

Fermentointi

Harjoitustyössä valmistetaan leiviniivaa kahden polven kasvatuksella laboratoriomittakaavassa 2,5 litran fermentorissa. Hiivasolujen kokonaislukumäärä lasketaan mikroskooppisesti laskukammion menetelmällä (katso erillinen ohje Bürkerin laskukammion käytöstä). Kasvatuksen edistymistä seurataan myös sameuden avulla (katso erillinen ohje; Hach sameusmittari; laitteen vieressä prosessilaboratoriossa)

Laitteisto

Minifors 123365 fermentori; työskentelytilavuus 1,5 l, kokonaistilavuus 2,5 l

Kasvualusta

Peptoni	10 g
Mallasuute	5 g
Glukoosi	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	100 mg
Asparagiinihappo, C ₄ H ₇ NO ₄	2 g
Ionivaihdettua vettä	1000 ml

Tee kasvualustaa 1,6 l. Ota siitä erilliseen pulloon 100 ml ja steriloi se erikseen. Tee siihen siirrostevarsinaista kasvatusta edeltävänä päivänä. Loput 1,5 l kasvuliuosta laitetaan fermentoriastiaan ja steriloidaan samalla kun itse fermentori steriloidaan.

Vitamiiniliuos

Riboflaviini	2 mg
Biotiini	10 mg
Steriloitua ionivaihdettua vettä	50 ml

pH:n säätö

Ammoniakkiliuos, NH ₄ OH	5 M
Suolahappoliuos, HCl	1 M

Vitamiini- ja ammoniakkiliuosta lukuun ottamatta kaikki liuokset steriloidaan (120 °C, 20 min; fermentointiastia 40 min). Kasvualustan steriloinnista on kerrottu aiemmin.

Ammoniakkiliuos tehdään steriiliin veteen väkevästä NH₄OH-liuoksesta. Liuos laitetaan steriiliin pulloon.

Vitamiiniliuos tehdään myös steriiliin veteen steriiliin pulloon.

Siiroste

Sekoitetaan 1 g leiviniivaa 100 ml:aan steriloitua kasvatusalustaa. Inkuboidaan 25 °C:ssa 1 vrk.

Ajo-olosuhteet

pH	4,5 – 6,0
Lämpötila	25 °C
Kierrosnopeus	50 rpm
Happipitoisuus	90 %, ilman lisäys 1,5 – 3 l/h

Ajo-olosuhteiden asettaminen on kerrottu kohdassa 5.1.

1. Esivalmistelut

Tee kasvuliuos valmiiksi, Ota siitä osa (100 ml) erilliseen autoklaavipulloon ympin kasvatusta varten. HUOM. Ympin täytyy kasvaa noin vuorokauden ajan, joten autoklavoi sen kasvuliuos edellisenä päivänä, jäähdytä ja laita kasvamaan.

Kytke laitteeseen virta takaa vasemmalta. Laite suorittaa itsenäisen tarkastuksen, jolloin näyttöpaneeliin tulee teksti "INI" ja symbolit vilkkuvat jonkin aikaa.

1.1. pH-elektrodin kalibrointi

Tee aina ennen elektrodin astiaan kiinnittämistä. Muista huuhtoa elektrodi ionivaihdetulla vedellä, kun otat sen pois säilytysliuoksesta.

Varmista, että elektrodi on kytketty kaapeliin (yksikössä oikealla), jossa on punainen kaulus

Valitse F-näppäimellä haluamasi parametri (pH tai pO₂)

Paina valintanäppäintä, teksti "CAL" syttyy vasemmalle käyttöpaneeliin

Paina + -näppäintä kerran yhden pisteen kalibrointiin, kaksi kertaa kalibroidakseksi kahdella pisteellä. Eli jos kalibroit liuoksilla pH 7 ja pH 4, paina + -näppäintä kahdesti.

Paina ON/OFF -näppäintä. Vasemmalla paneelissa tulisi vilkkua "CAL" teksti

Upota pH-elektrodi pH 7 kalibroitiliuokseen. Paina jälleen **ON/OFF**

Paneelissa tulisi nyt lukea vasemmalla **"CAL"** ja oikealla pH-arvo. Kun arvo tasaantuu, näppäile + ja – painikkeista haluttu arvo eli pH 7.

Paina **ON/OFF** –näppäintä siirtyäksesi seuraavaan kalibroitipisteeseen. Nyt vasemmalla paneelissa tulisi lukea **"2"** ja oikealla **"REF"**

Huuhtelee elektrodi ja siirrä se pH 4 liuokseen.

Paina uudelleen **ON/OFF** ja kalibrointi alkaa. Paneelissa lukee vasemmalla **"C2"** ja oikealla pH-arvo.

Kuten aiemmin, käytä + ja – näppäimiä asettaaksesi haluttu arvo eli pH 4.

Paina **ON/OFF** ja paneeliin tulee näkyviin **"CAL END"**. Kalibrointi on valmis.

Voit laittaa elektrodin valmiiksi fermentoriastian kanteen omalle paikalleen. Se autoklavoidaan yhdessä astian kanssa.

Kasvatuksen päätyttyä ota elektrodi pois, puhdista se ionivaihdetulla vedellä ja laita säilytysliuokseen.

Katso video:

<https://www.youtube.com/watch?v=gEUexVEWVME>

2. Autoklavoinnin valmistelu

- Jos kasvatusastiassa on säilytysliuksena ionivaihdettua vettä, tyhjennä se ja huuhtelee astia.
- Jos astia on kiinni pääyksikössä, nosta se telineineen varovasti pöydälle: Nosta oranssi kahva irti sekoitusvarresta. Poista musta lämpösuojaletvy astian päältä. Astian takaosassa on maadoitusliitin eli metallinen nuppi, joka osuu pääyksikön V-muotoiseen liittimeen. Nosta astian telinettä niin, että nuppi irtoaa liittimestä. Varo etteivät pumppujen letkut hirtä kiinni. Siirrä pumput tarvittaessa pääyksiköstä telineeseen.
- Kun astia telineineen on pöydällä, irrota mustat kiinnitysruuvit. Nosta koko kansi pois asiasta ja laske se varovasti pöydälle. Varmista samalla, että astia pysyy telineessään.

Kaada kasvuliuos astiaan. Laita kansi takaisin astiaan ja sulje kiinnitysruuvit.

Varmista, että reagenssipullossa on happoa jäljellä ja että emäksen tilalla on tyhjä pullo.

- Irrota pumput keskusyksiköstä ja liitä reagenssipullotelineeseen. Suojaa pumput alumiinifoliolla.

- Suojaa reagenssipullojen ilmansuodattimet foliolla. SULJE kiristimellä letku pullosta pumppuun, mahdollisimman läheltä metallista liitintä
- Valmistele reagenssipullot. SULJE letku pullosta astiaan
- Aseta pH ja pO₂-elektrodit astian kanteen. Laita niiden päälle korkit ja folio
- (Aseta poistokaasun jäähdytin kanteen). Suojaa sen suodatin foliolla, mutta jätä letku avoimeksi
- Suojaa ilmansyöttöletkun suodatin foliolla ja sulje letku kiristimellä
- Sulje käyttämättömät aukot niihin kuuluvilla suojakorkeilla. Katso vielä muistilista ennen laitteen siirtämistä autoklaaviin.
- Siirrä telinen ja astia varovasti autoklaaviin. Autoklavoi 40 min 121 °C:ssa.

Katso video:

<https://www.youtube.com/watch?v=wfK0-JQJk7U>

2.1. Muistilista ennen autoklavointia

- Varmista, että kaikki putket mitkä koskettavat kasvuliuosta ovat suljettuja.
- Varmista, että kaasunpoistoletku (jäähdyttimessä) on auki
- Varmista, että elektrodeissa on korkit
- Varmista, että suodattimet ja akselin napa (keskellä) ovat löyhästi suojattu foliolla
- Varmista, että kaikki kannen liittimet ja elektrodit ovat tiukasti kiinni

3. Autoklavoinnin jälkeen

- 3.1. Autoklavoinnin jälkeen astia on kuuma! Anna sen jäähtyä autoklaavissa ennen siirtämistä takaisin keskusyksikköön
- 3.2. Nosta astia varovasti telineineen keskusyksikköön niin, että astiassa oleva maadoitusliitin osuu keskusyksikössä olevaan V-muotoiseen liitimeen. Voit joutua hieman nostamaan astiaa saadaksesi liittimet kohdalleen.

3.3. Avaa sulkemasi letkut ja poista foliot

- Avaa syöttöilman letku poistamalla kiristin

- Kiinnitä pumpput keskusyksikköön ja poista kiristin letkusta, joka menee reagenssipulloihin. Pumput täytyy esitäyttää ennen käynnistystä. Ohje tästä myöhemmin.
- Kiinnitä elektrodien johdot paikoilleen
- Yhdistä poistokaasun jäähdytyksen vesikierto. Avaa päävesihana seinältä.
- Kiinnitä sekoitusmoottori laskemalla varsi alas oranssista kahvasta
- Liitä lämpötila-anturi
- Kiinnitä ilmansyöttöletku (sparger) rotometriin. Avaa pääilmahana seinältä. Aseta rotametristä virtaukseksi esim 1 astian tilavuus per min ja katso, että ilmansyötöstä alkaa tulla kuplia astiaan.
- Laita laitteen virta päälle ja jos on aikaa, odota noin 2 tuntia, jotta happielektrodi (pO_2) polarisoituu

Katso video:

<https://www.youtube.com/watch?v=r5hCoOccupQ>

4. Valmistelut

4.1. Happielektrodin kalibrointi 100 % ilmalla

- Laita syöttökaasuksi ilma (laitteeseen tulee kaasuna vain ilmaa)
- Aseta sekoittajan nopeudeksi fermentoinnin aikana käytettävä nopeus (esim 50 rpm)
- Odota 5 – 10 min, jotta kasvuliukseen saturoituu ilmaa
- Toimi kuten pH:n kalibroinnissa. Mene F-näppäimellä kalibrointivalikkoon ja aseta yhden pisteen pO_2 -kalibroinnin arvo 100 %

Katso video:

https://www.youtube.com/watch?v=skTfM_6fVgs

4.2. Pumppujen esitäyttö

- Varmista, että pumpput ovat kiinnitettyinä oikeisiin reagenssipulloihin
 - Varmista, ettei letkussa, joka johtaa reagenssipullosta kasvatusastiaan ole enää kiristimiä
- 4.2.1. Paina funktionäppäintä (F), kunnes pumppuparametri on valittu
- 4.2.2. Paina valintanäppäintä valitaksesi pumpuista

- Aci = acid eli happo
- bAs = base eli emäs
- AF = Antifoam eli vaahdonestoaine
- Fed = Feed eli syöttöpumppu

4.2.3. Valitse haluamasi pumppu painamalla ON/OFF –näppäintä. Näyttöön tulee oikealle teksti ”Aut”

4.2.4. Paina nyt + -näppäintä pohjassa esitäyttääksesi letkun. Vapauta näppäin, kun letku on täynnä lähes kasvuastian kanteen asti

4.2.5. Paina jälleen valintanäppäintä vaihtaaksesi pumpun, jonka haluat täyttää.

Katso video:

https://www.youtube.com/watch?v=PZt_dEIDoI0

5. Fermentoinnin aloittaminen

5.1. Ajoparametrien valitseminen

- Valitaan F-näppäimellä parametri
- Jos haluat ko parametrin päälle, paina ON/OFF näppäintä. Ja päinvastoin sillä sammutetaan parametri
- Nuolinäppäimellä (+ ja -) valitaan parametrille haluttu tavoitearvo. Tällöin laite alkaa tavoitella haluttua arvoa ja pitää sen yllä.
- F1-näppäimellä voidaan valita näkymään jatkuvasti ajantasainen arvo jollekin parametrille, kuten lämpötila, pH tai pO₂. Sekoitusnopeutta (RPM) ei saa näytöllä näkymään pysyvästi
- Vaahdonestossa (AF) on vain vaihtoehdot päällä/pois
- Hiivakasvatuksen ajo-olosuhteet ovat ensimmäisellä sivulla

Katso video:

<https://www.youtube.com/watch?v=90Ppzzr0gCLY>

5.2. Siirroksen lisääminen kasvatusastiaan

Varmista, että

- Ajo-olosuhteet ovat oikein
- Pumput on esitäytetty
- Olet tehnyt vitamiiniliuoksen steriilistä vedestä. Sitä lisätään 1 ml jokaisen näytteenoton yhteydessä.

5.2.1. Avaa siirrostusportin korkki ja jätä se ylösalaisin steriilille alustalle

5.2.2. Kaada muutama tippa etanolia membraanisuojauselle steriloidaksesi sen. Voit myös liekittää suuaukon tämän jälkeen. **VAROVASTI**

5.2.3. Kaada ympäri steriilin suppilon avulla.

Katso video:

<https://www.youtube.com/watch?v=WgySf0L9fFc>

6. Näytteenotto

- Hiivakasvatuksessa näytteitä otetaan tunnin välein
- Ensimmäinen näyte otetaan heti siirrostuksen lisäämisen jälkeen (tämä on ajanhetki $t=0$)
- Näyte otetaan suoraan steriiliin ruiskuun. Ruisku liitetään suoraan näytteenottoletkuun ja näyte vedetään astiasta ruiskuun
- Näytettä tarvitaan noin 20 ml (riittävästi sameusmäärittystä varten)
- Kun näytettä on riittävästi, irrota ruisku ja paina toisella ruiskulla ilmaa toisesta haarasta, jotta näyteletku tyhjenee takaisin astiaan
- Lisää astiaan vitamiiniliuosta 1 ml jokaisen näytteenoton jälkeen
- Näytteestä mitataan sameus sameusmittarilla ja solulukumäärä mikroskooppisesti. Solulukumäärä lasketaan Bürkerin laskukammion avulla. Erillinen ohje liitteenä.

Katso video:

<https://www.youtube.com/watch?v=OwJrucHmSWw>

7. Fermentoinnin lopettaminen

- Kytke jokainen parametri erikseen pois päältä ennen päävirtakytkimestä sammuttamista.
- Poista astioista elektrodi ja sekoitusmoottorit. Ne puhdistetaan ja elektrodit säilytetään asianmukaisella tavalla

- Kun virta on katkaistu, voi astian avata ja ottaa kasvatusliuoksen talteen tai hävittää
- Sulje reagenssipullojen korkit kiristimillä ennen pullojen irrotusta
- Kasvatusastia voidaan tarpeen mukaan uudelleen steriloida, muista silloin esitoimenpiteet
- Pese astia ja letkut VAROEN sopivalla pesuaineella. Jos laitteella suoritetaan pian saman tyyppinen kasvatus, pelkkä vesipesu voi riittää. Letkuista voi pumpata läpi ionivaihdettua vettä käyttämällä pumppujen esitäyttöä

8. Tulosten esittäminen

Työselosteessa esitetään toteutuneet ajo-olosuhteet ja työhön liittyvät kommentit

Kasvatuksen etenemisen seuranta esitetään graafisesti

- Solulukumäärä kpl/ml ajan funktiona
- Sameus (NTU) ajan funktiona