

## 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  $\mu$  i den eksponentielle funktion  $N(t) = N_0 \cdot e^{\mu t}$  ud fra det normale plot, eller (2) bestemmelse af  $\mu$  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?