

# Postup fermentácie a fotometrické stanovenie

## 1.4 Filtrácia

### hydrolyzátu

Po hydrolyze prefiltrujte hydrolyzát cez Nutsche filter (Büchnerov lievik).



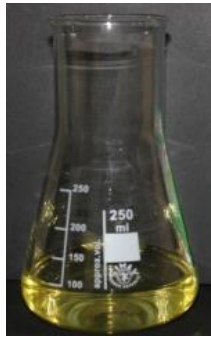
## 2. Fermentácia

### 2.1 Príprava kultivačného média (dvojnásobne koncentrované)

Pozrite materiál pre učiteľov.

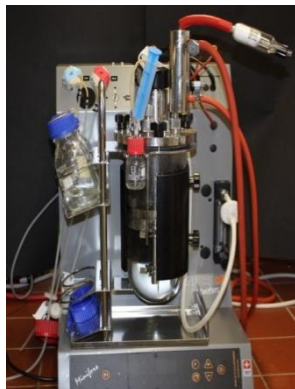
### 2.2 Príprava kultúry

1. Pridajte 20 g čerstvých kvasiniek do 50 ml dvojnásobne koncentrovaného kultivačného média a 50 ml destilovanej H<sub>2</sub>O.
2. Zmes s kvasinkami zamiešajte.



### 2.3 Fermentácia v bioreaktoroch

1. Naplňte fermentor
  - 800 ml kultivačným médiom (dvojnásobne koncentrovaným),
  - 800 ml filtrovaným hydrolyzátom.
2. Začnite fermentáciu s nasledujúcimi podmienkami:
  - anaeróbne
  - 30 °C
  - 200 rpm
  - pH 4,5



Až po nastavení podmienok vo fermentore je možné doň pridať 100 ml kultúry!

## 3. Fotometrické merania

### 3.1 Odoberanie vzorky

Vzorky odoberte na začiatku fermentácie ( $t_0$ ) a po 15 ( $t_1$ ), 45 ( $t_2$ ), 90 ( $t_3$ ) a 150 ( $t_4$ ) minútach.

1. Pred každým odobratím vzorky opláchnite pipetu tým, že odoberiete 5 ml fermentačného média.
2. Odoberajte 5 ml vzorky vylejte.
3. Znova odoberte 5 ml fermentačného média.
4. Odpipetujte 1 ml média na stanovenie glukózy a etanolu (3.2.1) a ďalší 1 ml na meranie optickej denzity (OD) (3.2.2) do 2 reakčných skúmaviek, ktoré preniesiete na ľad.
5. Skúmavky centrifugujte po dobu 1 minúty pri 14000 rpm.
6. Po centrifugácii napipetujte po 500  $\mu$ l supernatantu do nových skúmaviek.
7. Zmrazte skúmavky na -20 °C do momentu fotometrického stanovenia glukózy a etanolu.

### 3.2 Fotometrické stanovenie

#### 3.2.1 Stanovenie etanolu a glukózy

1. Počas stanovenia etanolu dávajte pozor: po každom pipetovaní a počas merania musí byť kvveta uzavretá vrchnákom!
2. Stanovte koncentráciu glukózy a etanolu podľa priloženej pipetovacej schémy.



#### 3.2.2 Stanovenie optickej denzity

1. Stanovte hodnotu slepej vzorky s 1 ml kultivačného média (1x) pri 600 nm.
2. Odoberte 125  $\mu$ l z 1 ml vzorky a pridajte 875  $\mu$ l (1x) kultivačného média.
3. Zmerajte OD vzorky pri 600 nm.
4. Zapište namerané hodnoty do priloženého pracovného listu.