

FERMENTERING

FREMSTILLING AF ALKALISK PHOSPHATASE OG ETHANOL



af
SARA NORUP KJELDEN
MICHAEL ANDERSEN
KENNETH BUCHWALD JOHANSEN

2. semester, Foråret 2008

Laborantskolen
Nordjyllands Erhvervsakademi

SYNOPSIS:

TITEL:

Fremstilling af alkalisk phosphatase og ethanol

TEMA:

Fermentering

PROJEKT PERIODE:

Fra 7. Januar 2008

Til 25. Marts 2008

SEMESTER:

2. Semester

HOLD:

2LabA0108

PROJEKTGRUPPE:

Sara Norup Kjeldsen

Michael Andersen

Kenneth Buchwald Johansen

Der ønskes at fremstille alkalisk phosphatase fra *Escherichia coli* og ethanol fra *Saccharomyces cerevisiae*. Dette sker ved fermentering i baffelkolber og i bioreaktor. Begge produkter er primære metabolitter, og udskilles derfor i vækstfasen. Ved fremstilling af ethanol eksperimenteres der med forskellige C-kilder og forskellige temperaturer, for at se hvilke parametre, der giver de bedste vækstbetingelser.

Ved fremstilling af alkalisk phosphatase bestemmes der enzymaktivitet og tørstofkoncentration. Der laves desuden et vækstforsøg med *E. coli* for at bestemme den maksimale specifikke enzymaktivitet samt halvmætningskonstanten.

De fundne enzymaktivitet viser, som forventet, at der er større aktivitet af alkalisk phosphatase, hvis substratet indeholder en lav koncentration af phosphat. Ved fremstilling i bioreaktor kunne pH, ilt-niveau og temperatur holdes konstant, men dette har alligevel ikke givet bedre enzymaktivitet end ved baffelkolbeforsøget.

Ved fremstilling af ethanol med gær viser det sig, at den største ethanolkoncentration fremkommer ved stuetemperatur med glucose i substratet (i stedet for sakkarose). Det er lykkedes at fremstille 6.4% ethanol.

Forord

Nærværende rapport er et produkt af temaet *Fermentering* på laborantuddannelsens 2. semester, Nordjyllands Erhvervsakademi.

Rapportens opbygning fremgår af indholdsfortegnelsen, som dog er beskåret ved underafsnit. Derfor starter hvert kapitel med en udvidet kapitel-indholdsfortegnelse i et forsøg på at gøre kapitlernes opbygning mere overskuelige.

Henvisninger til litteratur vil fremgå med forfatterens efternavn og årstal, f.eks. Stilling 2004, som henviser til bogen "*Biokemi og bioteknologi*".

Sara Norup Kjeldsen

Michael Andersen

Kenneth Buchwald Johansen

Indholdsfortegnelse

Forord	II
1 Introduktion	1
1.1 Indledning	1
1.2 Mikrobiologisk vækst	1
1.3 Fermentering	3
1.4 Den prokaryote og den eukaryote celle	4
1.5 Alkalisk phosphatase	4
1.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2 Analysemetoder	7
2.1 <i>Escherichia coli</i>	7
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
3 Diskussion	11
3.1 <i>Escherichia coli</i>	11
3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
4 Konklusion	14
Litteratur	15
Bilag A Sikkerhed	16
Bilag B Alkalisk phosphatase i baffelkolber	18
Bilag C Alkalisk phosphatase i bioreaktor	21
Bilag D Vækstforsøg med <i>E. coli</i>	24
Bilag E Gær i baffelkolber	28

Introduktion

Dette kapitel giver en oversigt over rapportens formål samt begrebet fermentering. Mikrobiologisk vækst gennemgås, og de to produkter, der ønskes fremstillet, beskrives nærmere.

KAPITELOVERSIGT

1.1	Indledning	1
1.2	Mikrobiologisk vækst	1
1.2.1	Metabolitter	2
1.3	Fermentering	3
1.3.1	Fermenteringsformer	3
1.3.2	Fermenteringsvariabler	3
1.4	Den prokaryote og den eukaryote celle	4
1.5	Alkalisk phosphatase	4
1.5.1	Osmotisk Chok	5
1.5.2	Ionbyttings-kromatografi	5
1.6	Saccharomyces cerevisiae	6

1.1 Indledning

Der ønskes at fremstille alkalisk phosphatase fra *Escherichia coli* og ethanol fra *Saccharomyces cerevisiae* (bagegær). Dette sker ved fermentering (defineret i afsnit 1.3 på side 3). Alkalisk phosphatase ønskes oprenset og renhedsbestemt, og enzymaktiviteten bestemmes. Ved gærforsøget bestemmes koncentrationen af ethanol. *E. coli* fermenteres i baffelkolber og i bioreaktor. Gæren fermenteres i baffelkolber. Mere om dette senere.

1.2 Mikrobiologisk vækst

Inden der kan kigges nærmere på begrebet "fermentering", er det nødvendigt at vide lidt om mikrobiologisk vækst.

Når mikroorganismer formerer sig, er deres vækst delt ind i fire faser. Der tages udgangspunkt i, at der bruges et substrat, der er passende med hensyn til både næringsindhold og fysiske forhold. Medens mikroorganismen forbereder sig på delingen, bliver de enkelte celler større og der ses ikke megen vækst. Dette kaldes *nølefasen*. Her kan f.eks. beskadigede celler restituere sig, for derefter at fordoble sin DNA, forøge deres størrelse og endelig dele sig.

Efter nølefasen begynder cellerne at dele sig med konstante tidsintervaller. Cellerne deler sig eksponentielt, og dette giver anledning til at opstille en ligning for væksten i denne fase:

$$\frac{dN}{dt} = \mu \cdot N, \quad (1.1)$$

hvor N er antallet af celler, t er tiden og μ er en proportionalitetskonstant, som kaldes *den specifikke væksthastighed*. Den specifikke væksthastighed vendes der tilbage til i afsnit 2.1.6 på side 9. Løsningerne til ligningen er eksponentialfunktioner. Integrerer man ligning 1.1 over et tidsinterval, og omskriver, får man udtrykket

$$\ln N_2 = \mu(t_2 - t_1) + \ln N_1. \quad (1.2)$$

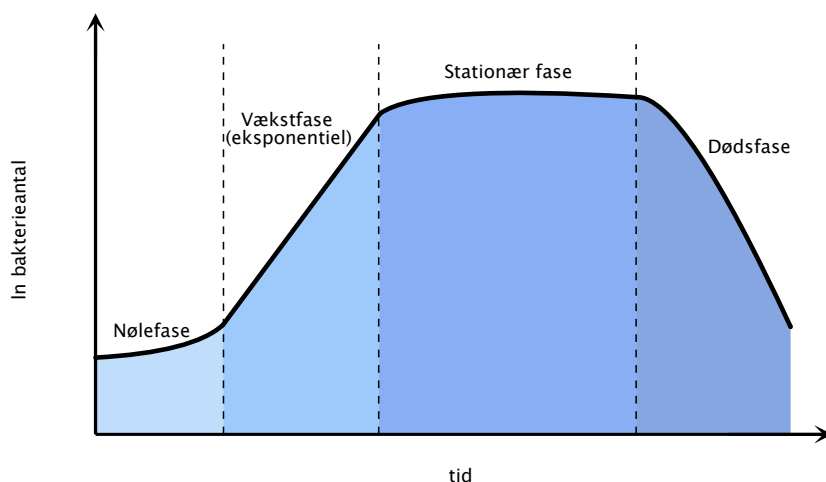
Herfra ses det, at hvis man plotter tiden ud af x-aksen og den naturlige logaritme til bakterieantallet ud af y-aksen, får man en lige linie med hældningen μ . Der er tradition for at bruge 10-talslogaritmen, men udtrykket med den naturlige logaritme er mere simpelt.

Mikroorganismernes vokser altså eksponentielt i denne fase, som tidligere konstateret, og man kalder derfor denne fase for *den eksponentielle vækstfase*. Der tales undertiden også om “vækstfasen”, men dette udtryk dækker over en bredere del af vækstkurven, nemlig hele den del, hvor mikroorganismen vokser, og altså ikke kun over den eksponentielle del af væksten.

I et tidsrum herefter dannes der ligevægt mellem antallet af celler der dannes og antallet af celler, der dør. Der er altså ved måling ingen ændring i væksten, og derfor kaldes denne fase for *den stationære fase*.

Herefter vil cellerne begynde at dø. Dette skyldes blandt andet ophobningen af stofskifteprodukter og at substratet kan være opbrugt. Denne fase kaldes *dødsfasen*, og vil oftest forekomme som en eksponentiel aftagning af mængden af levende celler. Måler man optisk densitet af cellerne vil man ikke kunne se dødsfasen, idet man måler på både levende og døde celler.

De fire faser af væksten er illustreret i figur 1.1.



Figur 1.1: Oversigt over mikroorganismers vækstfaser.

1.2.1 Metabolitter

Alt efter hvor mikrober befinder sig i deres livsforløb, udskilles kemiske stoffer, som betegnes *metabolitter*. Disse stoffer kan være *primære metabolitter*, som f.eks. proteiner, lipider og kulhydrater. De primære metabolitter dannes i vækstfasen, og er nødvendige for mikroorganismernes vækst eller også er de bi-produkter fra energiomsætningen. *Sekundære metabolitter* er betegnelsen for stoffer, som dannes i de senere vækstforløb især i den stationære fase. Man kender ikke den egentlige anvendelse af disse stoffer.

De fleste enzymer dannes i vækstfasen og kan derfor beteges som primære metabolitter (men findes også som sekundære metabolitter). Mikroberne benytter de dannede enzymer til processer i metabolismen (stofskiftet).

I fermentorer er man interesseret i at styre miljøet, så kulturen hele tiden er i enten den eksponentielle eller den stationære fase, så man hele tiden kan kontrollere, hvilke metabolitter, der udskilles og få størst muligt produkt.

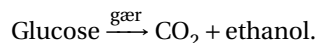
I denne rapport fremstilles der alkalisk phosphatase og ethanol, som begge er primære metabolitter. Ethanol dannes som biprodukt ved energiomsættelse.

1.3 Fermentering

Begrebet "fermentering" skal på plads, og der kigges derfor på de to definitioner fra Thouggaard, Varlund og Madsen 2007, side 407:

En mikrobiolog forstår ved udtrykket fermentation (ved en fermentering) enhver proces, hvorved der dannes et produkt ved mikrobiel omsætning. For en biokemiker betyder fermentation derimod en anaerob nedbrydningsproces, hvor organisk stof både virker som hydrogendona- tor og hydrogenacceptor; at der altså er tale om en gangse bestemt biokemisk procestype.

I biokemikerens definition kunne et eksempel på en sådan nedbrydningsproces være dannelsen af ethanol ved nedbrydelse af glucose med gærsvampen *Saccharomyces cerevisiae*;



I denne rapport vil den brede version af definitionerne blive brugt, nemlig

En fermentation er en kemisk proces, der katalyseres af enzymer fra mikroorganismer, dyre- eller planteceller.

1.3.1 Fermenteringsformer

Man laver fermentering på flere forskellige måder. En oversigt over disse er illustreret i tabel 1.1 på den følgende side, som er lavet med inspiration fra Sloth 2008. Tabellen beskriver egenskaber, fordele og ulemper ved de forskellige fermenteringsformer.

I denne rapport (med tilhørende analyser) bliver der brugt baffelkolber samt batch-kultur i bioreaktor. Egentlig er baffelkolbe-fermentering også batch-fermentering, men det vurderes her, at baffelkolbe-fermentering er mere primitiv end batch-fermentering i bioreaktor, idet det ikke er muligt at kontrollere og justere så mange faktorer (f.eks. kan ilt-niveauet ikke styres). Det vedtages altså her at baffelkolbe-fermentering er en type fermentering i sig selv.

1.3.2 Fermenteringsvariabler

Når man skal lave en fermentering, er man normalt interesseret i det produkt, processen kan frembringe. Derfor gør man meget ud af at give nedbrydningen de bedste mulige betingelser, således at der dannes en stor mængde produkt. Er man f.eks. interesseret i en primær metabolit (se afsnit 1.2.1 på foregående side), vil man søge at holde processen i vækstfasen, og er man interesseret i en sekundær metabolit, holder man processen i den stationære fase og er altså opmærksom på, at man ikke kommer ind i dødsfasen.

Når det er muligt overvåges og justeres

- pH (justeres ved tilsætning af syre/base),
- temperatur (justeres normalt elektronisk),

	Bruges til	Egenskaber	Fordele	Ulemper
Baffelkolber:	Screeningsforsøg, for at finde de optimale stammer og forhold.	Variabel væksthastighed. Stop i vækst skyldes at substrat er opbrugt.	Mange forsøg med lidt plads. Hurtig opsætning. Mange parallelle forsøg på en gang.	Kun få parametre kan kontrolleres. Forholdsvist lille volumen til rådighed.
Batch-kultur:	Øl-fremstilling. Vækstforsøg.	Variabel væksthastighed. Stop i vækst skyldes at substrat er opbrugt.	Lille chance for kontaminering og mutation, da den kører kort tid.	Væksten er begrænset af mængden af substrat.
Fed batch:	F.eks. gærfermentering, hvor høj glucosekoncentration medfører ethanoldannelse.	Substrat tilføres jævnt. Konstant væksthastighed.	Væksthastigheden kan holdes konstant, idet processens betingelser optimeres løbende.	Større risiko for kontaminering eller mutation.
Kontinuert kultur: (kemostat)	Sprit- og enzymfremstilling.	Konstant væksthastighed, volumen samt biomasse.	Ensartet produktion. Store mængder produkt kan fremstilles.	Større risiko for kontaminering eller mutation.

Tabel 1.1: De forskellige fermenteringsformer.

- ilt-niveau (justeres ved ændring af ilttilførsel og omrøring),
- cellevækst,
- koncentration af det ønskede stof.

1.4 Den prokaryote og den eukaryote celle

Alle organismer består af celler. Nogle organismer er multicellulær medens andre kun består af en celle. Men fældes for dem alle er at de består af arvemasse, en ydre afgrænsning og evnen til at omdanne energi. Organismetyperne deles desuden op i om de har kerne eller ikke. Altså pro (før) karyoter (kerne) eller eu (ægte) karyoter.

Ved fermentationsprocesserne i denne rapport benyttes *E. coli* og gær som produktionsorganismer. Biologisk klassificeres *E. coli* som en prokaryot organisme og gær som en eukaryot organisme. Nogle af de gængse forskelle og ligheder er opsummeret i tabel 1.2 på den følgende side.

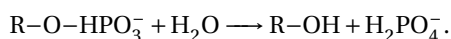
1.5 Alkalisk phosphatase

E. coli er en prokaryot organisme. Normalt findes organismen i tarmfloraen hos dyr og mennesker. Den er grampositiv, hvilket vil sige at cellevæggen indeholder murien. Bakterien er fakultativt anaerob, hvilket vil sige at den kan omsætte energi i iltfattige og iltrige miljøer. *E. coli* vokser bedst ved 37°C. I fermentationsprocesser kan organismen f.eks. udskille laktat, sucitinat, ethanol, acetat og CO₂. Organismen kan ikke producere sporer. Det er en mobil organisme og den bevæger sig ved hjælp af mange flageller dvs. den er peritricus. *E. coli* kan desuden overføre arvemateriale ved hjælp af transduktion og transformation.

Det er ikke helt sikkert hvilken funktion alkalisk phosphatase (APase) har, men formentlig er det det enzym, der medvirker til at følgende reaktion foregår:

Egenskab/organel	Prokaryot celle	Eukaryot
Organismer	Bakterier/Archea	Protister, svampe, planter, dyr
Størrelse generelt	1-10 μm	10-50 μm
Cellevæg	Hos nogle typer	Planteceller
Cellemembran	Tilstede	Tilstede
Strukturer i cytoplasma	Få	Mange
Cytoskelet	Findes ikke	Tilstede
Energiomsætning	I cellemembranen/mesosom	Mitochondrier
Ribosomer	Tilstede (S)	Tilstede (S)
ER	Findes ikke	tilstede
Pili	Tilstede	Findes ikke
Flagel	flagelin	tubulin
Cellekerne	Ikke tilstede	Tilstede
Genom	Cirkulært bakteriekromosom	Kompleks i cellekernen
Plasmid	Tilstede	Findes ikke
Celledeling	Simpel celledeling	Meiose/mitose

Tabel 1.2: Forskelle og ligheder mellem prokaryoter og eukaryoter.



Her hydrolyseres de organiske fosfatforbindelser, der er i vækstmediet, hvorved cellen får phosphat, som er en bestanddel af nukleinsyre, der er opbygget af nukleotider. Phosphat er derfor en vigtig bestanddel i cellen, da det er med til at opbygge DNA og RNA så cellen kan lave celledeling. Jo mindre lettilgængelig phosphat der er, jo mere stimuleres syntesen af APase.

1.5.1 Osmotisk Chok

Hvis man skulle undersøge bestemte enzymer i en bakteriecelle, kan det give problemer, idet der er mange forskellige enzymer og proteiner, inde i cellen, som kan komme med i prøven. Dette kan vanskeliggøre isolationen af et bestemt enzym eller protein. Fordelen ved at måle på alkalisk phosphatase er, at netop dette enzym befinder sig i cellens overflade, nærmere bestemt i det periplasmatiske rum mellem cellemembran og cellevæg. Her er det muligt at udvinde enzymet uden at nogle andre enzymer, proteiner, mv. kommer med, da man ved hjælp af centrifugering kan sprænge cellevæggen uden at cellemembranen går i stykker. Denne proces foregår over flere mellemlid, hvor et af dem er, at man tilsætter en chok-opløsning, hvor et af de indgående stoffer er etylen-diamin-tetra-eddikesyre (EDTA). EDTA er et stof der binder metalioner, heriblandt magnesium, som er nødvendig for at opretholde cellevæggens struktur (Erhvervsakademi Roskilde 2001). Cellen har stadig membranen, der holder sammen på cellen, og alkalisk phosphatase kan nu trænge ud fra det periplasmatiske rum, og muliggør måling af enzymet.

1.5.2 Ionbytnings-kromatografi

Ved det osmotiske chok blev proteinerne, her iblandt alkalisk phosphatase, oprenset. Ud fra disse fraktioner ønskes nu alkalisk phosphatase isoleret. Ved ionbytnings-kromatografi separeres proteinerne blandt andet efter størrelse og ladning. Separationen sker ved interaktion imellem forskellige typer ladede molekyler. Proteinopløsningen tilsættes en kolonne, som består af en porøs gel i den stationære fase og en mobil fase.

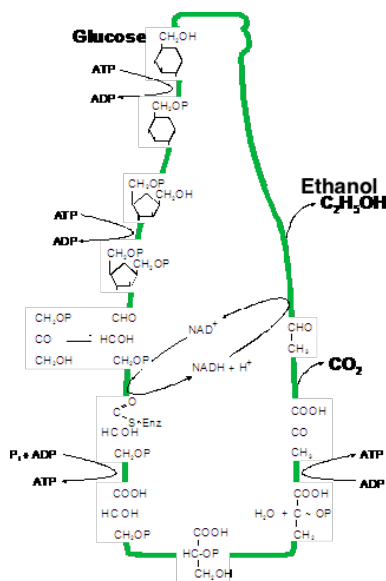
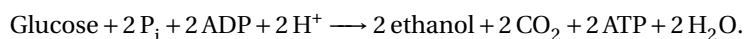
I gélen findes der uopløselige forbindelser med forskelligt ladede sidegrupper. Dette kunne være f.eks. DiethylAminoEthyl (DEAE). Valget af dette stof kommer an på egenskaberne ved det protein der skal op-

renses. Her er proteinets isoeletriske punkt især vigtig. Et proteins isoeletriske punkt (pI) bestemmes ud fra den pH-værdi, hvor proteinets samlede ladning er lig nul. Den mobile fase består af proteinopløsningen og buffer. Bufferen tilsættes, så pH-værdien langsomt ændres. Proteinene der skal oprenses, binder sig til kolonne-matricen, hvilket de andre proteiner i opløsningen imidlertid også gør, men da tilsætningen af bufferne ændrer pH-værdien i kolonnen, udvaskes de uønskede proteiner. Denne proces forløber i de første fraktioner. I kolonnen er det ønskede protein nu bundet, og frigøres først når pH værdien nærmer sig proteinets pI værdi. Ved denne pH-værdi kan proteinet ikke bindes til kolonne-matricen mere og det udvaskes.

1.6 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces er en eukaryot organisme. Organismen er specielt kendt for at kunne danne alkohol og CO_2 . Den er fakultativt anaerob, og dens optimale væksttemperatur ligger imellem 20-45°C. Organismen kan både foretage en kønnet (diploid) og en ukønnet (Haploid) forering, desuden er den sporedannende.

Gærsvampen skaffer energi ved at oxidere organiske stoffer såsom glucose og sakkarose (DTU – Biotech Academy 2008b). Under oxidationen af sukker, dannes der blandt andet kuldioxid, ATP og ethanol, hvor sidstnævnte er det produkt, der er af interesse her, til trods for det blot er et biprodukt af gærcellens energidannelse. Ethanol kan bruges til mange forskellige ting, f.eks. husholdningssprit, spiritus samt bioethanol, der kan fungere om brændstof. Ligningen for reaktionen, hvor alkohol bliver dannet ser således ud:



Figur 1.2: Citronsyrecyklus. Figurens form har intet med processen at gøre, men skyldes at figuren er udlånt af Carlsberg Forskningscenter.

På figur 1.2, som er hentet fra DTU – Biotech Academy 2008a, ses citronsyrecyklus, som er energidannelse i en gærcelle, hvor man kan se ethanol som biprodukt.

Analysemetoder

Dette kapitel beskriver analyserne. Metoder samt afvigelser herfra gennemgås. Fermenteringen med *Escherichia coli* sker på baggrund af analyseforskriften Skadborg og Sloth 2008a, og fermenteringen med *Saccharomyces cerevisiae* sker på baggrund af analyseforskriften Skadborg og Sloth 2008b. Resultaterne for analyserne kan ses i tabel 2.1 på side 10.

KAPITELOVERSIGT

2.1	<i>Escherichia coli</i>	7
2.1.1	Baffelkolbeforsøg	7
2.1.2	<i>E. coli</i> i bioreaktor	7
2.1.3	Tørstofbestemmelse	7
2.1.4	Proteinkoncentration	8
2.1.5	Enzymaktivitet og renhed	8
2.1.6	Vækstforsøg med <i>E. coli</i>	9
2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.2.1	Ethanolkoncentration	9

2.1 *Escherichia coli*

Alkalisk phosphatase produceres her på to måder, nemlig i baffelkolber og i bioreaktor. Umiddelbart forventes det på forhånd, at der vil være større vækst i bioreaktoren, da der her forsøges at optimere på bakteriens forhold (se afsnit 2.1.2).

2.1.1 Baffelkolbeforsøg

Her er tale om den simpleste form for fermentering, hvor der podes en forkultur direkte i baffelkolberne. Herfra kan der podes med et volumen på 10% i forskellige variationer af substrat. Fermenteringsprocessen kører uden tilsætning af substrat indtil dødsfasen er nået. Undervejs kan prøver udtages og optisk densitet kan måles på et spektrofotometer.

Der eksperimenteres med 3 forskellige substratsammensætninger. Phosphatindholdet varieres, så der er baffelkolber med $\frac{1}{2} \times$ phosphatindhold, $2 \times$ phosphatindhold og normalt phosphatindhold. På denne måde kan det afgøres, hvilken effekt indholdet af phosphat i substratet har på produktionen af alkalisk phosphatase. Der inkuberes ved 37°C.

2.1.2 *E. coli* i bioreaktor

Substrat autoklaveres sammen med reaktoren, for at mindske risikoen for kontamination. Bioreaktoren indstilles på en passende pH, temperatur og ilt-niveau.

2.1.3 Tørstofbestemmelse

Tørstofbestemmelsen bruges til at finde g. celler pr. liter. Det foregår ved at en mængde prøve, her 10mL, filtreres gennem et 0,2µm Milipore filter og tørres derefter i varmeskab.

Filterne vejes både alene og i en lille bakke, da man kan risikere at noget af det tørstof, der sidder på filterne, kan falde af i bakkerne, hvori de også tørres i varmeskabet. Er dette tilfældet, er det svært at få

tørstoffet op på filterne igen, og der kommer derfor en væsentlig fejlkilde, idet alt tørstof ikke kommer med. Når filterne så er vejret i bakken, kan det tørstof der eventuelt er faldet af filterne, vejes med.

2.1.4 Proteinkoncentration

Lowry-metoden, der her anvendes, er en metode hvor prøvens proteinkoncentration måles i forhold til en standardopløsning med en kendt proteinkoncentration, der i dette tilfælde er Bovin Serum Albumin (BSA). Intensiteten af den dannede farve er proportional med prøvens indhold af protein. Det er således muligt at måle proteinindholdet i en prøve ved at måle prøvens absorptions.

BSA er på pulverform og proteinerne deri opløses, når pulveret blandes med ionbyttet vand. Der foretages OD-målinger på reagenser med forskellig koncentration af BSA, og disse benyttes til at danne en kalibreringskurve. Prøverne, der er udtaget, samt BSA, behandles nu på samme måde, hvorefter der måles absorptions på spektrofotometer. Prøven tilsættes reagens A, og blandingen henstår nu i 10 minutter ved stuetemperatur, hvilket tillader reagenserne at virke, og blandt andet er med til at forstærke farveudviklingen, hvilket gør det muligt at måle absorptionsen.

Herefter tilsættes reagens B, bestående af Folin's reagens, der også giver farve. Når dette er tilsat, skal det opslæmmes hurtigt, for at få blandet alle reagenser. Det henstår nu i 50 grader varmt vand, for at give reagenserne bedst mulig betingelser for at gå i forbindelse med prøven. De afkøles nu til stuetemperatur, hvorefter absorptionsen måles.

Resultaterne fra standarderne plottes, og ud fra den fremkomne kalibreringskurve, er det nu muligt at bestemme proteinkoncentrationen på prøverne.

Alle reagenser der er brugt, er fremstillet i henhold til den udleverede forskrift (Skadborg og Sloth 2008a).

Proteinkoncentrationen bruges til at beregne den specifikke enzymaktivitet, som der kigges nærmere på i afsnit 2.1.5.

2.1.5 Enzymaktivitet og renhed

Enzymaktiviteten er defineret som μmol substrat omdannet pr. minut, og beregnes som ændringen i koncentration over ændringen af tid. Idet absorptionsen er proportional med koncentrationen af substratet, bruges absorptionsen som et mål for koncentrationen. Man skal altså tage højde for molforholdet mellem substrat og produkt, hvis det er produktet (og ikke substratet), der giver en farvning.

Der tages udgangspunkt i Beers lov,

$$A = k \cdot c \cdot l,$$

hvor k er den molære absorptionskoefficient for det stof, der måles på (her $16000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ for 4-nitrophenol). c er koncentrationen og l er lysvejen (her 1 cm).

Man udvider Beers lov ved at kigge på ændringen over et tidsinterval og får derved, at

$$\frac{|\Delta \text{Abs}|}{\Delta \text{tid}} = \frac{k \cdot \Delta c \cdot l}{\Delta \text{tid}}.$$

En simpel omskrivning giver da et udtryk for enzymaktiviteten:

$$\text{Enzymaktivitet (mol/(L} \cdot \text{min))} = \frac{\Delta c}{\Delta \text{tid}} = \frac{|\Delta \text{Abs}|}{\Delta \text{tid} \cdot k \cdot l}.$$

Dette giver en enhed på $\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$. Man angiver normalt enzymaktiviteten som U/mL, og følger man analyseforskriften, laves der også fortyndinger, så for at få enheden U/mL, omskrives formelen til

$$\text{Enzymaktivitet (U/mL)} = \frac{|\Delta \text{Abs}| \cdot 10^6}{\Delta \text{tid} \cdot k \cdot l \cdot 10^3} \cdot 51, \quad (2.1)$$

hvor $1U = 1\mu\text{mol}/\text{min}$.

Renheden af enzymet kaldes *specifik enzymaktivitet*, og beregnes som enzymaktivitet pr. mg protein. Renheden beregnes med formlen

$$\text{Specifik enzymaktivitet (U/mg)} = \frac{\text{enzymaktivitet (U/mL)}}{\text{proteinkonc. (mg/mL)}}. \quad (2.2)$$

Renheden af alkalisk phosphatase findes efter oprensning med ionbytning (se afsnit 1.5.2 på side 5).

2.1.6 Vækstforsøg med *E. coli*

Der laves et vækstforsøg med *E. coli*, hvor der udpodes i 9 forskellige kolber, med stigende koncentrationer af glucose. Forsøget går ud på at bestemme væksthastigheder i et minimalmedium med en begrænsende C- og energikilde (glucose). Hver af udpodningerne giver en vækstkurve, som kan ses i figur D.1 på side 25, med tiden ud af x-aksen og absorbansen ud af y-aksen. På disse vækstkurve, kan μ_{max} aflæses, som er den vandrette tangent, som vækstkurven går imod, efterhånden som tiden skrider frem. μ_{max} aflæses altså på y-aksen af vækstkurven, og kaldes *den maksimale specifikke væksthastighed*. Ud fra μ_{max} kan K_m findes. K_m kaldes *halvmætningskonstanten* og er substratkoncentrationen ved $\mu = \frac{1}{2}\mu_{\text{max}}$. Med disse to værdier, kan *den specifikke væksthastighed* beregnes:

$$\mu = \mu_{\text{max}} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}. \quad (2.3)$$

Med 9 forskellige specifikke væksthastigheder, kan man plotte den specifikke væksthastighed som funktion af substratkoncentrationen ($\mu = f([S])$). På denne graf kan μ_{max} og K_m bestemmes grafisk, og plotter man $\mu^{-1} = f([S]^{-1})$, kan μ_{max} og K_m bestemmes ud fra liniens ligning.

2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

En gæringsanalyse kan foregå i bioreaktor såvel som i baffelkolber. I denne analyse foregår processen i baffelkolber med to forskellige næringsmedier (et indeholdende glucose og et indeholdende sakkarose), samt forskellige temperature, for at undersøge hvilke medie og temperatur, der er bedst for gæringsprocessen. Gær trives ifølge emu.dk 2008 bedst ved 20-45°C, og analysen her undersøger væksten ved 37°C samt stuetemperatur.

Den type gær der anvendes i denne analyse, er bagegær, hvor der podes 10 g. gær ned i hver baffelkolbe med medium. Hvert medium har en forskellige form for næringstype og mængde. Alle baffelkolber er tæt lukkede med en gummiprop, der sørger for anaerobe omgivelser. Proppen har en udgang, i form af en gummislange, der går ned til en et bægerglas med vand, hvor slanges ende er under. Dette sikrer at den dannede CO_2 har mulighed for at komme ud af baffelkolben, der ellers vil springe på grund af overtryk. Baffelkolberne inkuberes ved de valgte temperaturer, og der tages løbende prøver ud til OD-måling samt til bestemmelse af ethanolkoncentration (se afsnit 2.2.1).

2.2.1 Ethanolkoncentration

Koncentrationen af den dannede ethanol i baffelkolberne bestemmes ved gaskromatografi. Analyseforskriften Eliassen 2008 benyttes. Prøverne blandes med 1-butanol, som bruges som intern standard. Der ved kan de fremkomne toppe af ethanol sammenlignes med den kendte koncentration af 1-butanol, hvorved ethanolkoncentrationen kan bestemmes.

Analyse	Metode/resultat	Enhed	Resultat	CV%	Bilag
E. coli i baffelkolber					
Maksimal væksthastighed	$\mu_{\max}$ ($\frac{1}{2} \times$ phosphat)	-	1.38	-	B.1 på side 18
	$\mu_{\max}$ (1 $\times$ phosphat)	-	1.43	-	B.1 på side 18
	$\mu_{\max}$ (2 $\times$ phosphat)	-	1-41	-	B.1 på side 18
Tørstof	$\frac{1}{2} \times$ phosphat	g. celler / L.	0.8	65.3	B.3 på side 19
	1 $\times$ phosphat	g. celler / L.	1.2	7.89	B.3 på side 19
	2 $\times$ phosphat	g. celler / L.	1.1	25.6	B.3 på side 19
Enzymaktivitet	$\frac{1}{2} \times$ phosphat	U/mL	2.680	15.1	B.4 på side 19
	1 $\times$ phosphat	U/mL	2.586	19.6	B.4 på side 19
	2 $\times$ phosphat	U/mL	1.502	17.0	B.4 på side 19
E. coli i bioreaktor					
Maksimal væksthastighed	$\mu_{\max}$	-	1.38	-	C.1 på side 21
Tørstof	tørstof	g. celler / L	0.323	9.94	C.2 på side 21
Specifik enzymaktivitet	Prøve	U/mg	0.047	-	C.4 på side 23
	Buffer 0	U/mg	0.003	-	C.4 på side 23
	Buffer 20.1	U/mg	0.000	-	C.4 på side 23
	Buffer 20.2	U/mg	0.117	-	C.4 på side 23
	Buffer 20.3	U/mg	0.102	-	C.4 på side 23
	Buffer 80.1	U/mg	0.020	-	C.4 på side 23
	Buffer 80.2	U/mg	9.358	-	C.4 på side 23
	Buffer 80.3	U/mg	9.976	-	C.4 på side 23
	Buffer 200.1	U/mg	7.846	-	C.4 på side 23
	Buffer 200.2	U/mg	3.750	-	C.4 på side 23
Vækstforsøg med E. coli					
Maksimal specifik væksthastighed	$\mu_{\max}$	-	0.342	-	D på side 26
Halvmætningskonstant	K_m	g/L	71.8	-	D på side 26
Gær i baffelkolber					
Maksimal væksthastighed	$\mu_{\max}$ (sakkarose v. 37°C)	-	2.1	-	E.1 på side 28
	$\mu_{\max}$ (glucose v. 37°C)	-	2.3	-	E.1 på side 28
	$\mu_{\max}$ (glucose v. stuetemp.)	-	2.9	-	E.1 på side 28
Ethanolkoncentration	største c_{ethanol}	%	6,38	11,81	E.3 på side 29
	mindste c_{ethanol}	%	1,95	1,16	E.3 på side 29

Tabel 2.1: Analyseresultater

Diskussion

I dette kapitel diskuteres analyserne, metoderne samt resultater. Der tages stilling til hvilke parametre, der kunne optimeres. Analyseresultaterne er at finde i tabel 2.1 på forrige side.

KAPITELOVERSIGT

3.1	Escherichia coli	11
3.1.1	Baffelkolbeforsøg	11
3.1.2	E. coli i bioreaktor	11
3.1.3	Tørstofbestemmelse	11
3.1.4	Proteinkoncentration	12
3.1.5	Enzymaktivitet og renhed	12
3.1.6	Vækstforsøg med E. coli	12
3.2	Saccharomyces cerevisiae	13
3.2.1	Ethanolkoncentration	13

3.1 Escherichia coli

3.1.1 Baffelkolbeforsøg

Kurven i figur B.1 på side 18 viser værdier i starten og i slutningen af væksten. Det vil sige, at der er målinger fra nølefasen og fra den stationære fase. De manglende resultater skyldes at hele væksten er gennemgået i løbet af et døgn. Hvis man skulle have målinger i den eksponentielle vækstfase, skulle man altså tage målinger om natten også.

3.1.2 E. coli i bioreaktor

Ud fra resultaterne fra OD-målingerne er kurven, der er plottet i figur C.1 på side 21, lavet. Denne kurve beskriver væksten i bioreaktoren. Desværre mangler der en del data for at vise vækstfasen ordentligt. Dette skyldes som tidligere nævnt, at hele vækstkurven gennemløbes indenfor et døgn. I den tid fermentationsprocessen forløb skulle der aflæses pH, ilt-koncentration og temperatur. Disse faktorer blev kun noteret 2 gange igennem forsøget. Der er dog intet i resultaterne, der indikerer, at der skulle have været betydelige udsving.

Der er ingen tvivl om at det er et værre rod, første gang man skal forsøge at samle en bioreaktor. Der er mange dele, der skal skrues rigtigt sammen, og mange parametre, man lige skal holde øje med. Når man først har fået overblik over, hvordan det hele fungerer, er det dog noget mere overskueligt og meget nemmere at se, hvor smart en bioreaktor egentlig er. Den samlede bioreaktor kan ses på forsiden af denne rapport.

3.1.3 Tørstofbestemmelse

I dette tilfælde var det nødvendigt at veje filter og bakke, hvilket dog gav gode resultater, der alle lå tæt på hinanden. Mængden af tørstof var større i baffelkolberne end de var i bioreaktoren. Dette kan skyldes, at prøverne i bioreaktoren var udtaget forkert, idet den væske, der lå i slangerne, ikke blev pustet tilbage, så man fik en helt ny prøve frem, men en blanding af hvad der i forvejen var i slangen og ny prøve. Logisk set vil det være i bioreaktoren, der vil give mest tørstof, idet der her er en maskine til at styre pH, ilt-niveau samt temperatur, og cellerne derfor burde have en bedre aktivitet.

Ved baffelkolberne var kulturene til tider udsat for en temperaturforskel når dørene til varmeskabet konstant blev åbnet og lukket, når der blev udtaget prøver. Ilt og pH kan heller ikke garanteres konstant. Der må derfor være en fejlkilde, der ikke kan gøres rede for, da tørstofmængden var større i baffelkolberne end i bioreaktoren.

3.1.4 Proteinkoncentration

Analysen af proteinkoncentration har været ligetil. Kalibreringskurven (figur C.2 på side 22) er blevet god, med en korrelationskoefficient på 0.9962. Målinger og beregning af proteinkoncentrationer kan se i kapitel C på side 22. Resultaterne skal bruges til at beregne specifik enzymaktivitet (se afsnit 3.1.5).

3.1.5 Enzymaktivitet og renhed

Som forventet er der størst enzymaktivitet i baffelkolberne med $\frac{1}{2} \times$ phosphatindhold. Dette stemmer fint overens med teorien om, at alkalisk phosphatase er noget *E. coli* danner, for at skaffe phosphat. Jo mindre phosphat, desto mere alkalisk phosphatase dannes der.

Af uforklarlige årsager ser det ud til at der er større enzymaktivitet i baffelkolberne, end der er i bioreaktoren. Dette burde være lige omvendt. Men at sammenligne de to metoder er heller ikke lige til, idet de trods alt er meget forskellige.

Ved bioreaktoren kan det ses at der gennem tilsætningen af de forskellige buffere hele tiden udvaskes en mængde protein. Dette skyldes, at der i det periplasmatiske rum er andre proteiner end alkalisk phosphatase. Disse proteiner udvaskes dog ved andre pH-værdier. Alkalisk phosphatase udvaskes ved buffer 80 og 200, da der ved disse saltkoncentration opstår de betingelser, der skal til for at proteinet udvaskes. Den største specifikke enzymaktivitet, der fremkommer, er 9,976 U/mg.

3.1.6 Vækstforsøg med *E. coli*

Vækstkurvene for vækstforsøget i figur D.1 på side 25 viser glucosekoncentrationens betydning for væksten. Teoretisk set skulle alle kurvene følges ad, for så en efter en at bøje af, i takt med deres glucosekoncentration. Dette teoretiske billede følger vækstkurvene temmelig godt. Det kan f.eks. ses af figuren, at kurven for udpodningen uden glucose bøjer af først, og der er altså næsten ingen vækst heri. Herefter bøjer kurvene af en efter en, dog med nogle afvigelse, som man må forvente, når der arbejdes med data fra virkeligheden.

For at finde den maksimale specifikke væksthastighed og halvmætningskonstanten, omskrives liniens ligning fra figur D.3 på side 27, hvorfra de to værdier kan beregnes. Disse udregninger kan findes i kapitel D på side 26. Figur D.3 på side 27 er lavet med det forbehold, at punkterne fra koncentrationerne 1g/L og 1,5g/L er fjernet, da disse to gjorde liniens ligning mere unøjagtig.

Den maksimale specifikke væksthastighed (se tabel 2.1 på side 10) er forholdsvis lav (f.eks. i forhold til *E. coli*), hvilket betyder at væksten ikke kan foregå meget hurtigere, end den allerede gør ved den største glucosekoncentration. Halvmætningskonstanten fortæller os, at for at komme halvvejs mod den maksimale specifikke væksthastighed, skal der bruges en koncentration på ca. 72 g/L glucose. Man kan dog ikke sige at der så skal bruges dobbelt så meget for at nå den højst mulige væksthastighed, da forholdet mellem substratkoncentration og væksthastighed ikke er lineært. Men da den maksimale væksthastighed er så lav, og halvmætningskonstanten så høj, må man kunne konkludere, at man skal bruge meget substrat for at få en lille ændring i væksthastigheden. Tilsyneladende kan det altså ikke betale sig at bruge en masse ressourcer på at gøre glucosekoncentrationen større, da det kun vil ændre væksthastigheden en lille smule. Til gengæld kunne det være en ide at ændre substratindholdet, da mediet til disse forsøg er meget begrænsende.

Analysen var i sig selv meget enkel og ligetil. Baffelkolberne kunne bare stå i varmeskab og passe sig selv, indtil der skulle tages prøver ud til OD-måling.

3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Ud fra denne analyse, kan det konstateres, at det her er substratet glucose ved stuetemperatur der har givet de bedste resultater, samt en relativ lav CV%. Det kan dog ikke vides om sakkarose vil have haft samme gode resultat, da dette substrat kun blev brugt i kolberne, der var i varmeskab ved 37°C, og ikke undersøgt ved stuetemperatur.

En af grundene til, at der er en stor CV%, samt knap så gode resultater ved baffelkolberne i varmeskab, kan skyldes den konstante svingning, der kommer i temperaturen, når skabet gentagne gange er blevet åbnet, for at prøverne kunne tages ud. Temperaturforskellene er samtidig årsag til at kolberne har opsuget vand, der var anbragt for at forhindre ilt i at komme ned til kulturerne, og som tillod CO₂ at komme ud, hvilket kan have givet utroværdige/afvigende resultater. Der var også nogle af baffelkolberne, der sugede vand op fra bægerglasset og derved fortyndede sig selv.

Det kan heller ikke vides med sikkerhed om, temperaturen var konstant ved stuetemperatur, da temperaturen godt kan svinge om natten i laboratoriet, hvor analysen forgik.

Udover de angivne fejlkilder har analysemetoden ikke givet anledning til yderligere frustrationer. Baffelkolberne passer sig selv under inkubationen i omkring 5 dage, hvor der blot skal tages prøver ud en gang imellem. Her er altså tale om en meget overskuelig og nem form for fermentering.

3.2.1 Ethanolkoncentration

Et par stykker af baffelkolberne sugede vand op under analysen, og måtte derfor kasseres. Dette betyder at der i tabel E.3 på side 29 er blevet udeladt nogle resultater – f.eks. er kolben, der var mærket Sakkarose 1, kasseret helt. Derudover er der blevet udeladt et par resultater, som viste sig at have givet for mange toppe på plottet fra gaschromatografen. De beregnede ethanolkoncentrationer kan ses på figur E.2 på side 30. Her ses det at væksten har foregået hurtigst og bedst ved stuetemperatur. Ved 37°C viser det sig at glucose giver en bedre vækst end sakkarose. Prøven, der hedder Glucose 2, har ikke givet nogen vækst, og undlades derfor i konklusionerne. Denne prøve har enten ikke fået tilsat glucose, eller også er den også blevet fortyndet, ved at suge vand op, under inkubationen.

Alt i alt har det været muligt at frembringe en ethanolkoncentration på 6,38% med glucose ved stuetemperatur. Det kunne have været godt, hvis der havde været flere målinger at gå ud fra, men det er trods alt muligt at se forskellighederne i brugen af substrat og temperatur, selvom der er få målinger.

Analysemetoden er nem at bruge. Man skal dog være opmærksom på plottet fra gaschromatografen, da man f.eks. kan have injekseret prøven for langsomt, og derfor får for mange toppe på plottet.

Konklusion

Generelt gik analyserne som forventet. Det er lykkedes at fremstille både alkalisk phosphatase og ethanol. Dog var det forventet at bioreaktoren ville give større vækst end baffelkolberne, fordi bioreaktoren giver anledning til at optimere *E. coli*'s vækstbehov. pH, ilt-niveau og temperatur kan her holdes konstant, men til trods for dette, ser det ud til, at væksten i baffelkolberne er gået bedre. Til gengæld kan det, som forventet, konkluderes, at det er meget hurtigere og nemmere at lave fermentering med baffelkolber. Disse giver desværre ikke mulighed for så megen kontrol af vækstbetingelserne, og derfor er det på mange punkter mere fornuftigt at bruge en bioreaktor.

Ved fermenteringen med gær er det lykkedes at producere op til 6.4% ethanol. Gærcellerne skal dog bruge længere tid på at opformere sig, og det er derfor en længere proces end at lave alkalisk phosphatase i baffelkolber. Dette kan dog også have sine fordele, idet programmet for prøveudtagning ikke er så presset. Man kan sagtens lave andre analyser samtidig med at man fremstiller ethanol.

Litteratur

DTU – Biotech Academy (2008a). *Gæring*. URL: <http://www.bioteknologi.nu/foedevarer/oel/teori/gaering.aspx>.

— (2008b). *Saccharomyces cerevisiae*. URL: <http://www.bioteknologi.nu/foedevarer/oel/teori/saccharomyces.aspx>.

Eliassen, Anton (2008). *Bestemmelse af ethanol-konc. ved gaskromatografi*.

emu.dk (2008). *EMU Fermentering – 4. Biologiteori*. URL: http://www.emu.dk/gym/tvaers/udspil/natur/fermentering_biologiteori_1.html.

Erhvervsakademi Roskilde (2001). *DNA-Oprensningsmetoder*. URL: http://www.srts.dk/_da-DK/Content/Data/EA\%20indhold/Pdf\%20dokumenter/Gymnasier/DNAoprensning.pdf.

Skadborg, Astrid Koggersbøl og Jenni Sloth (2008a). *Fermentering med E. coli - Fremstilling af alkalisk phosphatase*.

— (2008b). *Fermentering med Saccharomyces cerevisiae - Fremstilling af ethanol*.

Sloth, Jenni (2008). *Fermenteringsprocessen*. Kap. 2.

Stilling, Bodil (2004). *Biokemi og bioteknologi*. 2. udg. Nyt Teknisk Forlag. ISBN: 87-571-2528-7.

Thougaard, Herluf, Verner Varlund og Rene Møller Madsen (2007). *Mikrobiologi – Fødevarer, Hygiejne, Genteknologi*. 2. udg. Nyt Teknisk Forlag. ISBN: 978-87-571-2590-0.

Sikkerhed

Igennem analyserne arbejdes der med forskellige stoffer, der kan være potentielt farlige. Disse stoffers faremærkninger ses nedenfor. De fleste af de analyser, der er brugt i dette tema indeholder reagenser, der skal pH-indstilles vha. koncentreret saltsyre og TRIS. Derfor kan faremærkningen for disse ses nedenfor. Det skal desuden generelt bemærkes, at **alt** mikrobiologisk affald skal autoklaveres.

HCl (koncentreret, 37%)



Ætsningsfare. Irriterer åndedrætsorganerne. Kommer stoffet i øjnene, skylles straks grundigt med vand og læge kontaktes. Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig; vis etiketten, hvis det er muligt.
Affaldsgruppe: X

TRIS



Irriterer øjnene. Irriterer åndedrætsorganerne. Irriterer huden. Kommer stoffet i øjnene, skylles straks grundigt med vand og læge kontaktes. Brug særligt arbejdstøj.
Affaldsgruppe: X

2M NaOH (8%)



Alvorlig ætsningsfare. Kommer stoffet i øjnene, skylles straks grundigt med vand og læge kontaktes. Brug egne beskyttelseshandsker og -briller / ansigtsskærm under arbejdet. Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig; vis etiketten, hvis det er muligt.
Affaldsgruppe: X

Alkalisk phosphatase i baffelkolber

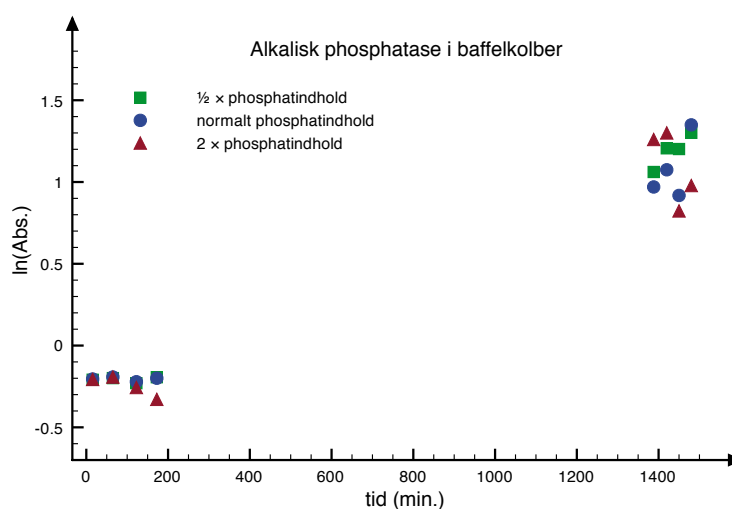
Optisk densitet

tid	$\frac{1}{2}P$	P	2P	$\ln(\frac{1}{2}P)$	$\ln(P)$	$\ln(2P)$
16	0.811, 0.812	0.823, 0.807	0.811, 0.815	-0.209, -0.208	-0.195, -0.214	-0.209, -0.205
65	0.819, 0.820	0.828, 0.822	0.820, 0.830	-0.200, -0.198	-0.189, -0.196	-0.198, -0.186
123	0.794, 0.795	0.800, 0.803	0.744, 0.805	-0.231, -0.229	-0.223, -0.219	-0.296, -0.217
173	0.818, 0.830	0.824, 0.814	0.614, 0.844	-0.201, -0.186	-0.194, -0.206	-0.488, -0.170
1388	2.400, 3.480	3.460, 2.010	3.780, 3.290	0.875, 1.247	1.241, 0.698	1.330, 1.191
1420	3.170, 3.520	2.600, 3.300	2.910, 4.630	1.154, 1.258	0.956, 1.194	1.068, 1.533
1450	2.560, 4.340	4.750, 1.320	2.900, 1.790	0.940, 1.468	1.558, 0.278	1.065, 0.582
1480	3.440, 3.920	3.020, 4.920	3.890, 1.820	1.235, 1.366	1.105, 1.593	1.358, 0.599

Tabel B.1: Alkalisk phosphatase i baffelkolber, dobbeltbestemmelse. P står for phosphatindhold.

tid	1/2P	P	2P	$\ln(1/2P)$	$\ln(P)$	$\ln(2P)$
16	0.812	0.815	0.813	-0.209	-0.205	-0.207
65	0.820	0.825	0.825	-0.199	-0.192	-0.192
123	0.795	0.802	0.775	-0.230	-0.221	-0.256
173	0.824	0.819	0.729	-0.194	-0.200	-0.329
1388	2.940	2.735	3.535	1.061	0.970	1.260
1420	3.345	2.950	3.770	1.206	1.075	1.300
1450	3.450	3.035	2.345	1.204	0.918	0.823
1480	3.680	3.970	2.855	1.301	1.349	0.979

Tabel B.2: Alkalisk phosphatase i baffelkolber gennemsnit. P står for phosphatindhold.



Figur B.1: Alkalisk phosphatase i baffelkolber

Tørstof

Baffel serie A			
	$\frac{1}{2}P$	P	2P
filter	0.0933	0.0925	0.0927
filter+tørstof	0.1047	0.1048	0.1013
tørstof	0.0114	0.0123	0.0086
Baffel serie B			
filter	0.0921	0.0933	0.0922
filter+tørstof	0.0963	0.1043	0.1046
tørstof	0.0042	0.0110	0.0124
Gennemsnit	0.0078	0.0117	0.0105
CV%	65.3%	7.89%	25.6%
Tørstof(g/L)	0.78	1.165	1.05

Tabel B.3: Tørstofbestemmelse ved baffelkolber. P står for phosphatindhold.

Enzymaktivitet

Phosphatindhold	Serie A (Abs)	Serie B (Abs)	Gennemsnit	CV%	enzymaktivitet (U/mL)
$\frac{1}{2} \times \text{normal}$	2.252	2.792	2.522	15.1	2.680
normal	2.096	2.772	2.434	19.6	2.586
$2 \times \text{normal}$	1.244	1.584	1.414	17.0	1.502
Reaktionstid:	3 min.				

Tabel B.4: Absorbansmåling ved enzymaktivitetsbestemmelse.

F-test

Det kunne godt tyde på, at serie B giver højere absorbans end serie A, da CV%'erne er meget høje, så der laves t-test. Først skal varianshomogeniteten undersøges med F-test.

$$H_0: \sigma_a = \sigma_b$$

$$H_1: \sigma_a \neq \sigma_b$$

Teststørrelse:

$$F = \left(\frac{s_{\max}}{s_{\min}} \right)^2 = \left(\frac{0.6917}{0.5426} \right)^2 = 1.625.$$

Acceptområde:

$$\alpha = 5\%: [1; F_{1-\alpha/2}(f_{\max}, f_{\min})] = [1; F_{0.975}(2, 2)] = [1; 39.00]$$

Der er accept, og der er altså varianshomogenitet. Det betyder at s_{pool} må beregnes:

$$s_{\text{pool}}^2 = \frac{s_1^2 \cdot f_1 + s_2^2 \cdot f_2}{f_1 + f_2} = \frac{0.5426^2 \cdot 2 + 0.6917^2 \cdot 2}{2 + 2} = 0.3864.$$

$$s_{\text{pool}} = \sqrt{0.3864} = 0.6216.$$

t-test

$$H_0: \mu_a \geq \mu_b$$

$$H_1: \mu_a < \mu_b$$

Teststørrelse:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{\text{pool}} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} = \frac{1.864 - 2.383}{0.6216 \cdot \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} = -1.023$$

Accept:

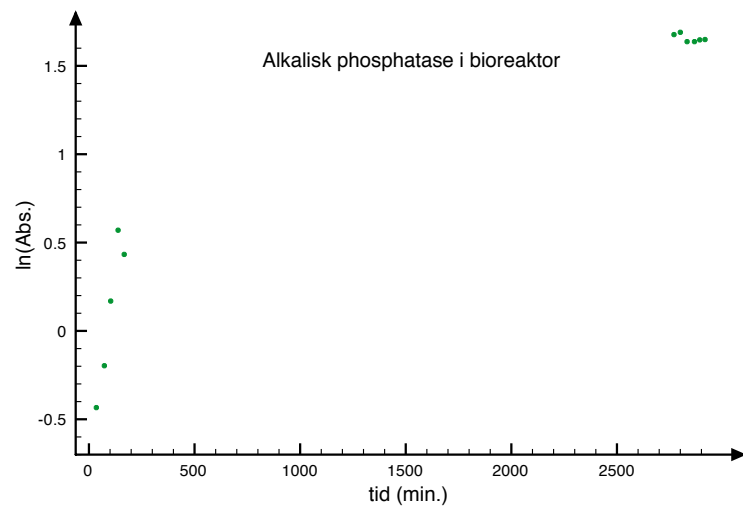
$$\alpha = 5\%: t \geq -t_{1-\alpha}(f_1 + f_2) = -t_{0.975}(4) = -2.776$$

Der er accept, og det kan altså ikke afvises, at middelværdierne faktisk er ens. Man kan altså ikke sige, at serie B har givet højere absorbanser.

Alkalisk phosphatase i bioreaktor

Optisk densitet

tid (min)	Abs.	ln(Abs.)
35	0.648	-0.434
73	0.821	-0.197
103	1.184	0.169
138	1.768	0.570
167	1.542	0.433
2770	5.35	1.677
2800	5.42	1.690
2832	5.14	1.637
2867	5.14	1.637
2892	5.19	1.647
2917	5.20	1.649



Figur C.1: *Alkalisk phosphatase i bioreaktor.*

pH:	7.72
Temp.:	37.1°C
dO ₂ :	199.5%
pH:	7.69
Temp.:	37.0°C
dO ₂ :	182.0%

Tabel C.1: *Aflæste parametre*

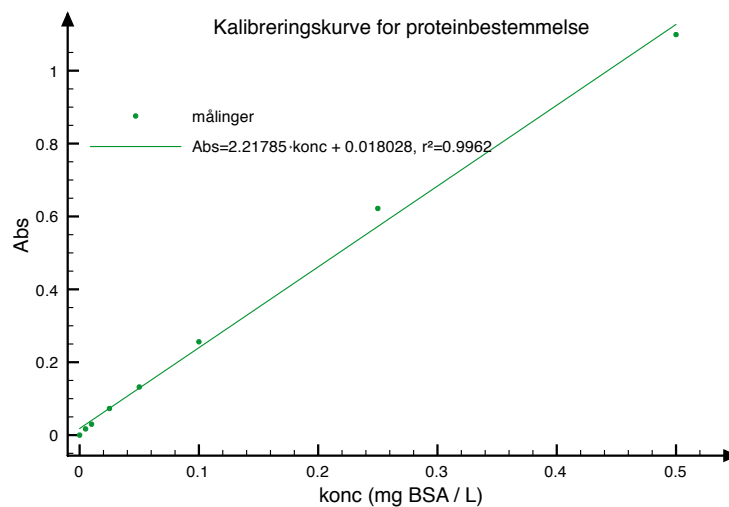
Tørstof

tørstof (g)	0.0031	0.0030	0.0036
gennemsnit	0.0032		
CV%	9.94%		
tørstof (g/L)	0.323		

Tabel C.2: *Tørstofbestemmelse for E. coli i bioreaktor*

Proteinkoncentration

mg BSA / L	Abs.
0.0	0.000
0.005	0.017
0.010	0.030
0.025	0.073
0.05	0.132
0.10	0.256
0.25	0.622
0.50	1.099



Figur C.2: Kalibreringskurve for proteinbestemmelse.

Kalibreringskurven omskrives til

$$\text{konc.} = \frac{\text{Abs} - 0.018028}{2.21785}, \quad (\text{C.1})$$

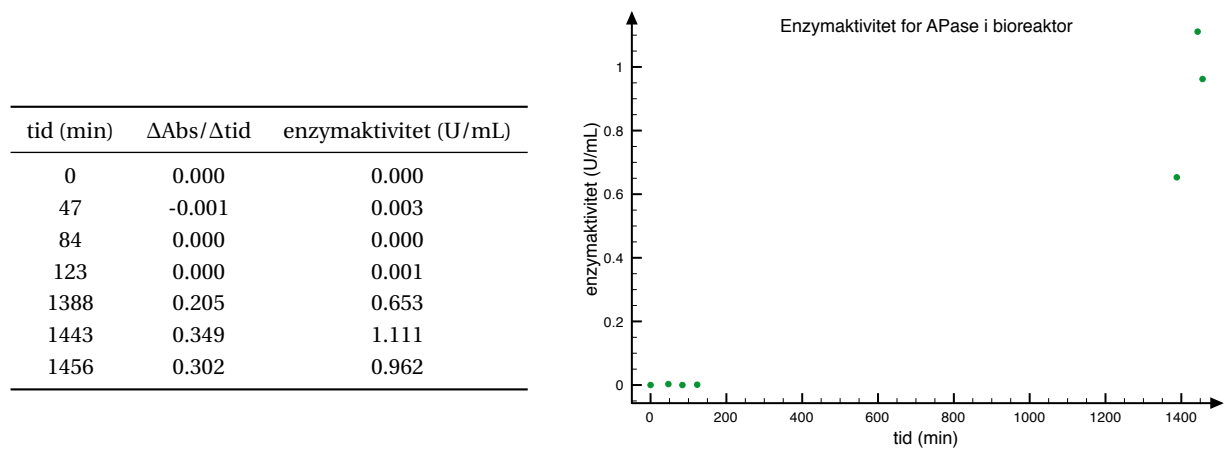
hvorved proteinkoncentrationerne af prøverne kan beregnes (se tabel C.3)

	Abs	konc. (mg/L)
Uden søjle	1.035	0.459
Prøve	0.272	0.115
Buffer 0	0.245	0.102
Buffer 20.1	0.166	0.067
Buffer 20.2	0.150	0.060
Buffer 20.3	0.142	0.056
Buffer 80.1	0.125	0.048
Buffer 80.2	0.174	0.070
Buffer 80.3	0.271	0.114
Buffer 200.1	0.213	0.088
Buffer 200.2	0.384	0.165

Tabel C.3: Proteinkoncentration.

Enzymaktivitet og renhed

Enzymaktiviteten beregnes vha. formel 2.1 på side 8. Kinetikprogrammet på spektrofotometret giver resultatet som $\Delta\text{Abs}/\Delta\text{tid}$, og enzymaktiviteten kan derved beregnes. Den specifikke enzymaktivitet (renheden) kan beregnes med formel 2.2 på side 9. Resultaterne er at finde i tabel C.4 på den følgende side.



Figur C.3: Enzymaktivitet for APase i bioreaktor

	$\Delta\text{Abs}/\Delta\text{tid}$	Enzymaktivitet (U/mL)	Specifik enzymaktivitet (U/mg)
Prøve	0.002	0.005	0.047
Buffer 0	0.000	0.000	0.003
Buffer 20.1	0.001	0.002	0.000
Buffer 20.2	-0.002	0.007	0.117
Buffer 20.3	-0.002	0.006	0.102
Buffer 80.1	0.000	0.001	0.020
Buffer 80.2	0.206	0.655	9.358
Buffer 80.3	0.357	1.137	9.976
Buffer 200.1	0.217	0.690	7.846
Buffer 200.2	0.194	0.619	3.750

Tabel C.4: Enzymaktivitet og specifik enzymaktivitet (renhed) for prøve, der har været igennem oprensning.

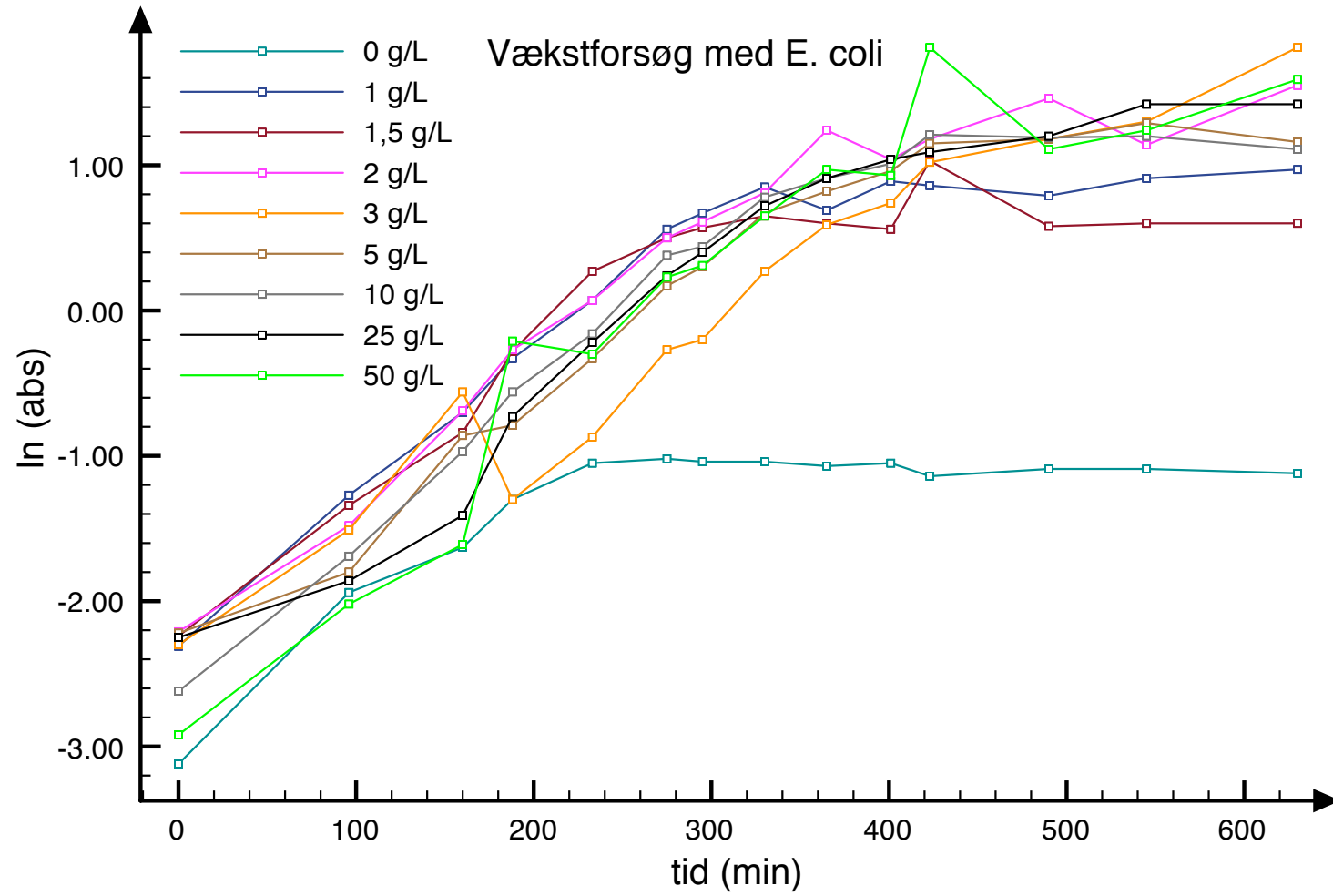
Vækstforsøg med *E. coli*

tid	0g/L	1g/L	1.5g/L	2g/L	3g/L	5g/L	10g/L	25g/L	50g/L
8:00	0.044	0.099	0.106	0.11	0.1	0.109	0.073	0.105	0.054
9:36	0.144	0.282	0.261	0.228	0.221	0.166	0.185	0.155	0.132
10:40	0.195	0.496	0.43	0.502	0.574	0.424	0.38	0.244	0.2
11:08	0.273	0.716	0.756	0.76	0.272	0.456	0.57	0.48	0.808
11:53	0.349	1.074	1.311	1.068	0.42	0.716	0.852	0.804	0.744
12:35	0.361	1.755	1.656	1.645	0.765	1.185	1.465	1.27	1.26
12:55	0.353	1.95	1.77	1.835	0.815	1.35	1.555	1.485	1.365
13:30	0.353	2.335	1.914	2.245	1.31	1.945	2.18	2.055	1.914
14:05	0.343	1.985	1.824	3.465	1.81	2.26	2.485	2.475	2.64
14:41	0.35	2.43	1.752	2.835	2.1	2.604	2.736	2.82	2.532
15:03	0.32	2.358	2.808	3.255	2.783	3.146	3.355	2.981	6.116
16:10	0.337	2.196	1.788	4.2975	3.267	3.267	3.278	3.333	3.025
17:05	0.336	2.478	1.83	3.1125	3.652	3.63	3.311	4.136	3.443
18:30	0.325	2.634	1.824	4.695	6.138	3.201	3.025	4.147	4.884

Tabel D.1: Vækstforsøg med *E. coli*. Optisk densitet.

tid	0g/L	1g/L	1.5g/L	2g/L	3g/L	5g/L	10g/L	25g/L	50g/L
8:00	-3.12	-2.31	-2.24	-2.21	-2.30	-2.22	-2.62	-2.25	-2.92
9:36	-1.94	-1.27	-1.34	-1.48	-1.51	-1.80	-1.69	-1.86	-2.02
10:40	-1.63	-0.70	-0.84	-0.69	-0.56	-0.86	-0.97	-1.41	-1.61
11:08	-1.30	-0.33	-0.28	-0.27	-1.30	-0.79	-0.56	-0.73	-0.21
11:53	-1.05	0.07	0.27	0.07	-0.87	-0.33	-0.16	-0.22	-0.30
12:35	-1.02	0.56	0.50	0.50	-0.27	0.17	0.38	0.24	0.23
12:55	-1.04	0.67	0.57	0.61	-0.20	0.30	0.44	0.40	0.31
13:30	-1.04	0.85	0.65	0.81	0.27	0.67	0.78	0.72	0.65
14:05	-1.07	0.69	0.60	1.24	0.59	0.82	0.91	0.91	0.97
14:41	-1.05	0.89	0.56	1.04	0.74	0.96	1.01	1.04	0.93
15:03	-1.14	0.86	1.03	1.18	1.02	1.15	1.21	1.09	1.81
16:10	-1.09	0.79	0.58	1.46	1.18	1.18	1.19	1.20	1.11
17:05	-1.09	0.91	0.60	1.14	1.30	1.29	1.20	1.42	1.24
18:30	-1.12	0.97	0.60	1.55	1.81	1.16	1.11	1.42	1.59

Tabel D.2: Vækstforsøg med *E. coli*. $\ln(\text{optisk densitet})$.

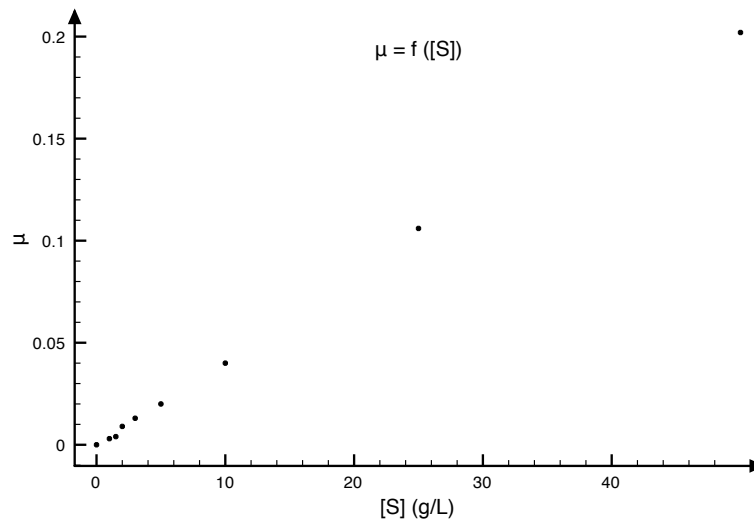


Figur D.1: Vækstforsøg med *E. coli*

Beregning og plot af μ

[S] (g/L)	$\mu_{\max}$	K_m (min)	μ	$[S]^{-1}$	μ^{-1}
0	-1.00	89	0.000	-	-
1	0.90	275	0.003	1.000	306.667
1.5	0.80	286	0.004	0.667	239.583
2	1.47	308	0.009	0.500	105.442
3	1.88	415	0.013	0.333	74.113
5	1.38	335	0.020	0.200	49.275
10	1.28	309	0.040	0.100	24.922
25	1.48	325	0.106	0.040	9.459
50	1.59	344	0.202	0.020	4.956

Tabel D.3: Beregning af μ



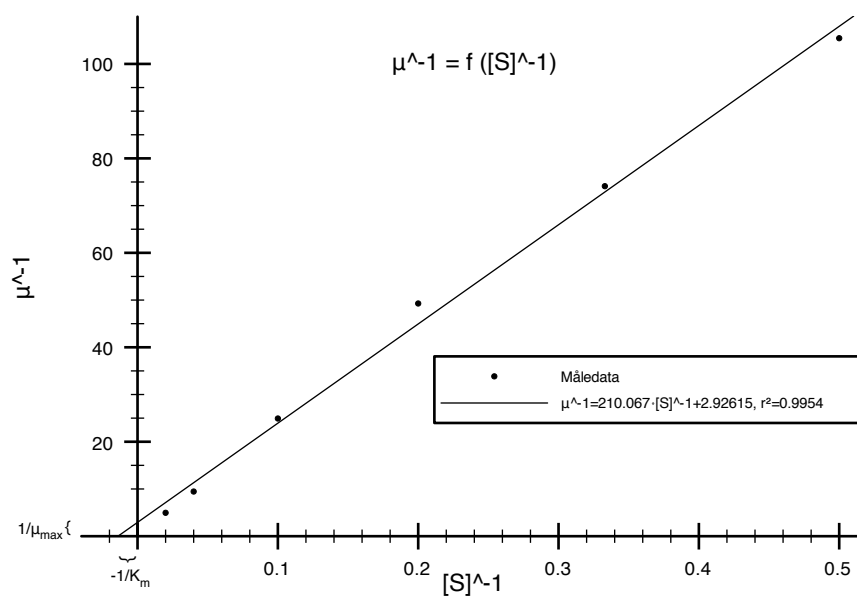
Figur D.2: Plot af μ og [S]

Liniens ligning fra figur D.3 på næste side er $\mu^{-1} = 210.067 \cdot [S]^{-1} + 2.92615$. Som det fremgår af figuren, er $1/\mu_{\max}$ lig skæringen med y-aksen. $\mu_{\max}$ kan altså beregnes:

$$\mu_{\max} = \frac{1}{2.92615} = 0.3417459802 \approx 0.342.$$

Fra samme figur ses det, at $-1/K_m$ findes ved at sætte $\mu^{-1} = 0$. Teoretisk set kan dette ikke lade sig gøre, idet μ så skulle være uendelig stor, men i denne sammenhæng vælger vi bare at tænke på μ^{-1} som en y-koordinat, og så kan $-1/K_m$ findes:

$$\begin{aligned} \frac{-1}{K_m} &= \{x : 210.067 \cdot x + 2.92615 = 0\} \\ \Leftrightarrow \frac{-1}{K_m} &= \frac{-2.92615}{210.067 \text{ g/L}} \\ \Leftrightarrow K_m &= \frac{210.067 \text{ g/L}}{2.92615} = 71.789552825 \text{ g/L} \approx 71.8 \text{ g/L}. \end{aligned}$$

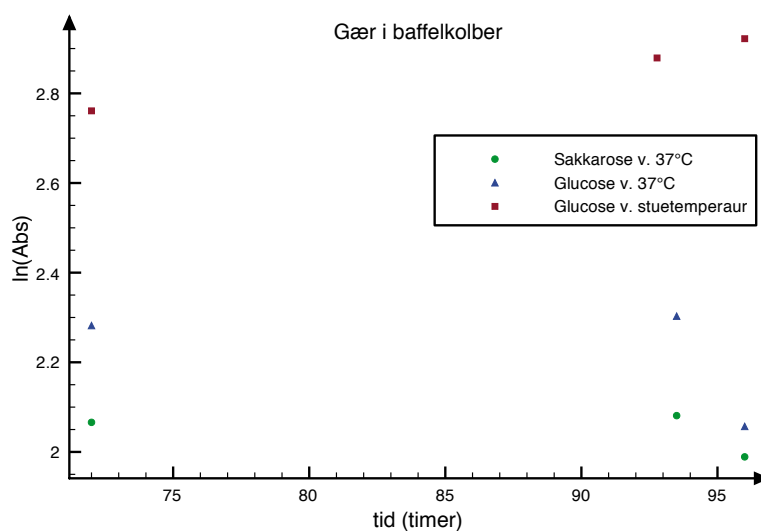


Figur D.3: Plot af μ^{-1} og $[S]^{-1}$

Gær i baffelkolber

	tid (timer)	Abs	ln(Abs)	gennemsnit	CV%
Målinger ved 37°C					
Sakkarose 1	72	11,200	2,416	2,066	23,97%
	93,5	12,150	2,497	2,081	28,32%
	96	9,680	2,270	1,989	19,97%
Sakkarose 2	72	5,560	1,716		
	93,5	5,280	1,664		
	96	5,520	1,708		
Glucose 1	72	9,800	2,282	2,282	
	93,5	10,000	2,303	2,303	
	96	7,820	2,057	2,057	
Glucose 2	72	0,783	-0,245		
	93,5	0,481	-0,732		
	96	0,236	-1,444		
(Glucose 2-målingerne afvises, da kulturen har suget vand op)					
Målinger ved stuetemperatur					
Glucose 3	72	16,360	2,795	2,761	1,75%
	92,78	18,000	2,890	2,879	0,55%
	96	17,520	2,863	2,922	2,86%
Glucose 4	72	15,280	2,727		
	92,78	17,600	2,868		
	96	19,720	2,982		

Tabel E.1: Optisk densitet af gær i baffelkolber



Figur E.1: Optisk densitet af gær i baffelkolber

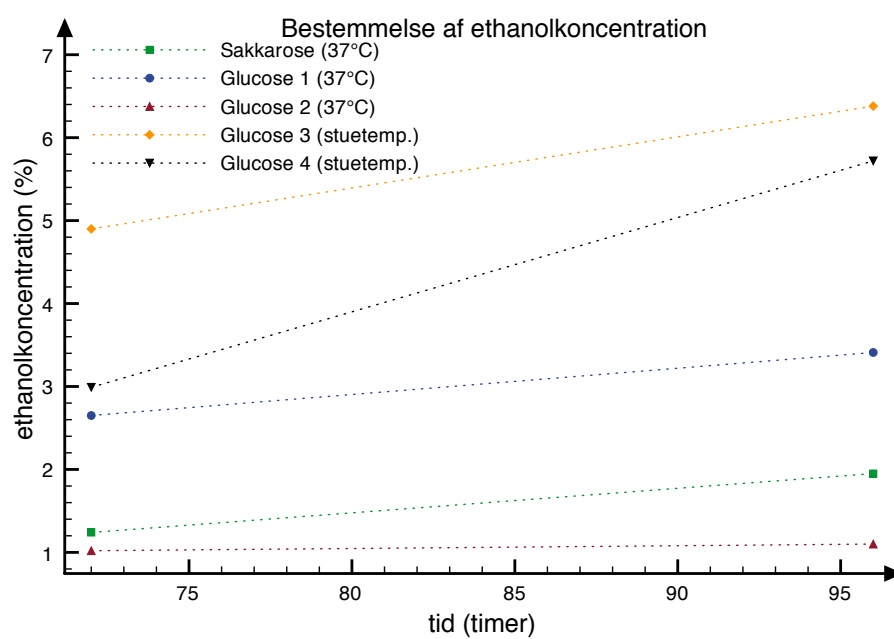
Ethanolkoncentration

		konc. (% v/v)	tR (min)	Areal ($\mu V \cdot s$)	f_{rel}	gennemsnit	CV%
Standard 1.1	Ethanol	2,00%	1,595	771217,6	1,399	1,408	0,76%
	1-butanol	0,50%	1,757	269659,5			
Standard 1.2	Ethanol	2,00%	1,6	847239,8	1,423		
	1-butanol	0,50%	1,762	301418,2			
Standard 2.1	Ethanol	1,00%	1,595	863263,3	1,404		
	1-butanol	0,50%	1,756	606014,6			
Standard 2.2	Ethanol	1,00%	1,599	241093	1,405		
	1-butanol	0,50%	1,768	169310,2			

Tabel E.2: Standarder til bestemmelse af ethanolkoncentration

CIS	0,50%						
mL prøve	0,50						
Målekolbe	1,0						
FE	2						
Prøve	tid (timer)	A _{ethanol}	A _{1-butanol}	fort-C _{Ethanol}	C _{Ethanol}	Middelv.	CV%
Målinger ved 37°C.							
Sakkarose 2.1.1	72	261695,6	296176,12	0,62%	1,24%	1,24%	0,00%
Sakkarose 2.1.2	72	-	-	-	-		
Sakkarose 2.2.1	96	389434,8	282793,47	0,97%	1,94%	1,95%	1,16%
Sakkarose 2.2.2	96	821371,6	586724,35	0,99%	1,97%		
Glucose 1.1.1	72	336038	174861,78	1,35%	2,70%	2,65%	2,70%
Glucose 1.1.2	72	862623,4	466365,9	1,30%	2,60%		
Glucose 1.2.1	96	849761,4	351316,51	1,70%	3,40%	3,41%	0,43%
Glucose 1.2.2	96	387679,6	159317,47	1,71%	3,43%		
Glucose 2.1.1	72	137871,6	189678,9	0,51%	1,02%	1,02%	0,21%
Glucose 2.1.2	72	109034,8	149569,36	0,51%	1,03%		
Glucose 2.2.1	96	253113,2	320191,75	0,56%	1,11%	1,10%	1,64%
Glucose 2.2.2	96	118352,7	153235,04	0,54%	1,09%		
Målinger ved stuetemperatur							
Glucose 3.1.1	72	1016716,14	292106,9	2,45%	4,90%	4,90%	0,00%
Glucose 3.1.2	72	-	-	-	-		
Glucose 3.2.1	96	696878	167828,1	2,92%	5,84%	6,38%	11,81%
Glucose 3.2.2	96	813584,76	165720,93	3,46%	6,91%		
Glucose 4.1.1	72	1388007,09	648817,01	1,51%	3,01%	2,99%	1,02%
Glucose 4.1.2	72	1287300,6	610515,9	1,48%	2,97%		
Glucose 4.2.1	96	688203,2	171315,06	2,83%	5,65%	5,72%	1,52%
Glucose 4.2.2	96	1078905,83	262861,86	2,89%	5,78%		

Tabel E.3: Prøver til bestemmelse af ethanolkoncentration



Figur E.2: *Bestemmelse af ethanolkoncentration*