

Praktikum LM-Biotechnologie

Laborkurs Lebensmittelwissenschaften

Fensterle, Lucassen

Aerobe Kultur von Hefe im Kleinfermenter

1. Generelle Zielsetzung

Ziel ist die Planung, Durchführung und Analyse einer aeroben Kultivierung von Hefe im Fermenter und die Analyse von Produktbildungsraten, Substratverbrauchsraten und Wachstumsraten. Die Experimente werden mit unterschiedlichen Glucose Konzentrationen durchgeführt.

2. Voraussetzungen

Sie sollten diese Kurzanleitung des Experiments gelesen haben.

Es wird erwartet das sie mithilfe dieser Anleitung selbstständig einen Plan für das Experiment ausarbeiten (Probenahmezeiten, Probenvolumen, Medienzusammensetzung ...).

Berücksichtigen Sie das Dokument zu den mikrobiologischen Methoden.

3. Anforderungen an das Protokoll

Eine Protokollvorlage finden sie auf Moodle, bitte halten sie sich an die vorgegebene Form.

Die folgenden Punkte müssen enthalten sein:

- 1.) Grafische Darstellung der gemessenen Gesamt-, Lebendzellzahlen und Biomasse vs. Zeit
- 2.) Berechnung der maximalen Teilungsrate und Verdoppelungszeit auf Basis der Lebendzellzahlen.

4. Planung

4.1. Tag 1

- Agarplatten wurden bereits beim Versuch anaeroben Fermentation hergestellt
- Vorbereiten der Lösungen
- Vorbereitung und Sterilisation der Bioreaktoren und des Zubehörs

4.2. Tag 2

- Glucose, Wasser und Inokulum dem Reaktormedium steril zupumpen.
- Probenahme $t=0$.
- Kulturdauer nach Vorgabe der Betreuer
- Probenahme und Analytik in regelmäßigen Abständen laut Tabelle.

- OD 600 und Gesamtzellzahl (t=0; dann halbstündlich)
- Lebendzellzahl (t=0; dann stündlich) und Trockenmasse (t=0 und letzte Probennahme)
- Ethanol (erste Probenahme nach 2h dann stündlich)
- Glucose (t=0 dann halbstündlich bis Wert = 0)

4.3. Versuchsaufbau für die Sterilisation (Tag1)

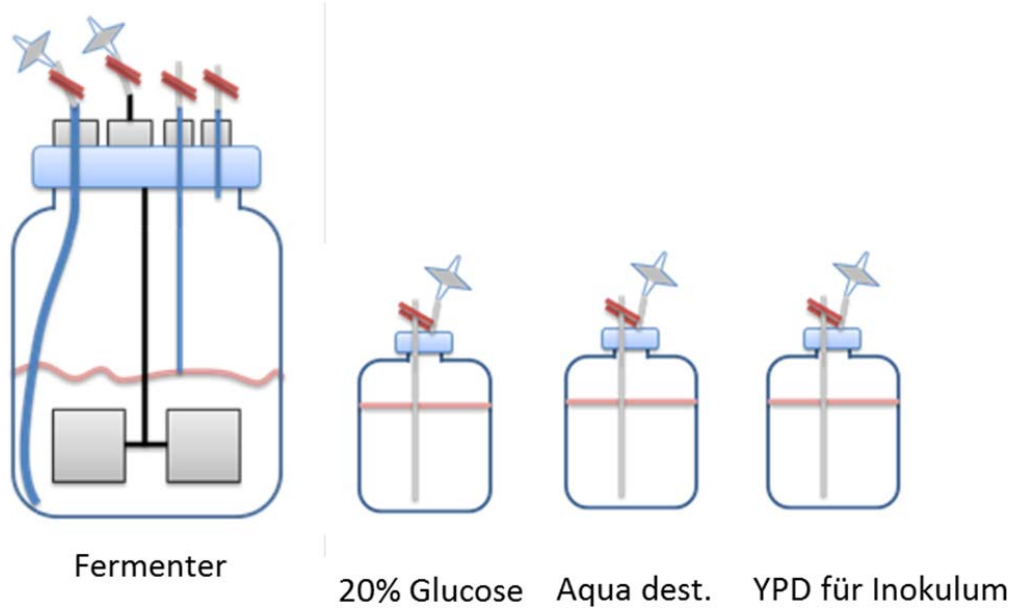


Abbildung 1: Aufbau des Fermenter für die Sterilisation. Die Schlauchzuführung kann optional am Fermenter angeschlossen sein. Alle offenen Schlauchenden sind mit Alu-Folie zu umwickeln.

4.4. Versuchsaufbau (Tag 2)

Die aerobe Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgt in 1000 mL Glasfermentern (Aufbau, Sterilisation - siehe [Abbildung 1](#) und [Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. Abbildung 2](#)):

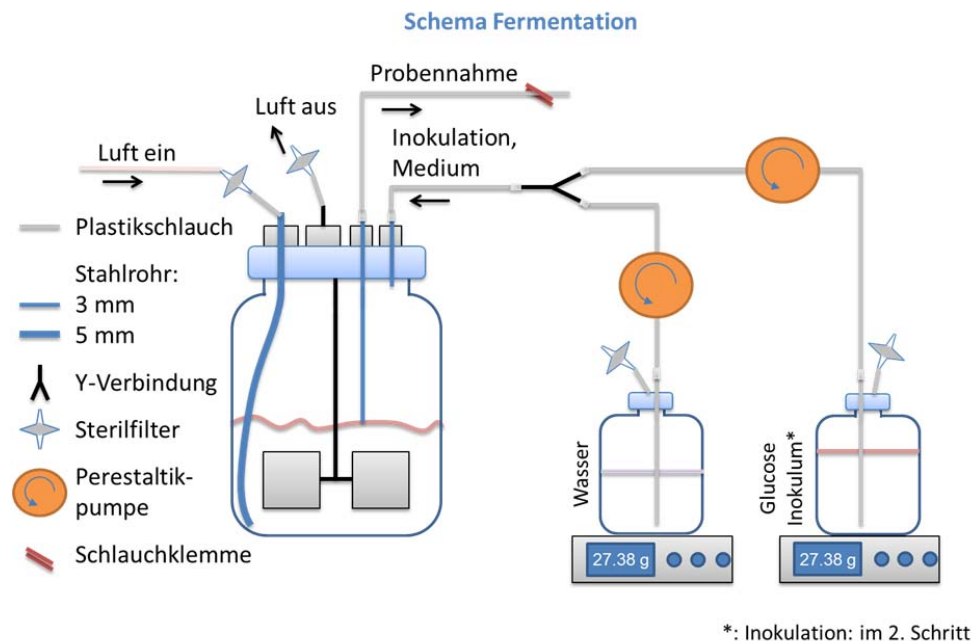


Abbildung 2: Aufbau des Fermenter für die Fermentation

4.5. Vorbereiten der Fermentation

Vor Beginn der Fermentation wird Wasser und Glucose aseptisch dem YPD Medium zugefügt. Das Zufügen erfolgt hierbei durch pumpen.

Jede Fermentation wird mit einem Gesamtvolumen von 500 mL ausgeführt:

$400 \text{ mL YPD Medium} + X \text{ mL Glucose} + Y \text{ mL Wasser} = 500 \text{ mL Gesamtvolumen}$

4.5.1. Einstellung der Glucose Konzentrationen im Reaktor

Jede Gruppe verwendet eine andere Konzentration. Die benötigten Volumenmengen an Glucoselösung (X) müssen vorher berechnet werden. Folgende Mengen (g Glucose!) werden benötigt:

0.3 g, 0.6 g, 1.2 g, 2.5 g, 5.0 g, 10 g (für Gruppe 1, 2, 3, 4, 5, 6 respektive)

4.6. Inokulation

Das Medium wird mit Zellen aus einer Übernachtskultur inokuliert. Die Zielkonzentration im Bioreaktor beträgt (falls nicht durch die Betreuer anders angekündigt) 5×10^6 Zellen / mL.

4.7. Probenahme

Zu jedem vorgegebenen Zeitpunkt soll gerade so viel Fermentationsbrühe gezogen werden, wie für die Analytik zum jeweiligen Zeitpunkt nötig ist.

- Probenahme und Analytik in regelmäßigen Abständen laut Tabelle.
 - OD 600 und Gesamtzellzahl (t=0; dann halbstündlich)
 - Lebendzellzahl (t=0; dann stündlich) und Trockenmasse (t=0 und letzte Probennahme)
 - Ethanol (erste Probenahme nach 2h dann stündlich)
 - Glucose (t=0 dann halbstündlich bis Wert = 0)

5. Aerobe Fermentation

Ziel ist:

- Bestimmung der Biomasse- und Gesamtzellbildungsraten und der jeweils maximalen Bildungsraten
- Bestimmung der Produktbildungsraten
- Berechnung der molaren Ausbeute für Biomasse (Endpunktbestimmung)

Arbeitsanweisungen für den ersten Labortag (Tab.1-6)

Tabelle 1: YPD Fermentationsmedium (soll von jeder Gruppe durchgeführt werden).

YPD Fermentermedium <ul style="list-style-type: none"> • Trypton (2% w/v) • Hefe Extrakt (1% w/v) • Glucose Konzentration (variabel) (wird erst am 2 Tag eingestellt) Bitte beachten: Die Mengen an Trypton + Hefe Extrakt auf 500 mL berechnen (Mediumvolumen beträgt aber nur 400 mL).		Datum:	
		Bearbeiter (Name)	Kürzel
Zusammensetzung	Berechnete Menge (g) für 500 mL	Tatsächlich eingewogen (g)	Kürzel
Trypton			
Hefe Extrakt			
Demineralisiertem Wasser	400 g		
Medium direkt im Fermenter ansetzen (1000 mL Reaktorgefäß). Zum Einfüllen der Nährmedien und des Wassers bitte den Pulvertrichter benutzen.			
Aufschrauben des Deckels (Justierung des Rührstabes und des Proberohres).			
Schläuche und Sterilfilter anbringen. Alle Sterilfilter und Schlauchenden mit Alufolie umwickeln.			
Schläuche abklemmen. Autoklavierband auf den Fermenter aufkleben und darauf den Fermenter beschriften.			
Fermenter im Autoklaven bei 121°C für 20 min sterilisieren.			

Tabelle 2: Glukoselösung (soll nur von einer Gruppe durchgeführt werden)

Glucoselösung • Glucose (20% w/v)		Datum:	
		Bearbeiter (Name)	Kürzel
Zusammensetzung	Berechnete (g) für 1000 mL	Tatsächlich eingewogen (g)	Kürzel
Glucose			
Glucose auf 1000 mL mit demineralisiertem Wasser einstellen			
Schraubverschluss mit Probeentnahmerohr und Sterilfilter anbringen. Schläuche abklemmen. Alle Sterilfilter und Schlauchenden mit Alufolie umwickeln.			
Flasche im Autoklav bei 121°C für 20 min sterilisieren.			

Tabelle 3: Steriles Wasser (soll nur von einer Gruppe durchgeführt werden)

Wasser (steril)	Datum:	
	Bearbeiter (Name)	Kürzel
2x ~1000 mL demineralisiertes Wasser in je eine 1L Duran Flaschen zufügen. Schraubverschluss mit Probeentnahmerohr und Sterilfilter anbringen. Schläuche abklemmen. Alle Sterilfilter und Schlauchenden mit Alufolie umwickeln.		
Beide Flaschen im Autoklaven bei 121°C für 20 min sterilisieren.		

Tabelle 4: YPD Medium für OD Messung (soll von einer Gruppe durchgeführt werden)

YPD Medium (100%) (als Blanklösung für OD Messungen)		Datum:	
		Bearbeiter (Name)	Kürzel
Zusammensetzung	Berechnete Menge (g) für 1000 mL	Tatsächlich eingewogen (g)	Kürzel
Trypton (2% w/v)			
Hefe Extrakt (1% w/v)			
Demineralisiertes Wasser			
Alle Substanzen in 80 mL demineralisiertem Wasser auflösen und Volumen auf 100 mL einstellen.			
Flasche im Autoklaven bei 121°C für 20 min sterilisieren.			

Tabelle 5: PBS - Isotonisches Verdünnungsmittel (soll nur von einer Gruppe durchgeführt werden)

PBS Medium		Datum:	
		Bearbeiter (Name)	Kürzel
Zusammensetzung	Benötigte Menge für 1000 mL	Kürzel	
Phosphate Buffered Saline (PBS) Fertigtabletten			
Demineralisiertes Wasser			
Phosphate Buffered Saline (PBS) Fertigtabletten werden gemäß den Herstellerangaben in demineralisiertem Wasser aufgelöst.			
Flasche im Autoklaven bei 121°C für 20 min sterilisieren.			

Tabelle 6: YPD Medium für die Anzucht von *S. cerevisiae* (soll nur von einer Gruppe durchgeführt werden)

YPD Medium 100% (für Inokulum) <ul style="list-style-type: none"> • 2% (w/v) Trypton • 1% (w/v) Hefe Extrakt 		Datum:	
		Bearbeiter (Name)	Kürzel
Zusammensetzung	Berechnete Menge (mg) für 500 mL	Tatsächlich eingewogen (g)	Kürzel
Trypton			
Hefe Extrakt			
Medium auf 500 mL mit demineralisiertem Wasser einstellen und je 250 mL in zwei 500 mL Erlenmeyerkolben geben. Erlenmeyerkolben bitte mit Metallkappen verschließen. Beide Kolben im Autoklav bei 121°C für 20 min sterilisieren.			

Arbeitsanweisungen für den zweiten Labortag (Tab.7 bis 9)

Tabelle 7: Ansetzen der *S. cerevisiae* Starterkultur (soll nur von einer Gruppe am Vortag durchgeführt werden)

<i>S. cerevisiae</i> Starterkultur					
Als Inokula werden Working-Lots (bei -80°C eingefrorene Hefezellen) verwendet. Hierbei aseptisch 200 µl der Inokula per Schüttelkolben zugeben. Alle Inokula müssen am Vortag bei 30°C (~300 rpm) beimpft und über Nacht am Vortag angezogen werden.					
Folgende Parameter des Inokulum sollen zum Zeitpunkt des Transfers gemessen werden:					
Zeitpunkt Transfer:		Zellzahl (cells/mL)		OD600	
Datum Transfer:					

Nach erfolgreicher Inkubation je 250 mL Hefesuspension in die sterilisierte Inokulumflasche (s. Abb. 1) **aseptisch** überführen!

Tabelle 8: Fermenter set-up (soll von jeder Gruppe durchgeführt werden)

Fermentation (Vorbereitung)		Datum:	
		Bearbeiter (Name)	Kürzel
Einstellung der Glucosekonzentration des YPD Medium			
Vorratsbehälter der Glucoselösung (20%) und Wasser aseptisch mit dem Fermenter verbinden. Zuerst die berechnete Glukosemenge durch Pumpen einbringen. Danach die Restmenge an Wasser zupumpen damit ein Volumen im Reaktor von 500 mL erreicht ist.			
Zusammensetzung	Benötigte Menge (mL)	Pumpzeit (sec)	Kürzel
Glucose (___% w/v)			
demineralisiertes Wasser			
Nach Zugabe der beiden Lösungen wird der Schlauch abgeklemmt und die metallene Schlauchkupplung mit steriler Alufolie umwickelt.			

Tabelle 9: Durchführung der Fermentation

Fermentation (Durchführung)		Datum:					
		Bearbeiter (Name)		Kürzel			
Inokulation des Fermenters							
<p>Die Zielzellzahl im Fermenter (falls nicht anders kommuniziert) beträgt 5×10^6 Zellen/mL. Die entsprechende Menge an Hefestarterkultur wird in den Fermenter aseptisch gepumpt (bitte Klemme am Verbindungsschlauch lösen). Nach Zugabe der Starterkultur wird der Verbindungsschlauch wieder abgeklemmt. Der Reaktor wird nun in das 30°C warme Wasserbad gestellt und mit Luft begast (1 vvm). Der Anschluss des Reaktors soll zügig vonstattengehen, dasselbe gilt für die Probenahme t_0.</p>							
Zusammensetzung	Menge (mL)	Pumpzeit (sec)	Kürzel				
Starterkultur							
Probenahme							
t	Probenahme (hr:min)	Ethanol	Glucose	Trocken masse	OD 600	Lebend zellzahl	Gesamt zellzahl
0			X	X	X	X	X
0.5			X		X		X
1			X		X	X	X
1,5			X		X		X
2		X	X		X	X	X
2,5			X		X		X
3h		X	X		X	X	X
Ende		X	X	X	X	X	X