

Praktikum LM-Biotechnologie

Laborkurs Lebensmittelwissenschaften

Fensterle, Lucassen

Anaerobe Fermentation

1. Generelle Zielsetzung

Ziel ist die Planung, Durchführung und Analyse einer Fermentation mit Hefe und die Analyse der Ethanol und CO₂ Produktion in Echtzeit. Die Experimente werden mit unterschiedlichen Glucose Konzentrationen durchgeführt. Das übergeordnete Ziel ist die (kinetische) Analyse des Fermentationsprozesses, daher wird zum Zeitpunkt, an dem die Glucose vollständig verbraucht ist, ein weiteres Mal mit Glucose „gespikt“.

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, sowie Agarplatten für die Verdünnungsreihen 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 (optional 4) 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:

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

4.1.1. Glucose Anfangskonzentration einstellen (Tag 2)

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)

Die benötigten Mengen an Glucoselösung müssen vorher berechnet und aseptisch dem Reaktorgefäß zugepumpt werden.

4.1.2. Reaktorvolumen einstellen (Tag 2)

Nachdem die Glucose dem YPD Medium zugeführt wurde, soll das Volumen auf 500 mL mit sterilem demineralisiertem Wasser eingestellt werden.

4.1.3. Inokulation

Die Fermentation wird mit 20 mL *Saccharomyces cerevisiae* Suspension beimpft. Die Suspension wird hergestellt indem ein Blöckchen frische Bäckerhefe in 200 mL YPD Medium suspendiert wird.

Vor dem Beimpfen, soll eine Gruppe die Gesamtzellzahl bestimmen.

4.2. Probennahme

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

5. Erforderliche Inhalte des Protokolls

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

Die folgenden Punkte müssen enthalten sein:

Vorbemerkung: die Berechnungen sind für die Bereiche vor und nach der Glucosezugabe (Gruppen 1-5) getrennt durchzuführen. Die maximalen Raten sind entsprechend zu vergleichen.

- 1.) Kurze Einführung (1-2 Sätze)
- 2.) Bestimmung des Umrechnungsfaktors OD600 → Biomasse (bitte durchgängig korrekte Einheiten beachten!)
- 2.) Grafische Darstellung der gebildeten Menge in Mol (nicht Bildungsrate!) von CO₂ und EtOH basierend auf den Sensordaten vs. Zeit; Grafische Darstellung der gemessenen Gesamt-, Lebendzellzahlen und Biomasse vs. Zeit
- 2.) Berechnung der maximalen molaren Bildungsraten von CO₂ und EtOH (mitteln Sie hierfür die Bildungsraten in einem geeigneten Bereich).
- 3.) Berechnung der maximalen Wachstumsrate anhand der Biomasse
- 4.) Berechnung der molaren Ausbeute von CO₂, EtOH (mol / mol Glucose) und Biomasse (g / mol Glucose)
- 5.) Berechnung und Vergleich der „Lead time“ für beide Bereiche.

5.) Optional: Aufstellung der stöchiometrischen Summengleichung anhand der gebildeten Gesamtmassen.

Für die Auswertung gelten folgenden Annahmen:

- die vorhandene Glucose ist vollständig verbraucht, sobald die CO_2 Konzentration konstant bleibt
- CO_2 wird als ideales Gas betrachtet, die Bedingungen als Normbedingungen, somit gilt: $V_m = 22,46 \text{ L/mol}$.
- Sauerstoffverbrauch wird vernachlässigt, Konzentrationsänderungen von CO_2 basieren ausschließlich auf der CO_2 Bildung
- Beachten Sie, dass die Rohdaten Prozentwerte darstellen (müssen also mit 10^{-2} korrigiert werden!)
- Sowohl das Gasvolumen als auch das Flüssigkeitsvolumen wird unabhängig von Probennahmen als konstant 500 mL betrachtet
- Die Dichte der Kulturbrühe wird als konstant 1 g/cm^3 betrachtet
- Für Ethanol wird die Konzentrationsabhängigkeit des partiellen molaren Volumens vernachlässigt, die Dichte von reinem Ethanol beträgt $0,789 \text{ g/mL}$ (somit wiegt näherungsweise das in 100 mL 0,5% Ethanolösung enthaltene reine Ethanol: $100 \text{ mL} \cdot 0,5\% \cdot 0,789 \text{ g/mL} = 0,39 \text{ g}$).
- Molmassen: $\text{H} = 1 \text{ g/mol}$, $\text{C} = 12 \text{ g/mol}$, $\text{O} = 16 \text{ g/mol}$
- Bei den Gruppen, in denen EtOH Bildung nicht erfasst wurde soll die gebildete Menge aus der CO_2 Bildung extrapoliert werden. Verwenden Sie hierzu folgende Gleichung:
 - $\text{Mol EtOH} = 0,92 \cdot \text{Mol CO}_2$
- Die Summenformel von Hefe sei: $\text{CH}_{1,83}\text{O}_{0,56}\text{N}_{0,17}$

6. Anaerobe Fermentation

Arbeitsanweisungen für den ersten Labortag (Tab.1-7)

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) • Glukose Konzentration (variabel) (wird erst am 2 Tag eingestellt) 		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 der Deckel.			
Schlauchklemmen anbringen und Schlauchenden und Anschlüsse mit Alufolie umwickeln.			
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 500 mL	Tatsächlich eingewogen (g)	Kürzel
Glucose			
Glucose auf 1000 mL mit demineralisiertem Wasser einstellen.			
Schraubverschluss mit Probeentnahmerohr und Sterilfilter anbringen.			
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.		
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 (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			
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 gelöst.			
Flasche im Autoklaven bei 121°C für 20 min sterilisieren.			

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

YPD Medium (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 (mg)	Kürzel
Trypton			
Hefe Extrakt			
Medium auf 500 mL mit demineralisiertem Wasser einstellen und je 250 mL in eine 1L Duran Flasche mit Probeentnahme- rohr geben.			
Beide Flaschen im Autoklav bei 121°C für 20 min sterilisieren.			

Tabelle 7: YPD Agar (soll von jeder Gruppe durchgeführt werden)

YPD Agar <ul style="list-style-type: none">• 2% (w/v) Trypton• 1% (w/v) Hefe Extrakt• 1,5% Agar• Glucose 4%		Datum:	
		Bearbeiter (Name)	Kürzel
Zusammensetzung	Berechnete Menge (g) für 1000 mL	Tatsächlich eingewogen (g)	Kürzel
Trypton			
Agar			
Glucose			
Hefe Extrakt			
Medium auf 1000 mL mit demineralisiertem Wasser einstellen und einen Rührfisch zugeben.			
Flasche im Autoklav bei 121°C für 20 min sterilisieren.			

Arbeitsanweisungen für den zweiten Labortag (Tab.8 bis 10)

Tabelle 8: Ansetzen der *S. cerevisiae* Starterkultur (soll nur von einer Gruppe durchgeführt werden)

<i>S. cerevisiae</i> Starterkultur					
Etwa 20 g/250 mL einer frischen Backhefe dem YPD Medium zugeben. Bitte den Spatel vor Gebrauch mit Alkohol reinigen. Die Duran Flasche wird in einem Inkubator bei 30°C temperiert und geschüttelt.					
Folgende Parameter des Inokulums sollen zum Zeitpunkt des Transfers gemessen werden:					
Zeitpunkt Transfer:		Zellzahl (Zellen/mL)		OD600	
Datum Transfer:					

Tabelle 9: Fermenter set-up (soll von jeder Gruppe durchgeführt werden)

Fermentation (Vorbereitung)		Datum:		
		Bearbeiter (Name)		Kürzel
Einstellung der Glukosekonzentration des YPD Medium				
Vorratsbehälter der Glukoselösung (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	Berechnetes Volumen	Berechnete Pumpzeit	Differenz	Kürzel
Glucose (___% w/v)				
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 35°C warmes Wasserbad gestellt und mindestens 30 min unter Rühren temperiert.				

Tabelle 10: Durchführung der Fermentation

Fermentation (Durchführung)		Datum:			
		Bearbeiter (Name)		Kürzel	
Inokulation des Fermenters					
20 g (Annahme: 1 g ~ 1 mL) der Hefestarterkultur werden in den Fermenter aseptisch gepumpt (bitte Klemme am Verbindungsschlauch lösen). Hierzu wird der vorgewärmte Reaktor durch zu pumpen mit Hefezellen beimpft. Der Zeitpunkt der Beimpfung wird hier als $t_{(0)}$ bezeichnet. Nach Zugabe der Starterkultur wird der Verbindungsschlauch wieder abgeklemmt.					
Zusammensetzung	Benötigte Menge (g)	Flasche vorher (g)	Flasche nachher (g)	Differenz (g)	Kürzel
Starterkultur	20 mL				
Der Reaktor wird in ein 35°C warmes Wasserbad gestellt.					
Probenahme					
Zum Zeitpunkt $t_{(0)}$ muss eine Probe genommen werden. Hierzu, soll die Gesamt-, Lebendzellzahl, Trockenmasse, OD und CFU bestimmt werden.					
Nach jeweils 30 min, soll eine weitere Probe (5 mL) gezogen werden. OD und Gesamtzellzahl werden halbstündlich gemessen, die Lebendzellzahl wird nach jeweils 1,5 h bestimmt. Für die erste und letzte Probe, soll zusätzlich die Biomasse bestimmt werden.					
T (min)	Probenahme (hr : min)	Trocken-biomasse	Gesamt-zellzahl	Lebend-zellzahl	OD
0	Bitte eintragen	x	x	x	x
30	Bitte eintragen		x		x
60	Bitte eintragen		x		x
90....			x	x	x
Ende	Bitte eintragen	x	x	x	x