

# Ablaufplan Fermentation und Fotometrie

## 1.4 Abnutschen des Hydrolysats

Nutschen Sie nach Beendigung der Hydrolyse das Hydrolysats ab.



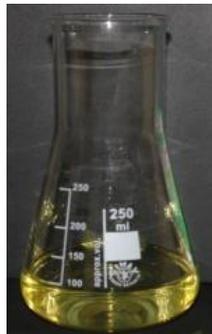
## 2. Fermentation

### 2.1 Vorbereitung des Nährmediums (2-fach konzentriert)

Siehe Lehrer-Ablaufplan

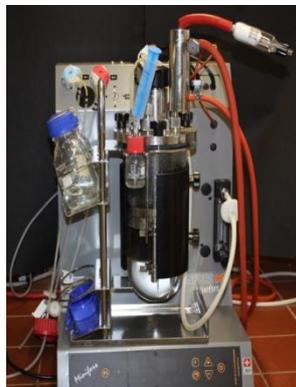
### 2.2 Ansetzen der Vorkultur

1. Geben Sie zu 50 ml 2-fach konzentriertem Nährmedium und 50 ml  $H_2O_{dest.}$  20 g Frischhefe.
2. Resuspendieren Sie die Frischhefe.



### 2.3 Fermentation im Bioreaktor

1. Befüllen Sie den Fermenter mit:
  - 800 ml Nährmedium (2-fach konzentriert) und
  - 800 ml des abgenutzten Hydrolysats.
2. Starten Sie die Fermentation mit den folgenden Parametern:
  - anaerob
  - 30 °C
  - 200 rpm
  - pH 4,5



Geben Sie die 100 ml Vorkultur erst in den Fermenter, nachdem die Parameter eingestellt sind!

## 3. Fotometrische Messungen

### 3.1 Probenentnahme

Es werden Proben zu Beginn ( $t_0$ ) und während der Fermentation nach 15 ( $t_1$ ), 45 ( $t_2$ ), 90 ( $t_3$ ) und 150 ( $t_4$ ) Minuten entnommen.

1. Spülen Sie das Probenentnahmerohr jeweils vor der eigentlichen Probenentnahme durch Entnahme von 5 ml Fermentationsmedium.
2. Verwerfen Sie diese 5 ml.
3. Entnehmen Sie erneut 5 ml Fermentationsmedium.
4. Überführen Sie 1 ml des Mediums für die Glucose- und Ethanolbestimmung (3.2.1) und 1 ml für die OD-Messung (3.2.2) in ein Reaktionsgefäß und stellen Sie dieses auf Eis.
5. Zentrifugieren Sie eines der beiden Reaktionsgefäße für eine Minute bei 14000 rpm.
6. Überführen Sie 500  $\mu$ l des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß.
7. Frieren Sie den Überstand bei -20 °C bis zur fotometrischen Bestimmung von Glucose bzw. Ethanol ein.

### 3.2 Fotometrische Bestimmung

#### 3.2.1 Bestimmung von Ethanol und Glucose

1. Beachten Sie während der Ethanolbestimmung:  
Nach jedem Pipettierschritt und während der Messung muss ein Deckel auf der Küvette sein!
2. Bestimmen Sie die Konzentration von Glucose und Ethanol gemäß den beigefügten Pipettierschemata.



#### 3.2.2 Bestimmung der Optischen Dichte

1. Bestimmen Sie den Leerwert mit 1 ml 1-fach Nährmedium bei 600 nm.
2. Entnehmen Sie von 1 ml Probe 125  $\mu$ l und geben Sie 875  $\mu$ l 1-fach Nährmedium hinzu.
3. Messen Sie die OD der Probe bei 600 nm.
4. Übertragen Sie die gemessenen Werte in das beigefügte Datenblatt.