

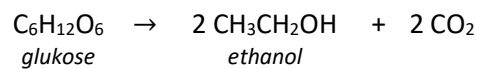
## Forsøgsvejledning – Cellevækst og fermentering med cellekulturer

# Fermenteringsteknologi

### Introduktion

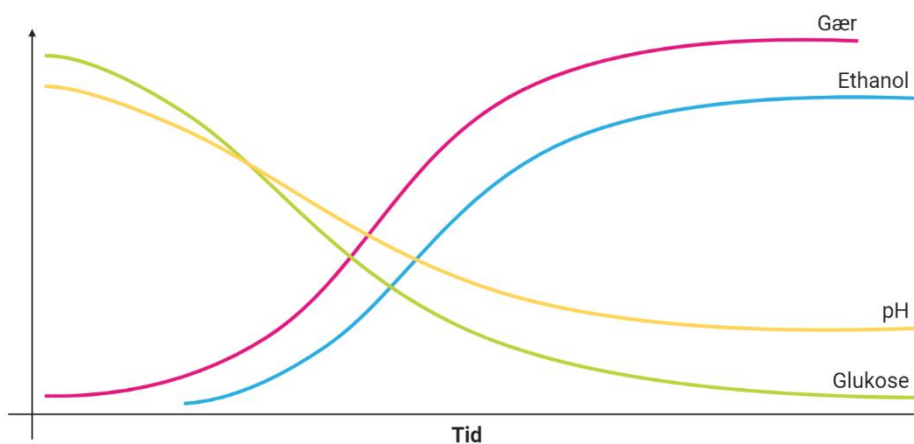
Almindeligt bagegær er en gærstamme, som bruges i bagning af brød. Dets videnskabelige navn er *Saccharomyces cerevisiae* ('sukkersvamp'), hvilket henviser til gærens særlige evne til at gro godt i sukkerholdige vækstmedier. Hastigheden for gærens stofomsætning er imponerende: en gær-celle kan på bare 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 CO<sub>2</sub>. Derfor betegnes gæringsprocessen også som *alkoholfermentering*. Gærens stofomsætning ved alkoholfermentering kan sammenfattes i det følgende reaktionskema:



Det er frigivelsen af CO<sub>2</sub>, 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-værdi**. 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/L g 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 CO<sub>2</sub>) 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
- Glukose-meter / glukose-strips
- pH-meter / pH-strips
- Spektrofotometer + kuvetter
- 5 °C køleskab
- 30 °C varmeskab
- Starterkultur af *S. cerevisiae*

**Tabel 1.** Oversigt over de ni forskellige prøver i forsøget.

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)	3	5	7	3	5	7	3	5	7

## Sikkerhed

Brug beskyttelsesbriller og laboratoriekittel.

Øvelsen inkluderer brugen af basen NaOH og syren HCl. NaOH og HCl er ætsende for huden og skadelige for øjnene. I tilfælde af kontakt med huden af NaOH og HCl, skyl straks med vand i flere minutter.

Ætningsskader skal behandles af læge. I tilfælde af kontakt med øjnene, skyl straks med vand i mindst 15 minutter (fjern eventuelle kontaktlinser) og kontakt Giftlinjen på 82121212. Hvis tvivl, ring til Giftlinjen.

Hvis glasmateriale går i stykker, skal du være varsom for glaskår.

## 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)

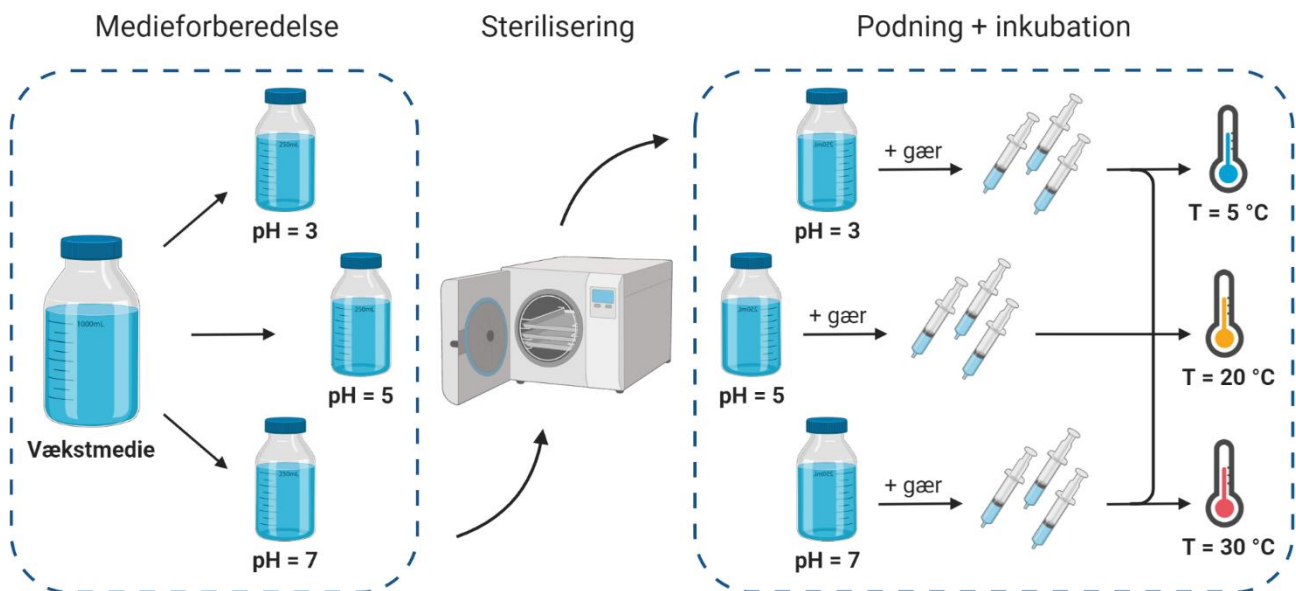
1. Bland 500 mL YPD-medium ved tilsætning af 5 g gærekstrakt, 10 g peptone og 10 g glukose til en 1 L BlueCap-flaske. Der tilsættes demineraliseret vand, indtil blandingen har et volumen på 500 mL.
2. Det kan være nødvendigt at opvarme vækstmediet for at opløse stofferne ordentligt i opløsningen. For at gøre dette, stilles YPD-mediet på en varmeplade, hvor blandingen 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 forskningsregler 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 de tre YPD-medier med 1 mL *S. cerevisiae*-starterkultur, og bland vækstmedierne grundigt.

7. Mærk de ni 50 mL sprøjter med hver deres temperatur og pH-værdi jf. *tabel 1*. Efterfølgende opsuges der 30 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. glukometeret.
- Mål pH-værdi vha. pH-meteret.
- Mål cellekoncentration vha. spektrofotometeret.

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 cellekulturene:
  - Mål glukosekoncentration vha. glukometeret.
  - Mål pH-værdi vha. pH-meteret.
  - Mål cellekoncentration vha. spektrofotometeret.

Noter data i *tabel 3* for målinger efter inkubation. Overvej, om cellekulturene 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 (mM)									
Surhedsgrad (pH)									
Gasvolumen (mL)									
Absorbans (OD <sub>600</sub> )									

**Tabel 3.** Data for målinger efter inkubation.

Prøve nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glukose (mM)									
Surhedsgrad (pH)									
Gasvolumen (mL)									
Absorbans (OD <sub>600</sub> )									

## Spørgsmål

1. Gær optager glukose ved alkoholfermentering. Derfor kan mængden af forbrugt glukose bruges som et mål for gærens produktion af ethanol. Beregn stofmængden af forbrugt glukose.

$$n(\text{glukose}) = (c(\text{glukose})_{\text{inden}} - c(\text{glukose})_{\text{efter}}) \cdot V_{\text{væske}}$$

2. Beregn den teoretiske stofmængde af fremstillet ethanol. Til dette bestemmes  $x$  vha. reaktionskemaet for omdannelsen af glukose til ethanol og  $\text{CO}_2$  ( $x$  = mol fremstillet ethanol pr. mol forbrugt glukose).

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

3. Gær frigiver  $\text{CO}_2$  ved alkoholfermentering. Derfor kan mængden af fremstillet  $\text{CO}_2$  bruges som et mål for gærens produktion af ethanol. Beregn stofmængden af fremstillet  $\text{CO}_2$  vha. formelen for molar volumen (se evt. faktaboksen).

$$n(\text{CO}_2) = V_{\text{gas}}/V_m$$

4. Beregn den observerede stofmængde af fremstillet ethanol. Til dette bestemmes  $y$  vha. reaktionskemaet for omdannelsen af glukose til ethanol og  $\text{CO}_2$  ( $y$  = mol fremstillet ethanol pr. mol fremstillet  $\text{CO}_2$ ).

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

5. 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.

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

6. Plot den observerede og forventede stofmængde ethanol sammen med cellekoncentration for de ni forskellige forsøgsbetingelser. Overvej, hvordan data præsenteres bedst – f.eks. med et søjlediagram. Stemmer det overens med, at gær har optimal vækst 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-værdi 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?

### Faktaboks: den molare volumen

Volumen af en vis stofmængde gas er påvirket af både temperatur og tryk. Den molare volumen er et mål for volumenet af 1 mol gas. Næsten alle gasser har samme volumen, hvis de har samme stofmængde, temperatur og tryk. Dvs. at 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]).