

Praktikum LM-Biotechnologie

Laborkurs Lebensmittelwissenschaften

Fensterle, Lucassen

homo- / heterofermentative Milchsäuregärung

1. Generelle Zielsetzung

Ziel ist die Planung, Durchführung und Bilanzierung einer homo- bzw. heterofermentativen Milchsäuregärung mit *Lactococcus lactis* bzw. *Leuconostoc mesenteroides*. Die Parameter Lactat, CO₂, EtOH, Acetat, Gesamtgas, Zellzahl, Biomasse und OD werden zu Anfang und am Endpunkt der Fermentation bestimmt und eine Bilanzierung erstellt. Die Experimente werden mit drei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen durchgeführt.

2. Voraussetzungen

Sie sollten diese Kurzanleitung gelesen haben.

Es wird erwartet, dass sie mithilfe dieser Anleitung selbstständig einen Plan für das Experiment ausarbeiten (Probenahme Zeiten, Probenvolumen, Medienzusammensetzung...). Berücksichtigen sie das Dokument zu den *mikrobiologischen Methoden*.

3. Herstellung der Nährmedien (Tag 1)

Es müssen Flüssigmedien für die Fermentation und die Analytik hergestellt werden. Die Herstellung der Flüssig- und Festmedien erfolgt am ersten Labortag.

Die genaue Anleitung hierzu ist in den Tabellen am Ende dieses Skriptes zu finden!

4. Fermenter (Tag 2)

4.1. Vorbereiten der Fermenter

Für die Fermentation werden BlueSens Fermenter mit 2 großen Schraubgewinden (GL 45) verwendet.

Achtung: auf den großen Schraubgewinden angebrachte (blaue) Kappen oder Gassensoren müssen zwingend mit Dichtungsringen versehen werden, andernfalls sind die Gefäße nicht gasdicht!

Jede Fermentation wird mit einem Gesamtvolumen von 500 mL durchgeführt:

$400 \text{ mL MRS-Medium} + X \text{ mL Zucker} + Y \text{ mL Wasser} = 500 \text{ mL}$
--

4.1.1. C-Quellen Anfangskonzentration einstellen

Jede Gruppe verwendet eine andere Konzentration, folgende Mengen an Glucose, Sucrose oder Xylose sollen eingestellt werden:

Stamm	<i>Lactococcus lactis</i>			<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
Gruppe (=Fermenter)	1	2	3	4	5	6
Glucose (g) pro Fermenter	10			10		
Sucrose (g) pro Fermenter		10			10	
Xylose (g) pro Fermenter			10			10

Die benötigten Volumen (in mL), basierend auf einer 20% Stammlösung, müssen vorher berechnet und aseptisch dem Reaktorgefäß zugepumpt werden.

4.1.2. Reaktorvolumen einstellen

Nachdem die Zuckerlösung dem Medium zugeführt wurde, soll das Volumen auf 500 mL betragen.

4.1.3. Inokulation

Die Fermentation wird mit 50 mL einer *Lactococcus lactis* bzw. *Leuconostoc mesenteroides* Vorkultur beimpft. Für das Inokulum soll vorher die Gesamtzellzahl bestimmt werden.

4.2. Probenname

Zu jedem vorgegebenen Zeitpunkt (siehe Tabelle am Ende dieses Skriptes) sollen 5 mL der Fermentationsbrühe gezogen werden.

5. Erforderliche Inhalte des Protokolls

Bitte verwenden sie die Protokollvorlage auf Moodle und halten sie sich an die vorgegebene Form.

Das Protokoll muss folgendes enthalten:

- 1.) Kurze Einführung (1-2 Sätze)
- 2.) Berechnung der molaren Ausbeute von CO₂, EtOH, Lactat, Acetat (mol / mol Glucose/Xylose/Sucrose) und Biomasse (g / mol Glucose/Xylose/Sucrose)
- 3.) Optional: Aufstellung der stöchiometrischen Summengleichung anhand der gebildeten Gesamtmassen.

6. Versuchsablauf

Arbeitsanweisungen für den ersten Labortag

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

MRS-Fermentermedium <ul style="list-style-type: none"> • Trypton (1 % m/v) • Fleischextrakt (1 % m/v) • Hefeextrakt (0,5 % m/v) • Pufferlösung pH 6,5 (v/v 10%) • C-Quellen ist variabel (wird erst am 2 Tag eingestellt) 		Datum:	
		Bearbeiter (Name)	Kürzel
	Berechnete Menge (g) für 500 mL	Tatsächlich eingewogen (g)	
Zusammensetzung			Kürzel
Trypton			
Fleischextrakt			
Hefeextrakt			
Pufferlösung			
Demin. Wasser	350 g		
Medium direkt im Fermenter ansetzen (1000 mL Reaktorgefäß). Zum Einfüllen der Nährmedien und des Wassers bitte den Pulvertrichter benutzen.			
Aufschrauben der Deckel.			
Schlauchklemmen anbringen und Schlauchenden und Anschlüsse mit Alufolie umwickeln.			
Im Autoklav bei 121°C für 20 min sterilisieren.			

Tabelle 2: C-Quelle (ein Ansatz für zwei Gruppen gemeinsam; insgesamt 3 verschiedene Zucker)

C-Quelle (siehe 4.1.1) Es soll eine 20%ige Lösung hergestellt werden!		Datum:		
		Bearbeiter (Name)		Kürzel
Zusammensetzung	Berechnete (g) für 500 mL	Tatsächlich eingewogen (g)	Kürzel	
C-Quelle: _____				
Schraubverschluss mit Probeentnahmerohr und Sterilfilter anbringen.				
Flasche im Autoklav bei 121°C für 20 min sterilisieren.				

Tabelle 2: 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.		
Beide Flaschen im Autoklaven bei 121°C für 20 min sterilisieren.		

Tabelle 3: Medium für OD Messung und Vorkultur (ein Ansatz für jede C-Quelle)

MRS-Medium (als Blanklösung für OD Messungen und Vorkultur) Konzentrationen siehe Tab.1		Datum:	
		Bearbeiter (Name)	Kürzel
Zusammensetzung	Berechnete Menge (g) für 500 mL	Tatsächlich eingewogen (g)	Kürzel
Trypton			
Fleischextrakt			
Hefeextrakt			
Pufferlösung			
Demin. Wasser	400 g	-	
Flasche im Autoklav bei 121°C für 20 min sterilisieren.			
Sterile Zugabe der Zuckerlösung in der gewünschten Konzentration.			

Tabelle 4: PBS - Isotonisches Verdünnungsmittel (soll nur von einer Gruppe durchgeführt werden)

PBS		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 gelöst.			
Flasche im Autoklaven bei 121°C für 20 min sterilisieren.			

Tabelle 6: Ansetzen der Vorkultur (soll von jeder Gruppe durchgeführt werden)

Vorkultur	Datum:	
	Bearbeiter (Name)	Kürzel
Pipettieren von 50 mL Medium in einen 100 mL sterilen Erlenmeyerkolben		
Beimpfen des Mediums mit 250 µL Bakteriensuspension		
Inkubation bei 30°C (schütteln) für 12-24 Stunden		

Arbeitsanweisungen für den zweiten Labortag

Tabelle 7: Bestimmen der Gesamtzellzahl und OD der Vorkultur (soll von jeder Gruppe durchgeführt werden)

Vorkultur					
Folgende Parameter des Inokulums sollen zum Zeitpunkt des Transfers in den Fermenter gemessen werden:					
Zeitpunkt Transfer:		Zellzahl (cells/mL)		OD600	
Datum Transfer:					

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

Fermentation (Vorbereitung)	Datum:			
	Bearbeiter (Name)	Kürzel		
Einstellung der C-Quelle des MRS Medium				
Vorratsbehälter der Zuckerlösung und Wasser aseptisch mit dem Fermenter verbinden. Zuerst die berechnete Menge durch Pumpen einbringen. Danach die Restmenge an Wasser zu pumpen damit ein Volumen im Reaktor von 500 mL erreicht ist.				
Zusammensetzung	Berechnetes Volumen	Berechnete Pumpzeit	Differenz	Kürzel
Zucker _____				
demineralisiertem Wasser				
Nach Zugabe (Pumpen) der beiden Lösungen wird der Schlauch abgeklemmt und die metallene Schlauchkupplung mit steriler Alufolie umwickelt. Der Reaktor wird nun in ein 30°C warmes Wasserbad gestellt und mindestens 30 min unter Rühren temperiert.				

Tabelle 9: Durchführung der Fermentation

Fermentation (Durchführung)	Datum:	
	Bearbeiter (Name)	Kürzel
Inokulation des Fermenters		
50 mL der Vorkultur werden aseptisch in den vorgewärmten Fermenter pipettiert (Sterile Werkbank!). Der Zeitpunkt der Beimpfung wird hier als $t_{(0)}$ bezeichnet.		
Der Reaktor wird in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt und die EtOH und CO ₂ Sensoren angeschlossen.		
Probenahme		
Zum Zeitpunkt $t_{(0)}$ und nach 6 h <u>muss</u> eine Probe genommen werden. Hierzu, soll die Gesamt-, Lebendzellzahl, Trockenmasse und OD bestimmt werden. 1 mL der Probe werden zentrifugiert (10000g/5min/10°C), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C eingefroren um die Lactat- und Acetat-Analytik am 3. Labortag durchzuführen.		