

HANDS ON BIOTECH

EKSPERIMENT 2

Bioethanol fra alternative carbonkilder

LONE ALS EGEBO
LARS HAASTRUP PEDERSEN

TEORI
ELEVVEJLEDNING
LÆRERVEJLEDNING

EKSPERIMENT 2

Bioethanol fra alternative carbonkilder

Hands on Biotech - Bioethanol fra alternative carbonkilder

© Lone Als Egebo, Lars Haastrup Pedersen, Aalborg Universitet

Forfattere og faglig redaktion:

Lone Als Egebo og Lars Haastrup Pedersen

Illustrationer: Lotte Thorup

Kemiske strukturtegninger og reaktionsskemaer: Hanne Wolff

BioRender-illustrationer: se kildeliste

Omslag: Lotte Thorup

Shutterstock.com: Chokniti-Studio

Grafisk tilrettelægning: Lotte Thorup

1. udgave, 1. oplag 2023

ISBN: 978-87-89383-92-7

Udgivet af Aalborg Universitet – Institut for Kemi og Biovidenskab

Projektet er støttet af Novo Nordisk Fonden.

Kildeliste findes på projektets hjemmeside:

<https://www.bio.aau.dk/forskning/projekter/hands-on-biotech>

Dette hæfte er beskyttet i medfør af gældende dansk lov om ophavsret. Kopiering må kun ske i overensstemmelse med loven. Det betyder f.eks. at kopiering til undervisningsbrug kun må ske efter aftale med Copydan Tekst og Node.



Ege-Bøger



Indhold

FORORD	5
--------------	---

TEORI **7**

Gær producerer ethanol ved fermentering	8
Råmaterialer til produktion af bioethanol	8
Forbehandling af råmaterialerne	11
Enzymatisk hydrolyse	11
Ethanolbestemmelse	12
Anvendelse af bioreaktor	13

ELEVVEJLEDNING **13**

Formål	15
Flow	15
DEL A - FORBEHANDLING AF SUBSTRAT (AUTOKLAVERING) ..	16
Materialer	16
Fremgangsmåde	16
DEL B - ENZYMATISK HYDROLYSE	17
Materialer	17
Fremgangsmåde	17
Efterbehandling	18
DEL C - FERMENTERING	18
Materialer pr. gruppe	18
Fremgangsmåde	18
Efterbehandling	19
ARBEJDSSPØRGSMÅL	20
DEL D - ETHANOLBESTEMMELSE	21
Materialer	21
Klargøring af opløsninger (læreren):	21
Fremgangsmåde	21
Efterbehandling	22

LÆRERVEJLEDNING **23**

Læreplanen	23
Teori	23
Flow	24
Kommentarer til eksperimentet	24

Forord

Dette hæfte **Bioethanol fra alternative carbonkilder** er skrevet i tilknytning til udviklingsprojektet 'Hands on Biotech', der er støttet af Novo Nordisk Fonden. Projektet er et samarbejde mellem Aalborg Universitet, Institut for Kemi og Biovidenskab, og konsulentfirmaet Ege-bøger.

Materialet er målrettet undervisningen i bioteknologi/biologi i gymnasiet.

I projektet har deltaget lærere fra følgende nordjyske gymnasier: Aalborg Katedralskole, Aalborghus Gymnasium, Frederikshavn Gymnasium, Hasseris Gymnasium, Hjørring Gymnasium og Thisted Gymnasium.

Fagområdet bioteknologi omhandler teknologisk udnyttelse af biologiske systemer. I 'Hands on Biotech' er der arbejdet med bioteknologien inden for tre hovedområder:

- Fermentering og cellen som fabrik
- Separation og oprensning
- DNA-analyser

Nærværende hæfte knytter sig til hovedområdet 'Fermentering og cellen som fabrik', og består af teori, elevvejledning og lærervejledning til forsøget **Bioethanol fra alternative carbonkilder**.

En særlig tak skal rettes til Jørn Clausen, Aalborghus Gymnasium.

Susan Hove Hansen, Racika Kirshnakumar, Nicolai Sundgaard Bekker, Celine Petersen og Rasmus Hansen Kirkegaard, AAU.

Studentermedhjælpere: Anne Johansen, Anne Kalinka Sand Knudsen, Isabell Raahauge Eriksen, Marie Riisgaard-Jensen, Mikkel Lyng Berndorf, Rikke Brønnum Nielsen, Sofie Zachø Vestergaard, Søren Heidelberg.

Lars Haastrup Pedersen,
Leder af projektet
Lektor, Ph.D.
Institut for Kemi og Biovidenskab
Aalborg Universitet

Lone Als Egebo,
Koordinator for projektet
Forfatter, Cand. Scient.
Ege-bøger – Formidling af naturvidenskab

EKSPERIMENT 2

Bioethanol fra alternative carbonkilder

Udledning af klimagasser ved afbrænding af fossilt brændstof er den væsentligste årsag til den globale opvarmning, der er sket gennem de sidste 60 år. Derfor undersøges alternative brændstoffer – herunder bioethanol, der produceres ud fra restprodukter af plantebiomasse ved hjælp af enzymer og gærceller.

For at undgå sult er det vigtigt, at biomassen ikke stammer fra primære fødevarer som sukkerrør, majs eller tilsvarende, men derimod er restprodukter og sidestrømme fra fødevarerproduktion. Således kan produktion af bioethanol gøres mere bæredygtig, hvis biomassen fx stammer fra restprodukter som halm eller madaffald, se figur 1, eller fra andre alternative carbonkilder som fx alger eller græs.

For at optimere produktionen af bioethanol er det nødvendigt at afprøve forskellige alternative carbonkilder til fremstilling af simple og forgærbare carbohydrater. Carbonkilderne skal nedbrydes med hydrolytiske enzymer, der spalter komplekse carbohydrater til mono- og oligosaccharider, som kan udnyttes af gæren. Viden om den optimale sammensætning af carbonkilder, enzymer og gær opnås gennem kontrollerede dyrkningsforsøg i et laboratorium, der efterfølgende kan opskaleres til dyrkning i bioreaktorer.

I dette eksperiment er formålet at fremstille bioethanol ud fra forskelligt organisk affald med henblik på bæredygtig produktion af bioethanol. Når en velegnet carbonkilde er fundet, er formålet at optimere produktionen af bioethanol. Processen kan endvidere afprøves i en bioreaktor.

Alle eksperimenter og den tilhørende teori i 'Hands on Biotech' forholder sig til FN's verdensmål for bæredygtig udvikling. I nærværende case bringes følgende verdensmål i spil, se figur 2.



Figur 2. FN-verdensmål der er relevante i forhold til eksperimentet 'Bioethanol fra alternative carbonkilder.'

Foto ikke tilgængelig.
Kan ses i den trykte udgave.

Figur 1. Citrusskaller er et restprodukt, der kan anvendes til produktion af bioethanol.

Gær producerer ethanol ved fermentering

Til produktion af bioethanol anvendes gærsvampen *Saccharomyces cerevisiae*, der også kendes som almindelig bagegær, se figur 3. Den kan iagttages i mikroskop hvor det er muligt at se den lave knopskydning, se figur 4. Knopskydning er en mitotisk celledeling, hvor cytoplasmaet fordeles asymmetrisk mellem de to resulterende celler. Billedet i figur 4. er fra et elektronmikroskop, hvor cellerne efterfølgende er farvet. Knopskydning kan også iagttages i et almindeligt mikroskop.

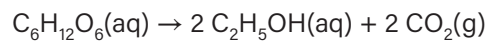


Figur 3. Almindelig bagegær er en encellet gærsvamp med det latinske navn *Saccharomyces cerevisiae*.



Figur 4. Gærceller, der laver knopskydning.

Bagegær er en encellet eukaryot og heterotrof organisme, der kan leve både aerobt og anaerobt. Ved produktion af brød, vin, øl og bioethanol omdanner den ved anaerob fermentering glucose og andre monosaccharider til ethanol og carbondioxid:



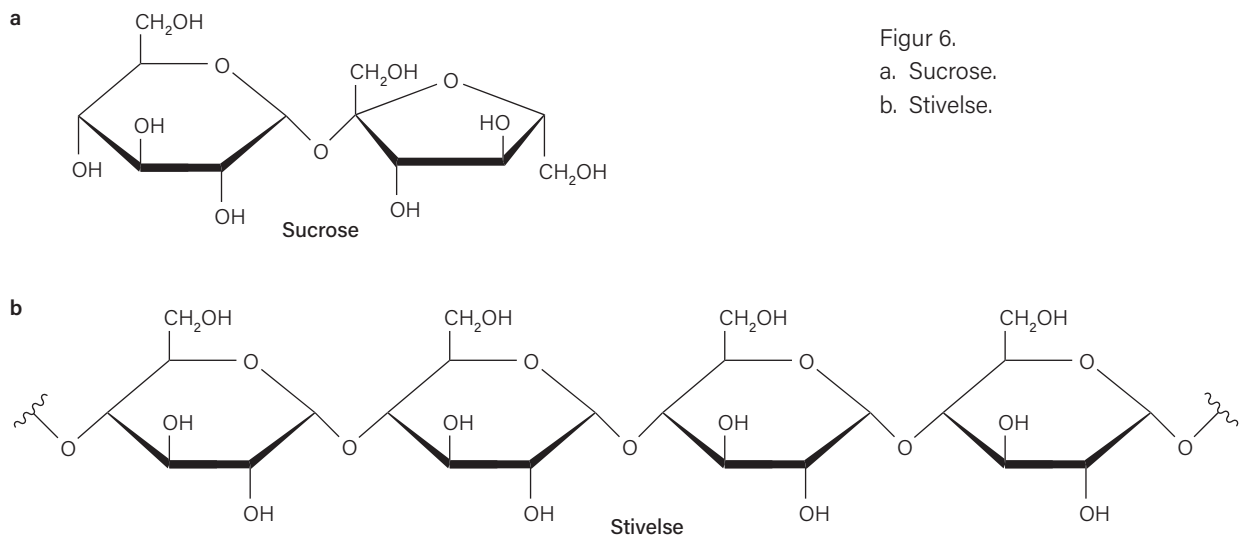
Processen er en bruttoreaktion, der dækker over en række deltrin, der involverer i alt 12 enzymer i gær. (De første 10 deltrin udgør glykolysen).

Råmaterialer til produktion af bioethanol

De monosaccharider og andre mindre sukre som gærceller fermenterer til ethanol, er fremkommet ved enzymatisk nedbrydning af større og mere komplekse carbohydrater. Disse carbohydrater kan udvindes fra mange forskellige typer råmaterialer, se figur 5.

Figur 5. Bioethanol kan produceres ud fra forskellige råmaterialer – her sukkerrør, majs, appelsinskal og halm. Fra majs udnyttes typisk spindlen (kolbens midte uden kerner).





Figur 6.
a. Sucrose.
b. Stivelse.

Sukkerrør, sukkerroer o.l. indeholder alm. sukker (sucrose), mens korn, kartofler o.l. indeholder carbohydratet stivelse, se figur 6.

Sucrose er et disaccharid, som er opbygget af to monosaccharider (glucose og fructose), mens stivelse er et polysaccharid, som er opbygget af mange enheder af glucose.

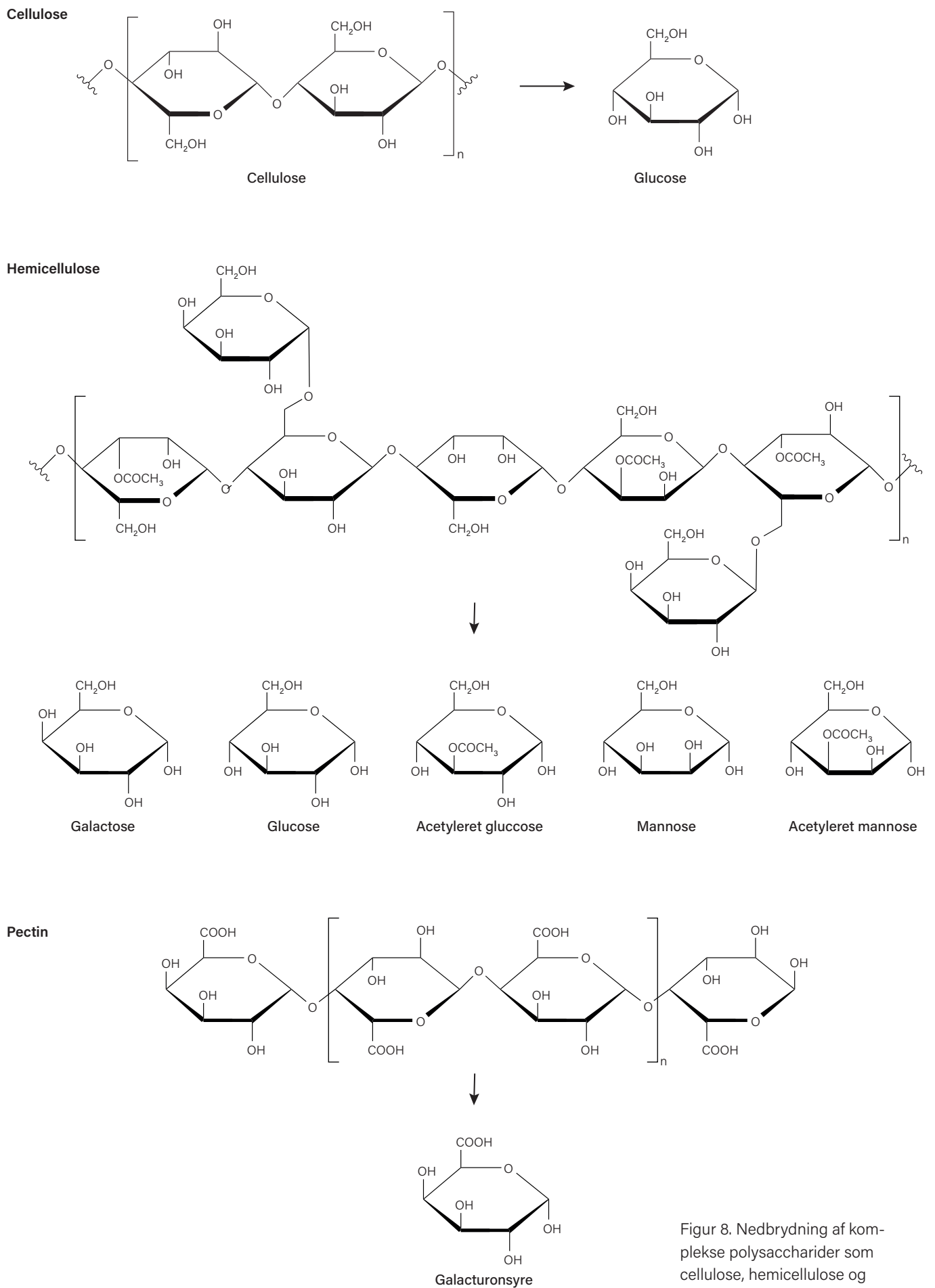
Produktion af ethanol på grundlag af sukker eller stivelse kaldes for 1. generations bioethanol. Da sukker og stivelse typisk indgår i basisfødevarer, er det ikke særligt bæredygtigt at fremstille brændstoffer ud fra disse, når der samtidig er mangel på fødevarer i store dele af verden.

I eksperimentet 'Bioethanol fra alternative carbonkilder' ønskes det at inddrage FN's verdensmål for bæredygtighed, og derfor fremstilles bioethanol på grundlag af affaldsprodukter som fx halm, pap og appelsinskaller, hvilket kaldes 2. generations bioethanol.

Affaldsprodukter er sammensat af mange forskellige typer kemiske forbindelser. I figur 7a og b er vist den kemiske sammensætning af hhv. tørret appelsinskal og halm.

a			b		
Bestanddel	Masseprocent (tørvægt)	Foto ikke tilgængelig. Kan ses i den trykte udgave.	Bestanddel	Masseprocent (tørvægt)	Foto ikke tilgængelig. Kan ses i den trykte udgave.
Råfedt	4		Råfedt	1	
Protein	8		Protein	4	
Glucose	15		Glucose	0	
Fructose	15		Fructose	0	
Sucrose	11		Sucrose	0	
Pectin	14		Pectin	0	
Cellulose	16		Cellulose	39	
Hemicellulose	14		Hemicellulose	39	
Lignin	1		Lignin	14	
Aske	2		Aske	3	
I alt	100	I alt	100		

Figur 7. Sammensætning af stoffer i a) tørret appelsinskal og b) halm.



Figur 8. Nedbrydning af komplekse polysaccharider som cellulose, hemicellulose og pectin til monosaccharider.

Det ses at appelsinskal og halm indeholder polysaccharidet cellulose samt mere komplekse polysaccharider som hemicellulose, pectin og/eller lignin, se figur 8. Disse carbohydrater indgår i cellevægge og andre beskyttende strukturer hos alle planter (fx ved, stængler, skaller af frugter og frø), og især cellulosen er svært nedbrydelig.

Uanset hvilke råmaterialer, der udnyttes til produktion af bioethanol, skal svært tilgængelige carbohydrater først frigøres og derefter nedbrydes til mono- og oligosaccharider. Først som monosaccharider er de anvendelige som substrater for de enzymer i gær, der indgår i produktionen af ethanol.

Forbehandling af råmaterialerne

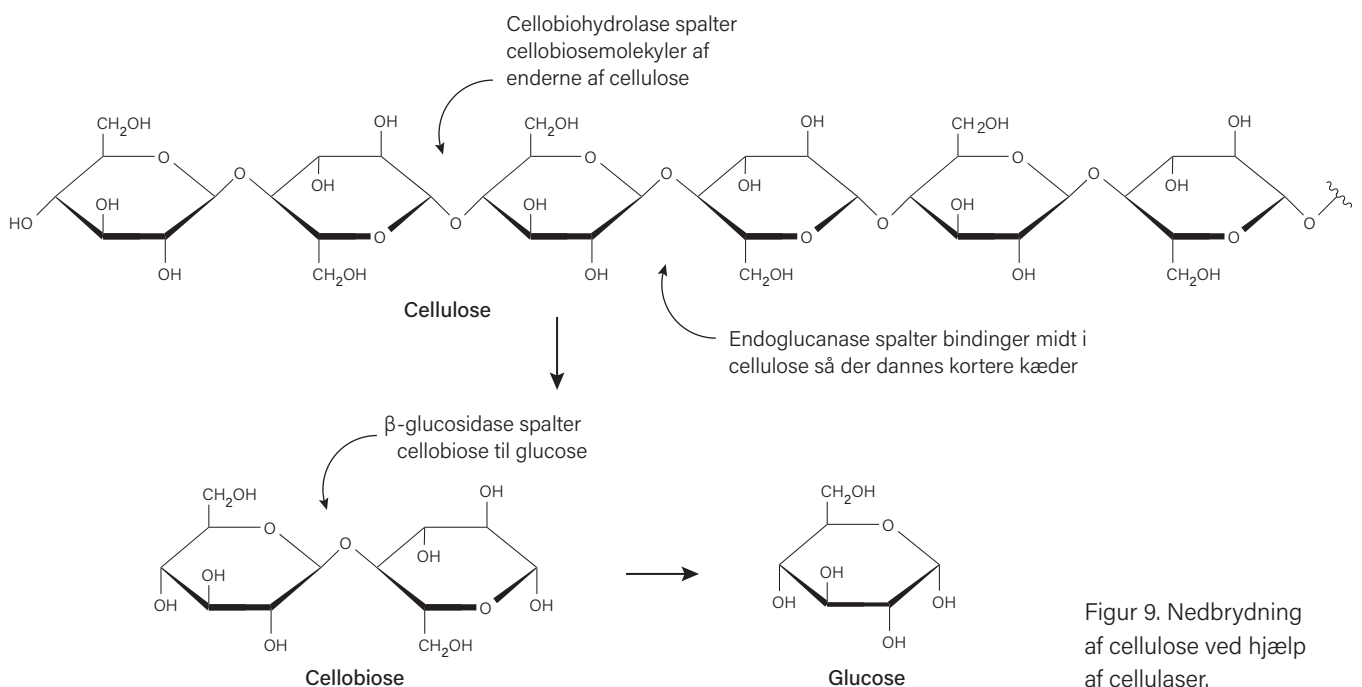
Forbehandlingen af råmaterialet består i først at klippe det i småstykker og koge det under tryk med vand i enten sur eller basisk opløsning. Det vil sige forbehandlingen er både mekanisk, termisk og kemisk. Herved hydrolyseres en del af bindingerne mellem monosacchariderne i de svært nedbrydelige carbohydrater, og de frigøres fra materialets øvrige bestanddele. En *hydrolyse* betyder, at bindinger brydes under optagelse af vand, se fx figur 10 side 12.

Enzymatisk hydrolyse

Efter den indledende varmebehandling tilsættes forskellige hydrolytiske enzymer. Figur 8 viser polysacchariderne cellulose, hemicellulose og pectin samt strukturformlerne for de monosaccharider de består af.

I eksperimentet 'Bioethanol fra alternative carbonkilder' anvendes to forskellige enzympræparater fra Novozymes, som begge indeholder hydrolytiske enzymer.

Den ene er præparatet Celluclast, der indeholder cellulaser, som katalyserer hydrolysen af bindinger (glycosidbindinger) mellem glucoseenheder i cellulose, se figur 9.

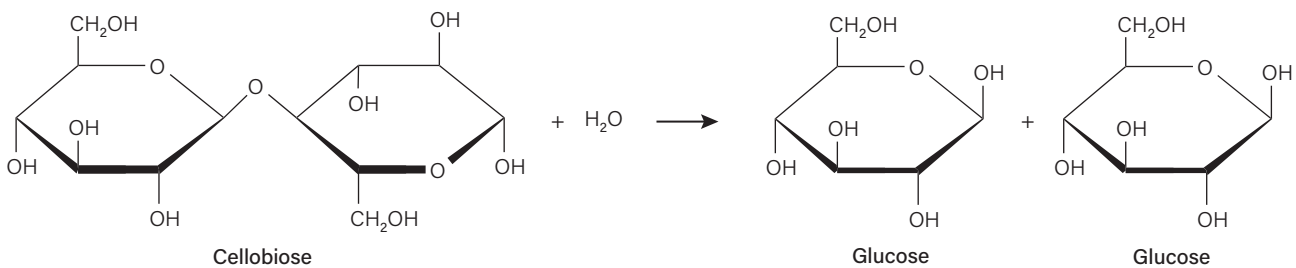


Figur 9. Nedbrydning af cellulose ved hjælp af cellulaser.

Der findes tre hovedtyper af cellulaser (hydrolaser) i præparatet:

- Endocellulaser (endoglucanase), der angriber tilfældige steder i molekylet og nedbryder det til kortere kæder.
- Exocellulaser (cellobiohydrolaser), der bryder bindinger mellem glucoseenheder der sidder fra to til fire enheder fra ender, der er blevet dannet vha. endocellulaserne. Ved nedbrydningen dannes tetrasaccharider eller disaccharider (cellobiose).
- Cellobiaser (β -glucosidaser), der hydrolyserer exocellulaseprodukterne til monosaccharidet glucose.

Figur 10 viser en hydrolyse af cellobiose.



Figur 10. Hydrolyse af disaccharidet cellobiose til to glucosemolekyler under optagelse af vand.

Det andet enzympræparat der anvendes, kaldes Viscozyme. Det indeholder en blanding af en lang række enzymer, der samlet kan kaldes carbohydraser. Det vil sige at det er hydrolaser der hydrolyserer carbohydrater. Bl.a. indeholder Viscozyme forskellige hemicellulaser og pectinaser der gør det muligt at få nedbrudt hemicellulose og pectin. Det er dog ikke alle monosaccharider fra hemicellulose og pectin, der kan fermenteres af bagegær.

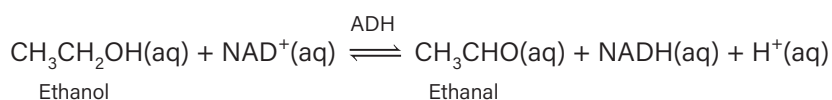
For at undersøge effekten af de hydrolytiske enzymer måles der i eksperimentet specifikt på frigivelsen af glucose. Koncentrationen af glucose måles ved hjælp af et glucometer og brug af glucoseticks. Ved en passende koncentration af glucose tilsættes gær så den anaerobe fremstilling af ethanol påbegyndes.

Ethanolbestemmelse

Efter gærcellernes fermentering af anvendelige monosaccharider kan koncentrationen af ethanol i opløsningen bestemmes ved hjælp af spektrofotometri.

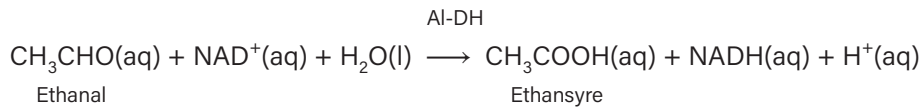
I tilknytning til den spektrofotometriske måling udføres et *assay*, det vil sige en analytisk procedure, der gør bestemmelse af ethanolindholdet mulig. En prøve af den fermenterede blanding tilsættes enzymerne alkohol-dehydrogenase (ADH) og aldehyddehydrogenase (Al-DH) samt coenzymet NAD^+ .

Ethanol i prøven vil oxideres til ethansyre i to enzymatisk katalyserede reaktioner. Den første reaktion katalyseres af enzymet alkohol-dehydrogenase (ADH):



Det ses, at ethanol afgiver 2 H-atomer og oxideres derved til aldehydet ethanal samtidig med at coenzymet NAD^+ reduceres til NADH.

Da ligevægten for reaktionen ligger langt til venstre, er der brug for en reaktion mere til at drive reaktionen til højre, så produktet NADH kan måles og bruges som et udtryk for koncentrationen af ethanol. Derfor er der også tilsat enzymet aldehyd-dehydrogenase (Al-DH), der katalyserer reaktion nummer to:



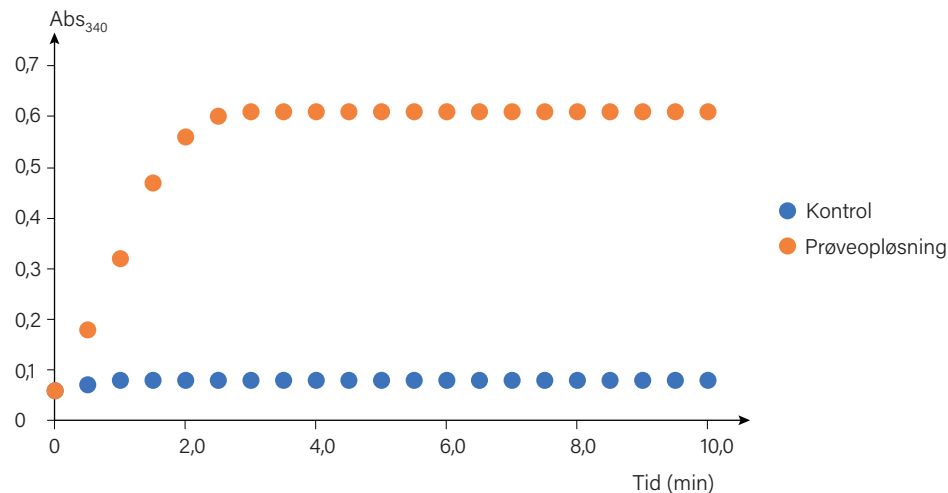
Her ses det, at ethanal oxideres videre til ethansyre ved hjælp af NAD^+ i en fuldstændig reaktion.

Ved begge reaktioner dannes NADH, og den relative koncentration af denne kemiske forbindelse kan bestemmes spektrofotometrisk, idet NADH har absorptionsmaksimum ved 340 nm.

Figur 11 viser resultater fra måling af absorbans af NADH ved 340 nm i en prøveopløsning med ethanol tilsat reagenser fra assay til tiden 0.

Ved at anvende en standardopløsning med et kendt indhold af ethanol (5 g/L) findes sammenhængen mellem absorbans af NADH og koncentration af ethanol.

De nærmere detaljer for beregning af koncentrationen af ethanol er vist i vejledningen til eksperimentet.



Figur 11. Resultater af måling af absorbans af NADH ved 340 nm i prøve med ethanol tilsat NAD^+ , ADH og Al-DH.

Anvendelse af bioreaktor

Hvis *gærceller* skal dyrkes under helt veldefinerede vækstbetingelser i et laboratorium, kan der anvendes en *bioreaktor*, der også kan kaldes en *fermentor*, se figur 12 side 14.

I bioreaktoren kontrolleres temperatur, pH, opløst ilt og omrøringshastighed. Koncentrationen af næringsstofferne i vækstmediet bestemmes fra processens start, og kontrolleres undervejs i processen ved at udtage prøver og foretage offline måling fx af letom-

Foto ikke tilgængelig.
Kan ses i den trykte udgave.

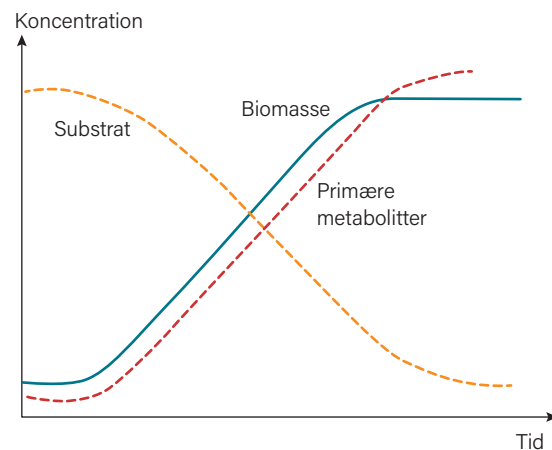
Figur 12. En bioreaktor
i et laboratorium.

sættelige monosaccharider. Samtidigt bestemmes cellebiomasse og koncentrationen af det ønskede produkt. Bioreaktoren steriliseres før podning med celler og efter brug. Til industrielle storskala-fermenteringer kan en bioreaktor have et volumen på op til hundredtusinde liter og have en højde på to etager afhængigt af, hvad der skal fremstilles.

De næringsstoffer der tilsættes, kaldes *substrater*. Gærcellerne omdanner substrater til cellebiomasse, varme og produkter, som følge af deres metabolisme (stofskifte). De dannede *metabolitter* kan være primære eller sekundære. *Primære metabolitter* dannes i forbindelse med det primære stofskifte ligesom ethanol (der fungerer som ekstern elektronacceptor, fordi der ikke er dioxygen til stede).

Følges en vækstkurve for mikroorganismen, ses det, at de primære metabolitter dannes samtidig med at mikroorganismen vokser og danner nye celler, det vil sige især i den eksponentielle vækstfase, se figur 13.

Produktet i en industriel bioprocess kan være selve mikroorganismen så som bagegær, eller en metabolit som ethanol eller et antibiotikum.



Figur 13. Dannelse af biomasse
og primære metabolitter i den
eksponentielle vækstfase.

EKSPERIMENT 2

Bioethanol fra alternative carbonkilder

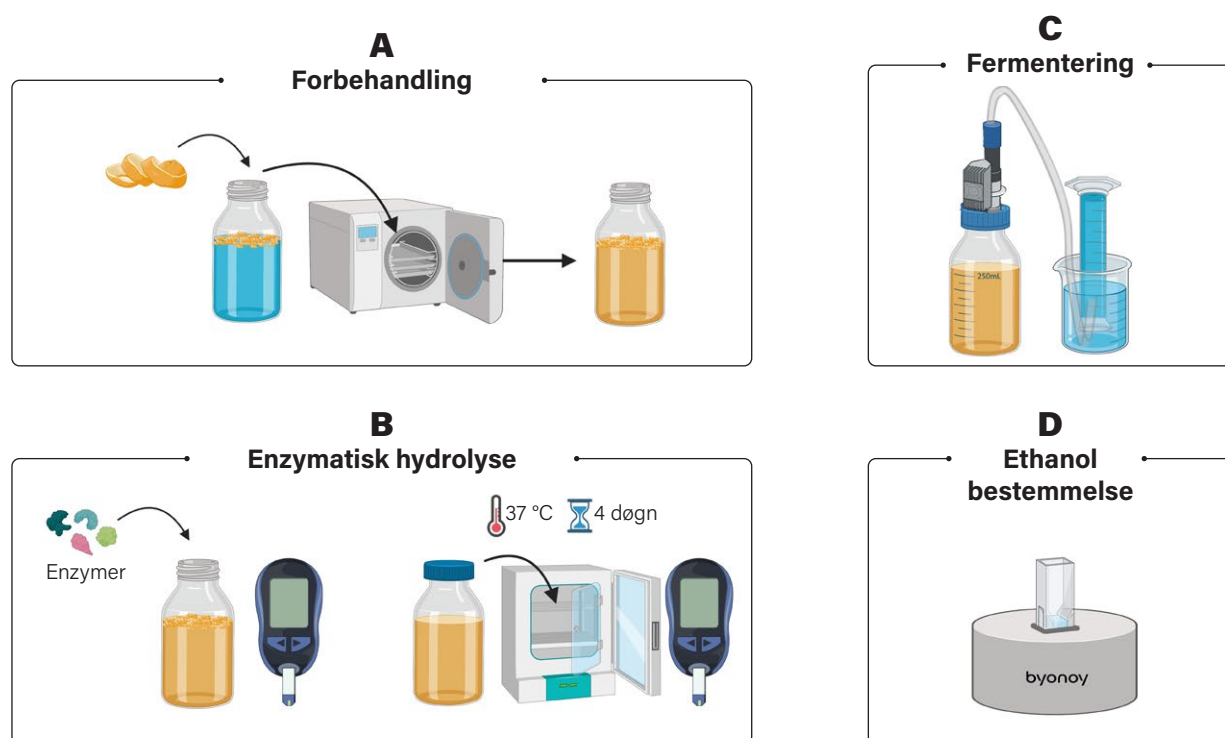
Formål

I denne øvelse er formålet at fremstille bioethanol ud fra organisk affald med henblik på bæredygtig produktion af bioethanol. Når en velegnet carbonkilde er fundet, er formålet at optimere produktionen af bioethanol. Processen kan endvidere afprøves i en bioreaktor.

Flow

Øvelsen har følgende flow og tidsforbrug, se figur 14:

- DEL A – Forbehandling af affaldsmateriale (autoklavering) (90 min)
- DEL B – Enzymatisk hydrolyse (klargøring 90 min + procesforløb 4 dage)
- DEL C – Fermentering (klargøring 90 min + procesforløb 1 dag)
- DEL D – Ethanolbestemmelse (90 min)



Figur 14. Flowdiagram for fremstilling af bioethanol.

DEL A - Forbehandling af substrat (autoklaving)

Formålet med DEL A er at lave en mekanisk forbehandling og dernæst frigøre komplekse carbohydrater i de valgte affaldsmaterialer vha. kogning under tryk.

Ved kogning under tryk opnås en højere kogetemperatur end 100 °C, og derved gøres carbohydraterne tilgængelige for enzymer. Den høje temperatur medvirker også til, at der undgås kontaminering ved at dræbe mikroorganismer, som er på affaldsmaterialerne.

Materialer

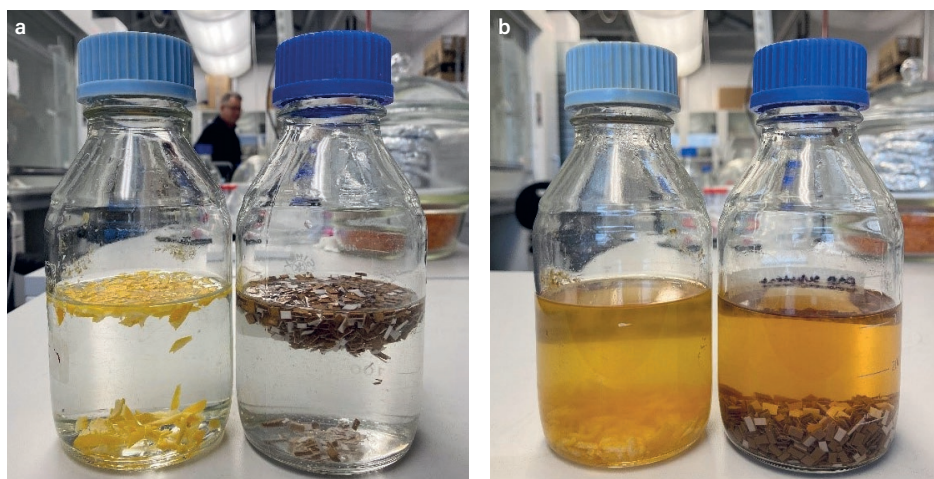
- Vægt
- Substrat, hvilket er organisk affald efter eget valg, fx pap eller appelsinskaller
- Sakse, knive o.l.
- Demineraliseret vand
- BlueCap-flasker med låg (500 mL)
- 4 M NaOH
- pH-elektrode og pH-meter eller pH-strips
- Autoklave
- Måleglas

Fremgangsmåde

1. Mekanisk forbehandling: Klip/skær 20 g organisk affaldsmateriale i småstykker, så småt som muligt, se figur 15.
2. Brug 11 g fint skåret affald til at finde vandindholdet. Hvordan vil du gøre det?
3. Fremstil en citronsyrebuffer ved at tilsætte 6 g citronsyre til 300 mL demineraliseret vand i en 500 mL BlueCap-flaske. Justér pH til 5 med 4 M NaOH.
4. Tilsæt 9 g finskåret affaldsmateriale.
5. Skru låget løst på BlueCap-flaskerne, og autoklavér i 20 min ved 121 °C og 1 atm overtryk, se figur 16.



Figur 15. Appelsinskaller klippet småstykker.



Figur 16. Affaldsmateriale, appelsinskal og pap i citronsyrebuffer a) før og b) efter autoklaving.

DEL B - Enzymatisk hydrolyse

Formålet med DEL B er at nedbryde komplekse carbohydrater til forgærbare sukre, der kan udnyttes af gær til produktion af bioethanol.

Materialer

- Autoklaveret, finsnitted affaldsmateriale fra DEL A
- Mikropipette + spidser (100-1000 μL)
- Enzympræparater:
 - Celluclast (50,4 U) – Nedbryder cellulose til glucose, cellobiose og længere oligosaccharider
 - Viscozyme (30 U) – Blanding af mange forskellige carbohydraser
- AKKU-CHEK glucose måleapparat + tilhørende teststrimler
- Sprøjte (1 mL)
- Sprøjtefilter (0,22 μm)
- Parafilm
- Eppendorfrør
- Engangspipetter
- Varmeskab/vandbad
- Vortex
- Handsker

Fremgangsmåde

1. Enzymbehandling:
Tilsæt 360 μL Celluclast til prøven fra DEL A (Enzymaktivitet: 50,4 U)
Tilsæt 1500 μL Viscozyme (30 U).
2. Glucosemåling:
Fremstil gerne en 5 mM glucoseopløsning som standard til kontrol af glucometeret.
3. Omrør BlueCap-flaskens indhold i ca. 3 min, og udtag 500 μL til glucosemåling i Eppendorfrør (dag 0).
4. Tag stemplet ud af en 1 mL sprøjte og påsæt sprøjtefilter. Ryst/vortex de udtagne 500 μL og sug det op med en engangspipette. Herefter overføres de 500 μL til sprøjten med sprøjtefilteret.
5. Pres forsigtigt væsken gennem sprøjtefilteret på parafilm, så en dråbe fremkommer (se figur 17).
6. Sæt en strip i bunden af glucometeret – den gule linje skal pege ud og vent til der står 'tilfør dråbe'.
Note: Vær forsigtig med ikke at røre toppen af teststrimlen med fingrene, bær eventuelt handsker.
7. Teststrimmelen skal forsigtigt røre ved dråben og fjernes hurtigt igen (se figur 18). (Målingen skulle gerne være 0 eller lidt over, så ingen panik hvis ikke glucometeret kan måle noget.)
8. Reaktionsblandingen stilles ved 50°C (varmeskab/vandbad) i 4 døgn.
Ryst blandingen så ofte som muligt og mindst en gang om dagen.



Figur 17. Sprøjte med sprøjtefilter.



Figur 18. Glucosemåling med glucometer.

9. Glucosemåling gentages hver dag i 4 dage med en fortynding på 10X – eller måles bare på dag 4 (udtag 100 μ L prøve, og fortynd 10 gange ved at tilsætte 900 μ L demineraliseret vand – husk at omrøre substratet i 3 min inden prøve udtages, og ryst/vortex lige inden måling. Hvis substratet er meget grumset efter omrøring, bør man lade det sedimentere en smule inden prøven udtages med pipette).

Efterbehandling

1. Afbild glucosekoncentrationen som funktion af tiden.
2. Indsæt en tendenslinje, og angiv den gennemsnitlige produktion af glucose pr. dag.
3. Sammenlign resultaterne for de forskellige affaldsmaterialer. Hvilket materiale giver den højeste produktion af glucose?
4. Beregn udbyttet af glucose pr. tørstofmasse af affaldsmaterialet.

DEL C – Fermentering

Formålet med DEL C er at fermentere de frigivne forgærbare sukre til bioethanol ved hjælp af bagegær *Saccharomyces cerevisiae*.

Materialer pr. gruppe

- BlueCap-flaske med det hydrolyserede affaldsmateriale fra DEL B
- AKKU-CHEK glucometer + tilhørende teststrimler
- Gærekstrakt (bidrager med grundstofferne N, C og S samt de vigtigste sporstoffer)
- Frisk bagegær
- Vægt
- BlueCap-flaske (250mL)
- Låg til BlueCap-flaske med slange og sort ventil eller prop med slange
- Bægerglas (200 mL)
- Måleglas (50 mL)
- Sprøjte (1 mL)
- Sprøjtefilter (0,22 μ m)
- Kaffefilter eller vakuum filtreringssystem (0,45 μ m filter)

Fremgangsmåde

1. Mål glucosekoncentrationen (mmol/L) i BlueCap-flasken på dag 4, som beskrevet i DEL B.
2. Filtrer substratet gennem fx et kaffefilter eller med vakuum filtreringssystem (0,45 μ m filter) og opsaml det flydende substrat (ca. 250 mL) i en 250 mL BlueCap-flaske.
Note: Filtrer lidt substrat ad gangen, og udskift filter ved tilstopning.

Gæring

1. Tilsæt 0,5 g gærekstrakt til det enzymatisk nedbrudte substrat.
2. Udtag 1 mL af det nedbrudte substrat, og overfør dette til et Eppendorfrør, som skal anvendes i DEL D. Dette er prøven før gæring.
3. Tilsæt 5 g gær, og opløs det i substratet.
4. Vej BlueCap-flasken uden låg med substrat og gær, og notér resultatet i skema 2 side 20.
5. Påsæt låg med slange og ventil til BlueCap-flasken med substratet. Sørg for at den sorte ventil er åben (vender lodret), se figur 19.
6. Måleglasset fyldes med vand og anbringes omvendt i bægerglassene (slangen fra BlueCap-flasken skal gå op i måleglasset). Se ligeledes figur 19.
7. Notér vandstanden i måleglasset fra start.
8. Sæt opstillingen ved stuetemperatur.
9. Gæringen kan følges ved at se på CO_2 -dannelsen – hvordan vil du gøre det?
10. Følg derefter CO_2 -dannelsen ved den fremgangsmåde, du har fundet frem til under punkt 9, samt ved at afveje BlueCap-flasken uden låg næste dag/lektion. Notér resultaterne i skema 2.



Figur 19. Forsøgsopstilling til gæring.

Efterbehandling

1. Hvad er et sporstof, og hvad bruger cellen det til?
2. Beregn massen af glucose i flasken fra dag 4. Opskriv resultaterne i skema 1.
3. Beregn stofmængden af glucose og derefter massen ud fra den målte koncentration med glucometeret. Beregn de tilsvarende for ethanol og carbondioxid der teoretisk kan dannes ved gæring af den beregnede stofmængde af glucose (teoretisk udbytte). Opskriv resultaterne i nedenstående skema 1.

Skema 1

	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{aq})$	\rightarrow	$2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}(\text{aq})$	$+$	$2 \text{CO}_2(\text{aq})$
Reaktionsforhold	1		2		2
Molarmasse (M)	180,156 g/mol		46,068 g/mol		44,010 g/mol
Masse (m)					
Stofmængde (n)					

4. Beregn stofmængden af dannet CO_2 efter fermenteringen (praktisk udbytte) ud fra masseændringen (blå). Opskriv resultatet i skema 2, næste side.
5. Beregn massen af CO_2 , der er opsamlet i flasken efter fermentering (praktisk udbytte) ud fra volumenændring (grøn). Opskriv resultatet i skema 2.
For at udføre denne beregning skal der anvendes det molære volumen V_m . Det er en temperaturafhængig konstant, der angiver voluminet pr. mol gas. Der gælder således at $V = V_m \cdot n$.

6. Beregn udbytteprocenten.
$$\text{Udbytteprocent} = \frac{m(\text{praktisk udbytte})}{m(\text{teoretisk udbytte})} \cdot 100\%$$

Opskriv resultaterne i skema 2.

Skema 2

Volumenændring		Masseændring	
$V(\text{CO}_2)$		$m(\text{BlueCap-flaske})_{\text{start}}$	
Molart volumen (V_m)	24,4 L/mol	$m(\text{BlueCap-flaske})_{\text{slut}}$	
$n(\text{CO}_2)$		Δm^*	
$M(\text{CO}_2)$	44,010 g/mol	$n(\text{CO}_2)$	
$m(\text{CO}_2)$		$M(\text{CO}_2)$	44,010 g/mol
Udbytteprocent		Udbytteprocent	

* $\Delta m = \text{CO}_2\text{-dannelse} = m(\text{BlueCap-flaske})_{\text{start}} - m(\text{BlueCap-flaske})_{\text{slut}}$

7. Kommenter udbytteprocenten, og diskuter hvilke fejlkilder i forsøgene, der kan have påvirket resultaterne.

Arbejdsspørgsmål

1. Hvorfor er det ønskeligt at fremstille bioethanol fra alternative carbonkilder?
2. Hvilke råmaterialer er det især ønskeligt at anvende?
3. På hvilken måde adskiller carbohydrater som sucrose og stivelse sig fra carbohydrater som fx hemicellulose og pectin? Inddrag figur 6 og 8.
4. Forklar hvordan cellulose kan nedbrydes ved hjælp af cellulaser. Inddrag figur 9 og 10.
5. Hvilken funktion og aktivitet har en endoglucanase?
6. Tildel oxidationstal for det carbonatom der skifter oxidationstal i hhv. ethanol, ethanal og ethansyre.
7. Opskriv delreaktionerne for hver af de to redoxreaktioner på side 12 og 13.
8. Hvad er reaktionsforholdet mellem ethanol og NAD^+ i det assay, der anvendes i ethanoltesten?
9. Hvilke fordele er der ved at dyrke en mikroorganisme i en bioreaktor?
10. Giver glucosemåling et præcist mål for frigørelse af monosaccharider fra polysaccharider i appelsinskaller? Begrund svaret.
11. Find massen af glucose som frigives ved total hydrolyse af 1 gram cellulose.
12. Undersøg og giv et par eksempler på, hvilke organismer som indeholder enzymet alkoholdehydrogenase.

DEL D - Ethanolbestemmelse

Formålet med del D er at bestemme indholdet af ethanol i en opløsning før og efter fermentering med gær ved hjælp af spektrofotometri.

Materialer

- Megazyme Ethanol kit (figur 20) med følgende indhold:
 - Flaske 1 (buffer, pH 9,0)
 - Flaske 2 (NAD⁺)
 - Flaske 3 (aldehyd-dehydrogenase)
 - Flaske 4 (alkohol-dehydrogenase)
 - Flaske 5 (ethanol-standardopløsning, 5 mg/mL)
- Demineraliseret vand
- Prøveopløsning
- Mikropipetter med spidser (10 µL, 50 µL og 1000 µL)
- Sprøjte (1 mL)
- Sprøjtefilter (0,22 µm)
- Spektrofotometer (Byonoy Absorbance One), se figur 21
- Kuvetter

Bær handsker under hele øvelsen



Figur 20. Megazyme Ethanol kit.



Figur 21. Byonoy spektrofotometer.

Klargøring af opløsninger (læreren):

1. Lad opløsningerne i ethanol-kittet opnå stuetemperatur inden brug.
2. Ryst opløsning 3 og 4 inden brug.
3. Bland et reaktionsmix af demineraliseret vand + opløsning 1, 2 og 3 ud fra nedenstående skema for følgende antal prøver: alle elevernes prøver + 1 blank + 1 ethanolstandard (opløsning 5) + 2 ekstra (for at have nok reaktionsmix).

Reaktionsmix	Mængde pr. prøve
Demineraliseret vand	760 µL
Opløsning 1 (buffer)	80 µL
Opløsning 2 (NAD ⁺)	80 µL
Opløsning 3 (aldehyd- dehydrogenase)	20 µL

Fremgangsmåde

1. Fortynd prøven fra gæring 10x (100 µL prøve + 900 µL demineraliseret vand). Husk også prøven før tilsætning af gær, som dog ikke skal fortyndes. Filtrer prøverne gennem sprøjtefilter som i de tidligere delforsøg.
2. Fortynd flaske 5 (ethanolstandard) 100x ved at udtage 10 µL opløsning 5, og bland med 990 µL demineraliseret vand (c(slut) = 50 µg/mL).
3. Kalibrér spektrofotometeret med 1 mL demineraliseret vand (blank).
4. Tilsæt 940 µL reaktionsmix til kuvette.

- Tilsæt 80 μL prøve henholdsvis fra før gæring, efter gæring, standard eller demineraliseret vand (nulprøve) til brønden/kuvetten. Bland indholdet ved hjælp af en pipette. Efter 2 minutter, mål absorbansen (A_1) ved 340 nm.
- Start reaktionen ved tilsætning af 8 μL opløsning 4 (husk at ryste den inden brug). Bland ved hjælp af pipette og mål absorbansen (A_2) ved 340 nm efter 5 min. Det er vigtigt, at reaktionen er forløbet lige længe for alle prøverne, når absorbansen måles.
- Anvend nedenstående skema 3 til at notere værdierne for A_1 og A_2 .

Skema 3

	A_1	A_2	ΔA	$\Delta A - \Delta A_{\text{nulprøve}}$
Nulprøve				0
Standard				
Prøve før gæring				
Prøve efter gæring				

Efterbehandling

- Bestem forskellen i absorbans ($\Delta A = A_2 - A_1$) for både nulprøve, ethanolstandard og prøveopløsningerne.
(Værdien af ΔA skal være mindst 0,100 for at opnå tilstrækkeligt præcise resultater.)
- Træk resultatet af nulprøven fra de andre resultater.
- Ethanolkoncentrationen i enheden $\mu\text{g/mL}$ kan beregnes således:

$$c_{\text{ethanol}} = \frac{\Delta A_{\text{prøve}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \cdot c_{\text{standard}} \cdot F_{\text{prøve}}$$

Hvor, $F_{\text{prøve}}$ er fortyndingsfaktoren (10x) for prøven og $c_{\text{standard}} = 50 \mu\text{g/mL}$

- Omregn koncentrationen af ethanol i $\mu\text{g/mL}$ til volumenprocent:
 - Først omregnes c_{ethanol} til m_{ethanol} i den oprindelige blanding (250 mL).
 - Så omregnes m_{ethanol} til V_{ethanol} , idet ethanols densitet ρ_{ethanol} er $0,79 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$
 - Så beregnes volumenprocenten. Formlen for volumenprocent er:

$$c_{\%V}(\text{ethanol}) = \frac{V_{\text{ethanol}}}{V_{\text{blanding}}} \cdot 100 \%$$

- Sammenlign ethanolindholdet med andre holds udbytter.
- Beregn massen og stofmængden af ethanol ud fra resultatet i del D, og brug det til at beregne stofmængde og masse af glucose.
- Sammenlign med resultaterne fra skema 2 side 20 i DEL C.
- Beregn masseprocenten af glucose i dit råmateriale.
- Diskuter, hvordan der kan opnås et højere udbytte af ethanol i forsøget.

EKSPERIMENT 2

Bioethanol fra alternative carbonkilder

Læreplanen

Øvelsen belyser følgende kernestof i læreplanen for bioteknologi A (og tilsvarende for biologi A):

- Eukaryote celletyper og celledyrkning
- Opbygning, egenskaber og biologisk funktion af carbohydrater
- Hydrolytiske enzymer
- Gæring
- Mængde- og udbytteberegninger
- Vækst, vækstmodeller og vækstfaktorer

Øvelsen kan indgå i temaer der perspektiverer kernestoffet indenfor bæredygtig produktion af fødevarer, energi og kemiske stoffer; bioteknologisk anvendelse af mikroorganismer samt ny forskning og nye bioteknologiske metoder.

Teori

For at få det bedste faglige udbytte af øvelsen er det en fordel at kende til:

- Gærcellers opbygning og funktion
- Gærcellers vækst, vækstkurver og betydningen af forskellige vækstfaktorer
- En basal forståelse af enzymeres funktion

Det kan der læses om i de biologi- og/eller bioteknologilærebøger der i forvejen anvendes i undervisningen.

For at forstå kemien bag ethanolanalysen er det nødvendigt at kende til

- Spektrofotometri
- Kemiske ligevægte
- Redoxprocesser

Det kan der ligeledes læses om i de kemi- og/eller bioteknologilærebøger der i forvejen anvendes i undervisningen. (I 1.g. kan ethanolanalysen udgå eller anvendes som et 'black-box-eksperiment', hvor der blot sammenlignes nogle relative værdier).

Fortsættes

Teori fortsat

Desuden er det en fordel at kende til:

- De kemiske strukturer af komplekse carbohydrater og deres nedbrydningsprodukter
- De hydrolytiske enzymer der anvendes i eksperimentet
- Kemien bag ethanolanalysen
- Funktion og anvendelse af bioreaktorer

Disse emner beskrives i de teori afsnit der knytter sig til eksperimentet.

Flow

Øvelsen har følgende flow og tidsforbrug:

- DEL A – Forbehandling af affaldsmateriale (autoklaving) (90 min)
- DEL B – Enzymatisk hydrolyse (klargøring 90 min + procesforløb 4 dage)
- DEL C – Fermentering (klargøring 90 min + procesforløb 1 dag)
- DEL D – Ethanolbestemmelse (90 min)

Kommentarer til eksperimentet

DEL A – Forbehandling af affaldsmateriale

- Gymnasiet forventes selv at have:
 - Autoklave
 - Vægt der kan veje ned til 0,2 g
 - Sakse/knive o.l. til at findele materialet
 - pH-meter med tilhørende pH-elektrode og buffere til kalibrering
 - Magnetomrørere + magneter
 - Ovn til tørstofbestemmelse ved ca 60 °C

DEL B – Enzymatisk hydrolyse

- Gymnasiet forventes selv at have et rystebad (50 °C) eller tilsvarende.
- Der kan anvendes mange forskellige materialer (citruskaller, tørret banan, tang, pap, halm osv.), men avispapir duer tilsyneladende ikke.

DEL C – Fermentering

- Gymnasiet skal selv have bægerglas (200 mL).
- Overvej sammen med eleverne hvilke kontroller, det kunne være smart at have med. Det er fx oplagt med en glucosekontrol.

I tilknytning til denne øvelse vil det være muligt at aftale demonstration af en bioreaktors funktion til batchkultur af gær.

HANDS ON BIOTECH

EKSPERIMENT 2

Bioethanol fra alternative carbonkilder

Dette hæfte (Bioethanol fra alternative carbonkilder) indgår i en serie på seks hæfter skrevet som del af udviklingsprojektet 'Hands on Biotech'. Det er skrevet til undervisningen i bioteknologi A/biologi A i gymnasiet.

Hæftet er delt op i tre kapitler:

- Teori
- Elevvejledning
- Lærervejledning