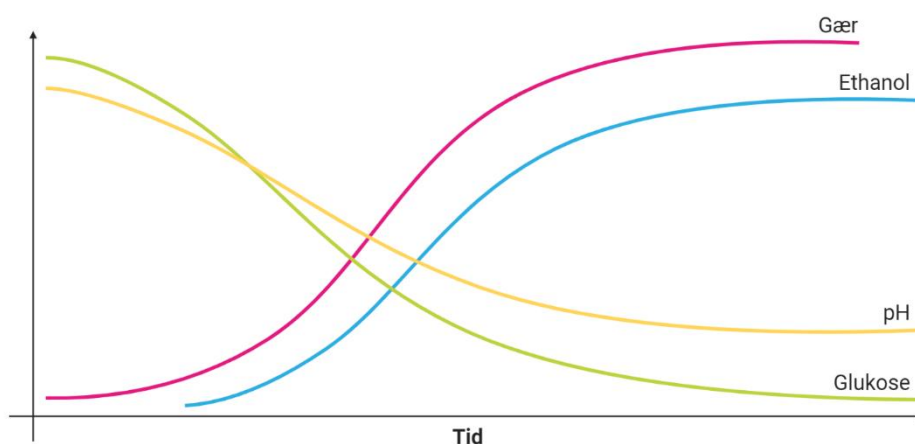
Almindeligt bagegær er en gærstamme, som bruges i bagning af brød. Dets videnskabelige navn er *Saccharomyces cerevisiae* ('sukkersvamp'), hvilket henviser til gærens særlige evne til at gro godt i sukkerholdige vækstmedier. Hastigheden for gærens stofomsætning er imponerende: en gær-celle kan på bare én time omsætte en mængde af glukose svarende til sin egen vægt.

Gæren *S. cerevisiae* kan leve og vokse med og uden ilt – dvs. aerobt og anaerobt. Hvis der ikke er ilt tilstede-værende, producerer gær energi ved gæring. Under disse omstændigheder omdanner gæren sukker (glukose) til alkohol (ethanol) og CO₂. Derfor betegnes gæringsprocessen også som *alkoholfermentering*. Gærens stofomsætning ved alkoholfermentering kan sammenfattes i det følgende reaktionskema:



Det er frigivelsen af CO₂, der gør bagværket let, luftigt og lækkert, når man bager brød med bagegær. Under den alkoholiske fermentering stiger indholdet af gær i vækstmediet. Samtidig falder sukkerkoncentrationen og pH, mens koncentrationen af alkohol stiger (se figur 1). Gær-celler formerer sig rigtigt hurtigt, og derfor er gær brugbar til at studere vækstfaktorer, som påvirker hastigheden for gær-cellernes vækst og omsætning af substrat til produkt. Væksten afhænger af flere forskellige vækstfaktorer, særligt **temperatur** og **pH**. Gæren *S. cerevisiae* har optimal vækst i temperaturområdet 25-35 °C og i pH-området 4-6.

Formålet med dette forsøg er at opstille en fermentering, hvor substrater fra et vækstmedie konverteres til energi, biomasse og produkter ved hjælp af levende og voksende gær-celler. Til dette bruges der et YPD-medium, som er et almindeligt vækstmedium til dyrkning af gær (indeholdende 10 g/L gærekstrakt, 20 g/L peptone og 20 g/L glukose). Derudover undersøges det, om gær-cellernes produktivitet er påvirket af vækstmediets temperatur og pH-værdi. Der bruges tre forskellige temperaturer og tre forskellige pH-værdier, hvilket samlet giver ni forskellige forsøgsopstillinger (se tabel 1).



Figur 1. Alkoholfermentering. Gær omsætter substrat (glukose) til produkt (ethanol og CO₂) under anaerobe forhold. Samtidig producerer gær-cellerne biomasse (flere gær-celler).

Materialer

- 1 × 1000 mL BlueCap flaske
- 3 × 250 mL BlueCap flasker
- 9 × 50 mL Luer Lock Syringe + Luer Lock Tip Cap
- Gærekstrakt (vitaminer + mineraler til gær)
- Peptone (nitrogenkilde til gær)
- Glukose (carbon- og energikilde til gær)
- Demineraliseret vand
- 2 M saltsyre (HCl)
- 2 M natriumhydroxid (NaOH)
- Varmeplade
- Magnetomrører + magneter
- 1 mL pipette + pipettespidser
- Glukose-strips / glukose-meter
- pH-strips / pH-meter
- 5 °C køleskab
- 30 °C varmeskab
- Starterkultur af *S. cerevisiae*

Tabel 1. Oversigt over de ni forskellige prøver i forsøget og deres tilhørende forsøgsbetingelser.

Prøve nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Temperatur (°C)	5 (køleskab)	5 (køleskab)	5 (køleskab)	20	20	20	30 (varmeskab)	30 (varmeskab)	30 (varmeskab)
Surhedsgrad (pH)	2	5	8	2	5	8	2	5	8

Fremgangsmåde

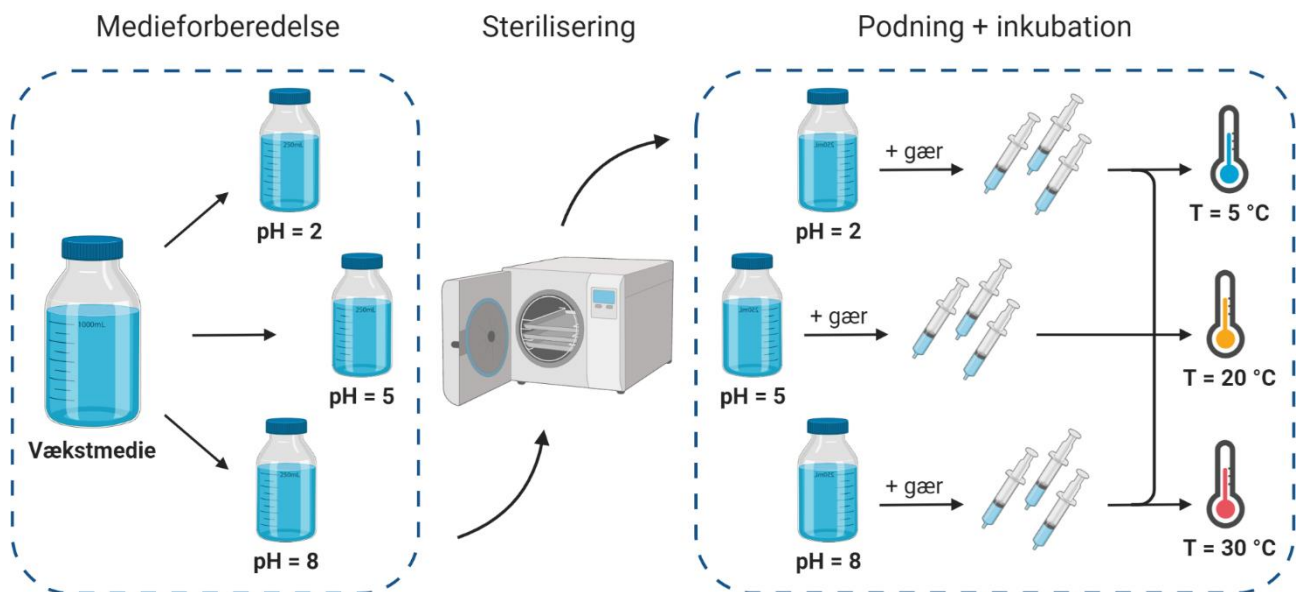
Dagen inden forsøget podes YPD-medium i en konisk kolbe med *S. cerevisiae*. Kolben stilles i et 30 °C vandbad med rystning. Gærcellerne vokser over natten, og dagen efter har man en starterkultur af *S. cerevisiae*.

Forsøgsdag 1: Medieforberedelse, sterilisering og podning (~ 3½ time)

1. Bland 500 mL YPD-medium ved tilsætning af 5 g gærekstrakt, 10 g peptone og 10 g glukose til en 1 L BlueCap-flaske. Der tilsættes demineraliseret vand, indtil blandingen har et volumen på 500 mL.
2. Det kan være nødvendigt at opvarme vækstmediet for at opløse stofferne ordentligt i opløsningen. For at gøre dette, stilles YPD-mediet på en varmeplade, hvor vækstmediet stille og roligt opvarmes.
3. Mærk de tre 250 mL BlueCap-flasker med hver deres pH-værdi jf. *tabel 1*. Efterfølgende overføres der 150 mL YPD-medium til de tre 250 mL BlueCap-flasker.
4. På skift stilles de tre 250 mL BlueCap-flasker på en magnetomrører, hvor der omrøres i vækstmedierne vha. en magnet. Indstil pH i YPD-medierne ved tilsætning af syre (HCl) og/eller base (NaOH).

OBS! Husk sikkerhedsbriller og -handsker. HCl og NaOH er ætsende væsker, som er irriterende for øjne og hud. Læs forholdsregler og førstehjælpsforanstaltninger grundigt inden der arbejdes med væskerne.

5. Steriliser YPD-medierne i de tre 250 mL BlueCap-flasker vha. autoklavering med et overtryk på 1 atm., dvs. 121 °C i 20 minutter. Lad efterfølgende de opvarmede opløsninger nedkøle til rumtemperatur.



Figur 1. Flowdiagram over forsøget.

6. Pod YPD-medierne i de tre 250 mL BlueCap-flasker med 1 mL *S. cerevisiae*-starterkultur vha. 1 mL pipetten og de tilhørende pipettespidser. Bland vækstmedierne grundigt.
7. Mærk de ni 50 mL sprøjter med hver deres temperatur og pH jf. *tabel 1*. Efterfølgende opsuges der 20 mL vækstmedie med gærceller i de tilhørende sprøjter. Der skal ikke opsuges luft i sprøjterne!
8. Inkubér sprøjterne i 1-2 dage – hhv. i køleskab, ved rumtemperatur og i varmeskab.
9. Der er stadig en rest YPD-medium tilbage i hver af de tre 250 mL BlueCap-flasker, hvorfra der foretages målinger af cellekulturerne:
 - Mål glukosekoncentration vha. glukose-strips / glukose-meteret.
 - Mål pH-værdi vha. pH-strips / pH-meteret.

Notér data i *tabel 2* for målinger inden inkubation.

Forsøgsdag 2: lagttagelser og resultater (~ ½ time)

1. Udtag sprøjterne fra hhv. køleskabet og varmeskabet, og lad dem opvarme/nedkøle til rumtemperatur, for at vækstmediet i alle sprøjterne har den samme temperatur.
2. Bestem efterfølgende volumen af gas i sprøjterne. Noter data i *skema 3*.
3. Foretag igen målinger af cellekulturerne:
 - Mål glukosekoncentration vha. glukose-strips / glukose-meteret.
 - Mål pH-værdi vha. pH-strips / pH-meteret.

Noter data i *tabel 3* for målinger efter inkubation. Overvej, om cellekulturerne lugter af ethanol. Dvs. er der en alkoholisk lugt? Det kan være, at der er nogle cellekulturer, der lugter mere af ethanol end andre.

Tabel 2. Data for målinger inden inkubation.

Prøve nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glukose (g/L)									
Surhedsgrad (pH)									
Gasvolumen (mL)									

Tabel 3. Data for målinger efter inkubation.

Prøve nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glukose (g/L)									
Surhedsgrad (pH)									
Gasvolumen (mL)									

Spørgsmål

1. Har gærcellerne forbrugt glukose i alle sprøjterne? Har gærcellerne fremstillet CO₂ i alle sprøjterne? Hvorfor/hvorfor ikke?
2. I forsøget er temperatur konstant under fermenteringen, men pH ændrer sig lidt – stiger eller falder pH i sprøjterne? Hvad kan man tilsætte til mediet for at holde pH konstant under fermenteringsprocessen?
3. Beregn massen af glukose i sprøjterne inden fermenteringsprocessen. Beregn efterfølgende stofmængden af glukose i sprøjterne – brug molarmassen af glukose (180,2 g/mol).

Faktaboks: den molare volumen

Volumen af en vis stofmængde gas er påvirket af både temperatur og tryk. Den molare volumen er et mål for volumen af 1 mol gas. Næsten alle gasser har samme volumen, hvis de har samme stofmængde, temperatur og tryk. Dvs. 1 mol af en slags gas fylder det samme som 1 mol af alle andre gasser – bare at deres volumen er målt ved samme temperatur og tryk.

Ved en temperatur på 20 °C og et tryk på 1 atm er den molare volumen af 1 mol gas er lig med 24,1 L/mol.

$$V = n \cdot V_m \rightarrow n = \frac{V}{V_m},$$

hvor V er volumen ([L]), n er stofmængde ([mol]) og V_m er den molare volumen ([L/mol]).

4. Beregn stofmængden af CO₂ i sprøjterne efter fermenteringsprocessen (se faktaboksen om den molare volumen). Beregn efterfølgende massen af CO₂ i sprøjterne – brug molarmassen af CO₂ (44,0 g/mol).
5. Bestem udbyttet af CO₂ i alle sprøjterne som [g/g] (gram CO₂ pr. gram glukose). Beregn efterfølgende udbyttet af CO₂ i alle sprøjterne som [mol/mol] (mol CO₂ pr. mol glukose).
6. Sammenlign udbyttet af CO₂ i alle sprøjterne: hvor er udbyttet størst, og hvor er det mindst? Stemmer det overens med, at gær har optimal vækst (og produktivitet) ved temperatur 25-35 °C og pH 4-6?
7. Sammenlign nu sprøjterne med en rigtig fermenteringstank. Hvorfor er det vigtigt, at fermenteringstanken er forsynet med udstyr, der gør, at den kan regulere temperatur og pH gennem fermenteringsprocessen? Husk, at gærens livs- og stofskifteprocesser frigiver varme og syrer.
8. Fermenteringerne i denne øvelse er foretaget i laboratorieskala. Forestil dig, at du nu skal foretage fermenteringerne i produktionsskala. Hvad er udfordringerne ved opskalering af forsøget? Dvs. hvordan er arbejdsgangen med materialerne og metoderne anderledes?

Ekstra spørgsmål

Ved alkoholfermentering omdanner gæren glukose til ethanol og CO₂. Derfor kan mængden af fremstillet CO₂ bruges som et mål for gærens produktion af ethanol. Vi vil i det følgende beregne afvigelsen mellem teoretiske og observerede værdier for gærens produktivitet ved alkoholfermentering.

9. Beregn den teoretisk maksimale stofmængde af fremstillet ethanol, $n(\text{ethanol})_{\text{teoretisk}}$. For at gøre dette bestemmes x vha. reaktionsskemaet for omdannelsen af glukose til ethanol og CO₂ (x = mol fremstillet ethanol pr. mol forbrugt glukose).

$$n(\text{ethanol})_{\text{teoretisk}} = x \cdot n(\text{glukose})$$

Beregn den teoretisk maksimale masse af fremstillet ethanol, $m(\text{ethanol})_{\text{teoretisk}}$ – brug molarmassen af ethanol (46,1 g/mol).

10. Beregn den observerede stofmængde af fremstillet ethanol, $n(\text{ethanol})_{\text{observeret}}$. For at gøre dette bestemmes y vha. reaktionsskemaet for omdannelsen af glukose til ethanol og CO₂ (y = mol fremstillet ethanol pr. mol fremstillet CO₂).

$$n(\text{ethanol})_{\text{observeret}} = y \cdot n(\text{CO}_2)$$

Beregn efterfølgende den observerede masse af fremstillet ethanol, $m(\text{ethanol})_{\text{observeret}}$.

11. Stemmer den observerede data for gærens produktion af ethanol overens med den forventede data? Dvs. bliver alt carbon- og energikilde brugt på at producere ethanol, eller bliver substratet spildt på at producere andre produkter af gæren? Hvorfor/hvorfor ikke? Beregn den procentvise afvigelse.

$$\text{afvigelse}(\%) = \frac{m(\text{ethanol})_{\text{observeret}}}{m(\text{ethanol})_{\text{teoretisk}} + m(\text{ethanol})_{\text{observeret}}} \cdot 100\%$$