



Saccharomyces Cerevisiae

aerobe Backhefefermentation



Einleitung

Die Backhefe gehört zu den Protoascomyceten und zwar zur physiologischen Rasse von *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* ist eine Crabtree-positive Hefe, das heißt bei einer hohen Substratkonzentration tritt die Repression von oxidativen Enzymen auf. Dadurch kommt es zur Abnahme der Sauerstoffaufnahme und die Glucose wird zu Ethanol metabolisiert. Dieser unerwünschte Stoffwechselweg kann über ein geregeltes Zulaufverfahren reduziert werden. Die Zufütterungsrate des Substrates wird dabei der spezifischen Wachstumsrate der Hefe angepasst.

1. Equipment

- BIOSTAT® Aplus 2L, MO-Ausstattung
- Waage (z. B. Sartorius CP-Modelle)
- pH-Meter
- Photometer
- Magnetrührer
- 1 Messkolben 2000 mL
- 1 Messzylinder 50 mL
- 1 Becherglas 250 mL
- 1 Becherglas 50 mL
- 1 Schottflasche 250 mL
- 3 Schottflaschen 500mL mit Edelstahlkopfstück
- 2 Messpipetten 10 mL
- 1 Messpipette 1 mL
- Ethanol-Testkit
- Glucoseanalyzer oder Glucose-Testkit
- Trockenschrank, Mikrowelle oder Moisture Analyzer
- Bäckerhefe

2. Vorbereitung

a) Zeitplan

1. Tag: Herstellung des Kulturmediums und Vorbereitung des Fermenters
2. Tag: Animpfen des Fermenters

b) Bioreaktor | Fermenter

- Kalibrierung und Einbau der pH-Elektrode
- Einbau der pO₂-Sonde
- Kalibrierung der Pumpen
- Ansetzen und Autoklavieren der Korrekturmittel, Schläuche manuell füllen
- Sterilisation des Kulturgefäßes mit dem Nährmedium
- Kalibrierung der pO₂-Sonde bei Kultivierungstemperatur und -drehzahl
- Sterile Anbindung der Peripherie

c) Medium

Es werden 2000 mL Nährmedium vorbereitet:

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g/L
K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	2,0 g/L
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 g/L
KCl	2,0 g/L
Hefeextrakt	0,1 g/L
Glucose * H ₂ O	11 g/L
H ₂ SO ₄	5,0 mol/L

Salze auf 2 L hochrechnen und in ca. 1500 mL dest. Wasser und 10 mL Schwefelsäure (1 mol/L) lösen. Anschließend mit 1M NaOH den pH-Wert der Lösung auf pH = 4,5 einstellen, 1 mL Antischaummittel zugeben und mit dest. Wasser auf 1900 mL auffüllen. Salzlösung in das vorbereitete Kulturgefäß überführen und bei 121 °C für 20 min. autoklavieren.

22 g Glucose in 100 mL dest. Wasser lösen und ebenfalls bei 121 °C für 20 min. autoklavieren. Im Anschluss die Glucoselösung steril in das Kulturgefäß überführen.

d) Inokulum

Für das Inokulum werden 15 g Bäckerhefe in 40 mL sterilem Nährmedium unter Rühren mit einem Spatel aufgeschlämmt.

e) Korrekturmittel

Antischaum	1.0% (w w) PEG
Säure	0.1% (w w) H ₂ SO ₄
Lauge	1 mol/L NaOH

f) Kulturbedingungen

Temperaturvolumen	2 L
Temperatur	30° C
pO ₂	40%, geregelt
pH-Wert	4,5, geregelt
Belüftung	ab 250 rpm
Rührer	ab 0.5 vvm

3. Analytik

Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgt mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Probe sollte so verdünnt werden, dass die gemessene Extinktion zwischen 0,2 und 0,4 liegt. Die Messung erfolgt in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm.

Die Optische Dichte errechnet sich nach folgender Formel:

$$OD_{600nm} = E * F [-]$$

mit E = gemessene Extinktion
F = Verdünnungsfaktor

Bestimmung der Biotrockensubstanz

Für die Bestimmung der Biotrockensubstanz stehen verschiedene Methoden zur Auswahl:

- BTS-Bestimmung mit dem Moisture Analyzer (Sartorius)
- BTS-Bestimmung im Trockenschrank
- BTS-Bestimmung in der Mikrowelle

Bestimmung der Glucosekonzentration

Glucose kann mittels
- Glucoseanalyzer (z. B. YSI-Modelle) oder
- mit dem Testkit Nr. 71 6251 (Roche Diagnostics) laut Herstellerprotokoll durchgeführt werden.

Bestimmung der Ethanolkonzentration

Die Ethanolbestimmung erfolgt mit dem Ethanol-Testkit Nr. 176290 (Roche Diagnostics) laut Herstellerprotokoll. In diesem UV-Test wird Ethanol enzymatisch zu Acetaldehyd oxidiert. Die photometrische Bestimmung von Ethanol mit dem Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) zeichnet sich durch hohe Spezifität, große Zuverlässigkeit und einfache Durchführung aus.

Sartorius Stedim Biotech GmbH
August-Spindler-Strasse 11
37079 Goettingen, Germany

Phone +49.551.308.0

Fax +49.551.308.3289

www.sartorius-stedim.com

USA Toll-Free +1.800.368.7178

UK +44.1372.737159

France +33.442.845600

Italy +39.055.63.40.41

Spain +34.91.3586102

Japan +81.3.3740.5407

Specifications subject to change
without notice. Printed and copyrighted
by Sartorius Stedim Biotech GmbH

W · G

Publication No.: SBT1009-d09061

Order No.: 85034-538-44

Ver. 06 | 2009