

Udbytteberegning ved fermentering

Opgaven bygger videre på Bioteknologi 2, side 11-18.

Ved fermenteringsprocesser er det af stor teknisk og økonomisk betydning af kunne optimere udbyttet i forhold til de råvarer man anvender. Udbyttet, yield (Y), kan beregnes eller måles. Ud fra teoretiske forudsigelser og målinger på forsøgsfermentorer kan man opstille modeller for hvordan udbyttet bliver under forskellige vækstbetingelser. Derefter kan man sætte storskala-fermentoren op med en passende temperatur, luftgennembobling, omrøring, pH, næringsstoffer og tid. Se beskrivelsen af en fermentor i Bioteknologi 2, side 17.

Det teoretiske udbytte tager ofte udgangspunkt i cellernes energiomsætning.

Mikroorganismene anvender den næring de optager som energikilde, til bevægelse, membran-pumper, transport i cellen, reparation og som byggesten til vækst. Desuden vil der være et varmetab ved processerne.

Hos mikroorganismer kan en betydelig større del af energien anvendes til vækst end den kan hos os, dels fordi de ikke opretholder en høj kropstemperatur, dels fordi de er encellede og ikke har det samme behov for interne transport- og kommunikationssystemer, fx blodkredsløb og nervesystem.

Kataboliske processer

Ved fermentering med svampe og bakterier anvender man oftest carbohydrater, som regel mono- eller disaccharider som energikilde. De nedbrydes ved de kataboliske processer, gæring og respiration, se Bioteknologi 2, side 19.

Når man regner på energiudbyttet fra de kataboliske processer, regner man ofte i ATP eller ATP-ækvivalenter, dvs. hvor meget ATP energiudbyttet svarer til.

Opgaver

Inddrag Bioteknologi 2, side 11.

1. Hvor mange ATP får en gærcele ud af et molekyle glucose hvis det omsættes ved
 - alkoholgæring?
 - respiration?
2. Hvor mange mol ATP får en gærkultur ud af et mol glucose hvis det omsættes ved
 - alkoholgæring?
 - respiration?
3. Hvor mange mol ATP får en kultur af mælkesyrebakterier ud af et mol lactose (disaccharid) hvis det omsættes ved mælkesyregæring? (Se side 38).

Anaboliske processer

Vækst og produktion af cellens molekyler sker gennem de anaboliske processer.

Hos mikroorganismer skelner man mellem dannelse af molekylernes grundenheder som aminosyrer, monosaccharider, nucleotider og fedtsyrer, og polymeriseringen af dem fx ved proteinsyntesen eller DNA-replikation, se Bioteknologi 1, side 14 og 54-59.

Man opgør ofte udbyttet som enten udbytte pr. mol ATP (Y_{ATP}), eller pr. mol substrat som forbruges (Y_{substrat}).

Mikroorganismernes tilvækst måles normalt som gram tørvægt. Ved fermentering vil Y_{ATP} typisk være omkring 9-10 gram tørvægt pr. mol ATP.

Figur 1 viser hvor meget energi der går til dannelse af de forskellige molekyler.

Stof	% af cellens tørvægt	ATP forbrugt pr. monomer	ATP forbrugt pr. g celle
Protein	60	5	27.250
Binding af aminosyrer til tRNA		2	
Dannelse af mRNA ved transkription		1	
Translation i ribosomer		2	
Nucleinsyrer (DNA og RNA)	20	5	3350
Dannelse af et nucleotid		3	
Polymerisering af nucleotider		2	
Lipider	5	1	190
Polysaccharider	5	2	600
Peptidoglycan (i bakteriers cellevæg)	10	10	1000
I alt	100		32390

Figur 1. En typisk bakteries sammensætning og ATP-forbrug til dannelse af cellens molekyler.

Opgaver

1. Repetér vha. Bioteknologi 1 hvordan cellen danner protein ved proteinsyntesen. Hvordan passer det med hvordan energiforbruget er opdelt i figur 1?
2. Repetér vha. Bioteknologi 1 hvordan cellerne danner DNA ved replikationen. Hvordan passer det med hvordan energiforbruget er opdelt i figur 1?

Enzymet glucoseoxidase (GOx), som du støder på i Bioteknologi 2, Tema 4, består af 583 aminosyrer.

3. Beregn hvor mange ATP-molekyler der teoretisk skal til for at danne et GOx-molekyle.
4. Beregn hvor mange glucosemolekyler der teoretisk skal til for at danne et GOx-molekyle ved henholdsvis respiration og alkoholgæring.
5. Beregn Y_{substrat} når substratet er glucose, ud fra oplysningerne om Y_{ATP} og ATP-udbyttet pr. mol glucose.
6. Hvilke produktionsmæssige overvejelser giver denne viden anledning til?

Primære og sekundære metabolitter

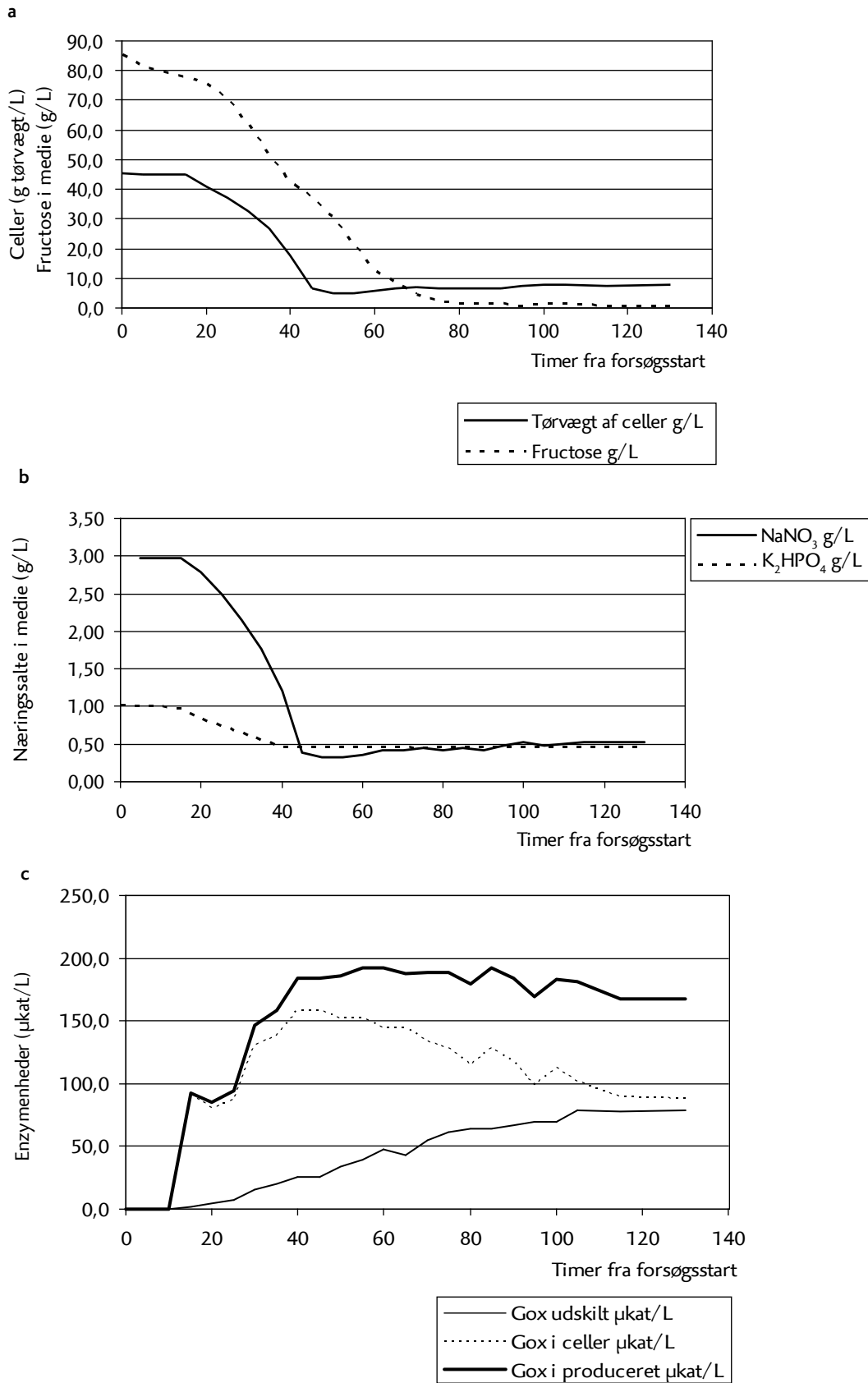
Læs om primære og sekundære metabolitter i Bioteknologi 2, side 11-12 og 46-47.

Ved nogle produktioner, fx ølproduktion, er produktet en primær metabolit som dannes sideløbende med mikroorganismernes vækst.

I andre tilfælde, fx når man ønsker at producere glucoseoxidase, er der tale om en sekundær metabolit. Mange sekundære metabolitter dannes først af cellerne i den stationære fase. Eksempler på dette er produktion af penicillin og andre antibiotika.

Figur 2 og 3 viser resultater fra et forsøg med produktion af glucoseoxidase. Produktionsorganismen er en gensplejset *Aspergillus niger*, og forsøgene er lavet i en 5 L-forsøgsfermentor. Energi- og carbonkilden i mediet er fructose, nitrogenkilden er NaNO_3 og fosfatkilden er K_2HPO_4 .

Se figur 2 a-c på næste side.



Figur 2. Resultater fra forsøg med produktion af glucoseoxidase (GOx) i *Aspergillus niger*. a. Tilvækst i cellebiomasse og forbrug af fructose. b. Forbrug af NaNO_3 og K_2HPO_4 . c. Produceret mængde af GOx i cellerne, udskilt i mediet og totalt. Enzymmængden er målt som katalytisk aktivitet, $\mu\text{kat/L}$.

Næringsstofforbrug					Produkt		
Tid	Tørvægt af celler g/L	Fructose (C-kilde) g/L	NaNO ₃ (N-kilde) g/L	K ₂ HPO ₄ (P-kilde) g/L	GOx i mediet µkat/L	GOx i celler µkat/L	GOx produceret i alt µkat/L
timer							
0	45,5	85,4	3,01	1,02	0,0		0,0
5	45,0	81,3	2,98	1,00	0,0		0,0
10	45,0	79,7	2,98	1,00	0,0		0,0
15	45,0	78,1	2,98	0,98	1,5	91,4	92,9
20	41,1	75,7	2,78	0,83	4,6	80,7	85,3
25	37,1	70,1	2,49	0,75	7,6	86,8	94,4
30	32,7	62,0	2,16	0,65	15,2	131,0	146,2
35	26,7	51,5	1,77	0,56	19,8	138,6	158,4
40	17,8	42,6	1,21	0,47	25,9	158,4	184,3
45	6,4	37,0	0,39	0,46	25,9	158,4	184,3
50	4,9	30,5	0,32	0,46	33,5	152,3	185,8
55	4,9	20,9	0,32	0,46	39,6	152,3	191,9
60	5,9	12,8	0,36	0,46	47,2	144,7	191,9
65	6,4	8,8	0,42	0,46	42,6	144,7	187,3
70	6,9	4,7	0,42	0,46	54,8	134,0	188,8
75	6,4	2,3	0,45	0,45	60,9	127,9	188,8
80	6,4	1,5	0,42	0,46	64,0	115,7	179,7
85	6,4	1,5	0,45	0,47	64,0	127,9	191,9
90	6,4	1,5	0,42	0,46	67,0	117,3	184,3
95	7,4	1,5	0,49	0,46	70,0	99,0	169,0
100	7,9	1,5	0,52	0,47	70,0	112,7	182,7
105	7,9	1,5	0,49	0,46	79,2	102,0	181,2
115	7,4	0,7	0,52	0,46	77,7	89,8	167,5
130	7,9	0,7	0,52	0,46	79,2	88,3	167,5

Figur 3. Talmateriale fra forsøgene i figur 3.

Opgaver

1. Identificér vækstfaserne ved at sammenligne med Bioteknologi 2, side 11.

Kopier tallene fra skemaet over i et regneark.

2. Lav et diagram som viser vækstkurven for den eksponentielle vækstfase.
3. Find ved at indsætte en tendenskurve, forskriften for tilvæksten, se Bioteknologi 2, side 12.
4. Beregn generationstiden, T_2 , i den eksponentielle vækstfase ud fra resultaterne, se Bioteknologi 2, side 12.
5. Forklar hvad fructose bruges til i cellerne.
6. Forklar sammenhængen mellem kurverne i figur 2a.
7. Hvilken betydning har fructosekoncentrationen for svampenes vækstrate? Se Bioteknologi 2, side 15.
8. Forklar hvad N og P bruges til i cellerne.
9. Forklar forløbet af kurverne i figur 2b.
10. Forklar forløbet af kurverne i figur 2c.
11. Hvordan ændrer produktionen af glucoseoxidase sig gennem forløbet?
12. Dannes glucoseoxidase i vækstfasen eller i den stationære fase?
13. Hvilken betydning har denne viden for produktionsplanlægning og planlægning af downstream-processer, se Bioteknologi 2, side 18?
14. Beregn Y_{substrat} ved afslutningen af den eksponentielle vækstfase og ved afslutningen af forsøget. Enheden vil være $\mu\text{kat/g fructose}$.
15. Hvornår vil Y_{substrat} være størst?
16. Kan der alligevel være grunde til at afslutte produktionen på et andet tidspunkt?

Kilder

- Brock, T. D. og Madigan M. T.: Biology of Microorganisms, Prentice Hall Intl., 1988.
- El-Enshasy, H. A.: Optimization of Glucose Oxidase production and excretion by recombinant *Aspergillus niger*, phd-afhandling, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 1998.