

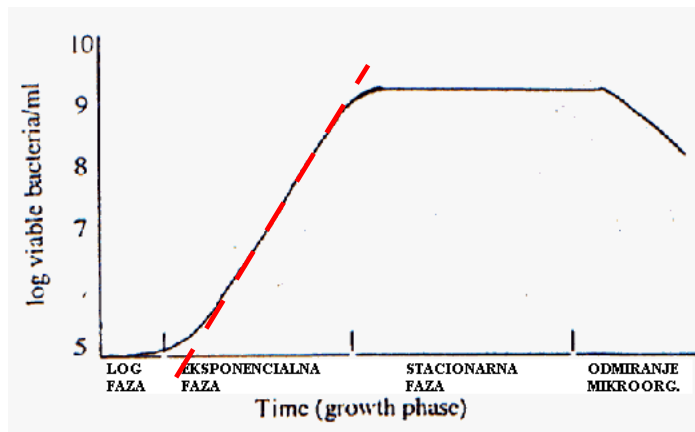
5. VAJA: KINETIKA RASTI MIKROORGANIZMOV V ŠARŽNEM PROCESU

Datum: 24.11.2006

1. OSNOVE

Hitrost rasti mikroorganizmov je pomemben parameter, ki ga moramo poznati za izračun količine biomase. Odvisen je od številnih dejavnikov (tipa mikroorganizma, starosti kulture, gojišča, temperature).

Podatke za izračuna maksimalne specifične hitrosti rasti dobimo iz **eksponencialne faze** rasti mikroorganizmov (glej sliko 1) in glede na to, da je v tej fazi hitrost rasti konstanta velja



Slika 1: Rastna krivulja mikroorganizmov

$$X = X_0 \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t},$$

z začetnimi pogoji $t=0$ in $X = X_0$ dobimo

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\max} \cdot t.$$

Čas t_d , potreben za podvojitvev koncentracije celic je

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}.$$

Obstaja več tehnik za merjenje hitrosti rasti mikroorganizmov. Za spremljanje rasti v industrijskem merilu so primernejše on-line (avtomatizirane) tehnike, za raziskovalne namene pa se uporabljajo bolj specifične. Te so:

1.1. štetje celic: z mikroskopom omogoča neposredno opazovanje (spremembe števila, morfologije celic in morebitne okužbe). Pri vaji smo uporabljali metodo števnih celic (komor), ki imajo točno določen volumen vzorca. Po štetju je potrebno upoštevati še redčitev vzorca.

1.2. določanje suhe mase: najbolj neposredno. Celice odstranimo od medija s centrifugiranjem ali filtriranjem preko membranskih filtrov, jih sušimo (mikrovalovka) in nato tehtamo.

1.3. merjenje optične gostote: ali turbidimetrija. Po odstranitvi suspendiranih delcev (motnost) preostanek v bistri raztopini, ki ga lahko pripišemo biomasi, še vedno vsebuje delce, ki (zaradi sipanja svetlobe na njih) zmanjšujejo prepustnost vzorca. Potrebno je redčiti ($A_\lambda < 0,3$, $420 \text{ nm} < \lambda < 660 \text{ nm}$ za enocelične mikroorganizme).

1.4. določanje vsebnosti proteinov: ti so sestavni del biomase (35-45 % pri kvasovkah) in s tem ko ta raste, raste tudi vsebnost proteinov (potrebno je odšteti delež, ki ga

doprinese sestava gojišča). Uporabili smo biuretsko metodo (reakcija peptidnih vezi s CuSO_4).

2. NALOGA

Z različnimi metodami določiti koncentracijo biomase v odvisnosti od časa za šaržno gojenje kvasovke *S. cerevisiae* MZKI K86 v submerznih kulturah na stresalniku. Izračunati maksimalno specifično hitrost rasti ter čas podvojevanja za dane pogoje in ugotoviti časovno odvisnost proteinov v celicah.

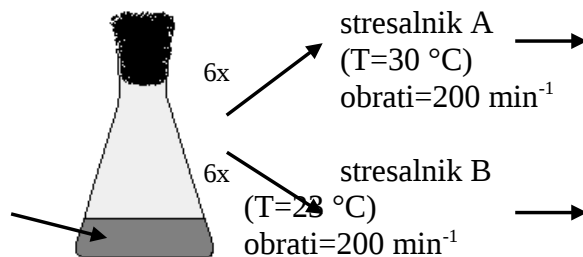
3. APARATURA IN POTEK POSKUSA

5 mL
kulture kvasovk



50 mL steriliziranega
gojišča v 250 ml
Erlenmeyer
steklenicah

čas (h)	0	0,5	1	1,5	2	2,5
oznaka	A0	A1	A2	A3	A4	A5
oznaka	B0	B1	B2	B3	B4	B5

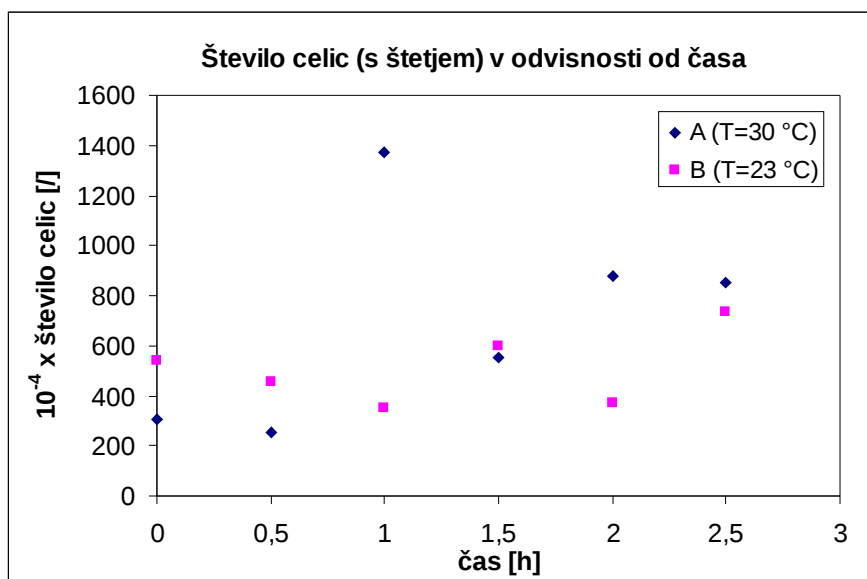


V teh časovnih intervalih odvezemamo erlenmajerice (kot je označeno) za vzorčevanje

4. MERITVE IN IZRAČUNI

4.1. Štetje celic

oznaka vzorca	čas (h)	$10^{-4} \times$ število celic	
		A ($T=30\text{ °C}$)	B ($T=23\text{ °C}$)
0	0	307	537
1	0,5	255	454,5
2	1	1372	349
3	1,5	552	600
4	2	880	370
5	2,5	853	733



4.2. Suha masa

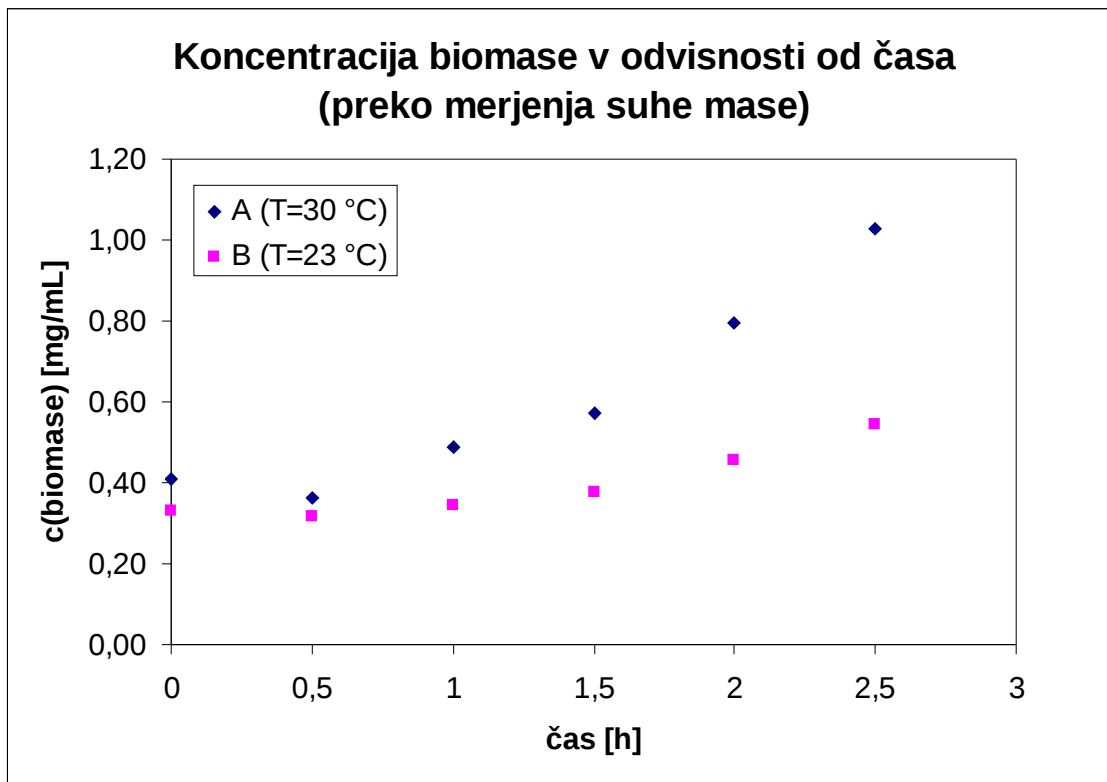
predkultura

V = 5ml

	m (filtra) g	m (filter+biomasa) g	m (b) g	V (ml) mL	c (biomase) mg/mL
y	0,0734	0,0916	0,01820	5	3,64
x	0,07067	0,0938	0,02313	5	4,63
z	0,0708	0,09064	0,01984	5	3,97
C_{povpr}					4,078

kulture

čas h	oznaka vzorca	m (filtra) g	m (filter+biomasa) g	m (b) g	V (ml) mL	c (biomase) mg/mL
0	A0	0,07109	0,08425	0,01316	32,0	0,41
0,5	A1	0,07110	0,08275	0,01165	32,0	0,36
1	A2	0,07106	0,08764	0,01658	34,0	0,49
1,5	A3	0,07127	0,08964	0,01837	32,0	0,57
2	A4	0,07026	0,09491	0,02465	31,0	0,80
2,5	A5	0,07062	0,10354	0,03292	32,0	1,03
0	B0	0,07134	0,08192	0,01058	32,0	0,33
0,5	B1	0,07030	0,08055	0,01025	32,5	0,32
1	B2	0,07118	0,08295	0,01177	34,0	0,35
1,5	B3	0,07031	0,08240	0,01209	32,0	0,38
2	B4	0,07136	0,08646	0,01510	33,0	0,46
2,5	B5	0,07804	0,09552	0,01748	32,0	0,55

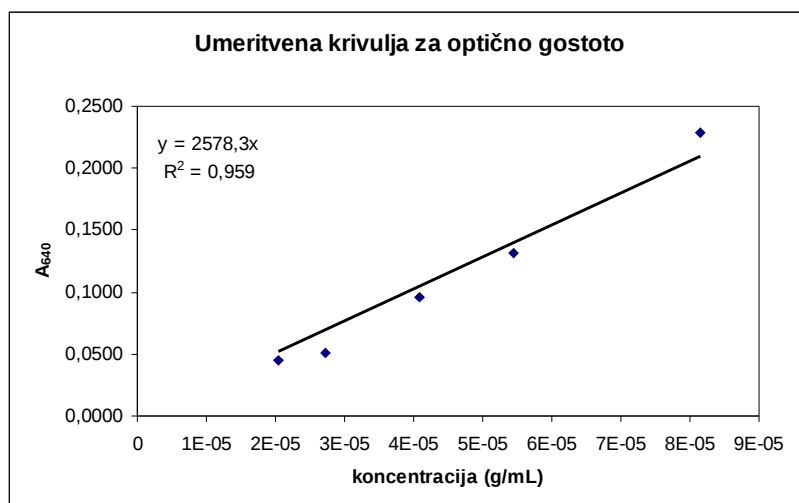


4.3. Optična gostota

Umeritvena krivulja

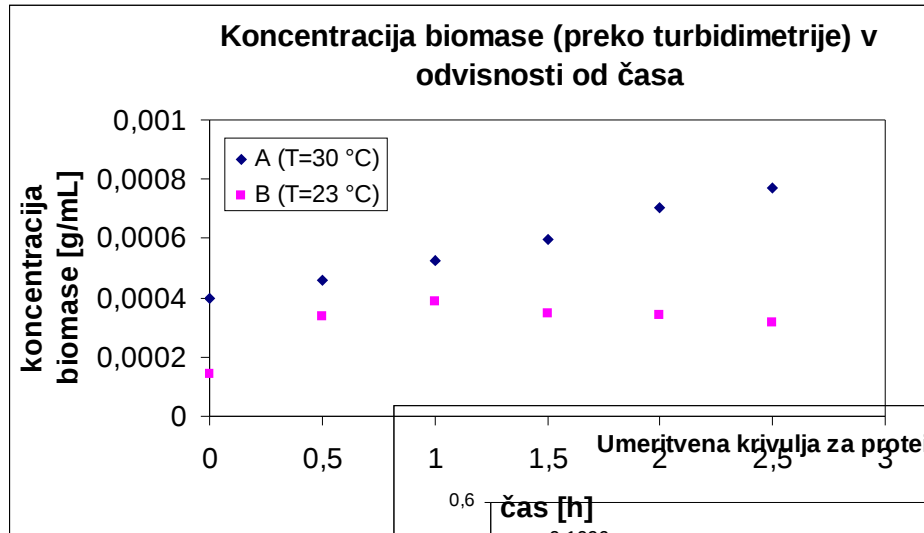
$C_{\text{predkulture}} = 0,004078 \text{ g/mL}$

redčitev	paralelki		A_{povpr}	c (g/ml)
	A1	A2		
50	0,23	0,228	0,2290	0,00008156
75	0,134	0,129	0,1315	5,43733E-05
100	0,094	0,097	0,0955	0,00004078
150	0,052	0,051	0,0515	2,71867E-05
200	0,039	0,051	0,0450	0,00002039



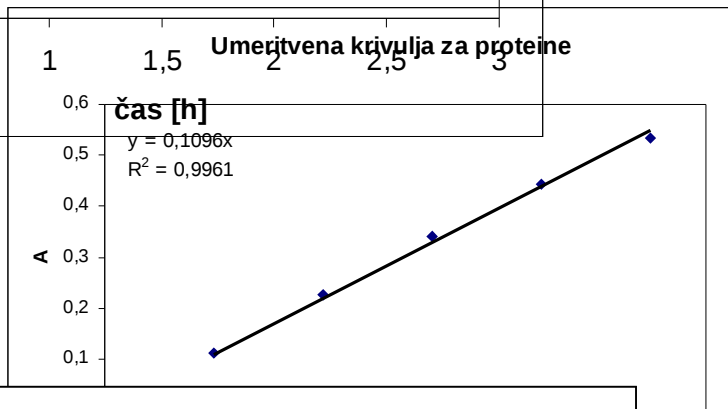
čas h	vzorec in redčitev	A_{640}	C_A g/mL	vzorec in redčitev	A_{640}	C_B g/mL
----------	-----------------------	-----------	---------------	-----------------------	-----------	---------------

0	A0 (10x)	0,102	0,00039561	B0 (10x)	0,037	0,000144
0,5	A1 (10x)	0,118	0,00045767	B1 (5x)	0,173	0,000335
1	A2 (10x)	0,136	0,00052748	B2 (10x)	0,1	0,000388
1,5	A3 (10x)	0,154	0,00059729	B3 (10x)	0,09	0,000349
2	A4 (10x)	0,181	0,00070201	B4 (10x)	0,088	0,000341
2,5	A5 (15x)	0,132	0,00076795	B5 (10x)	0,082	0,000318

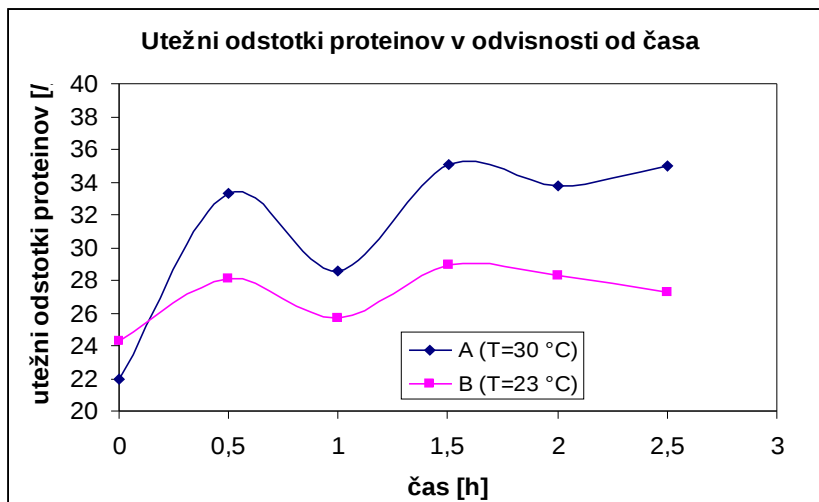
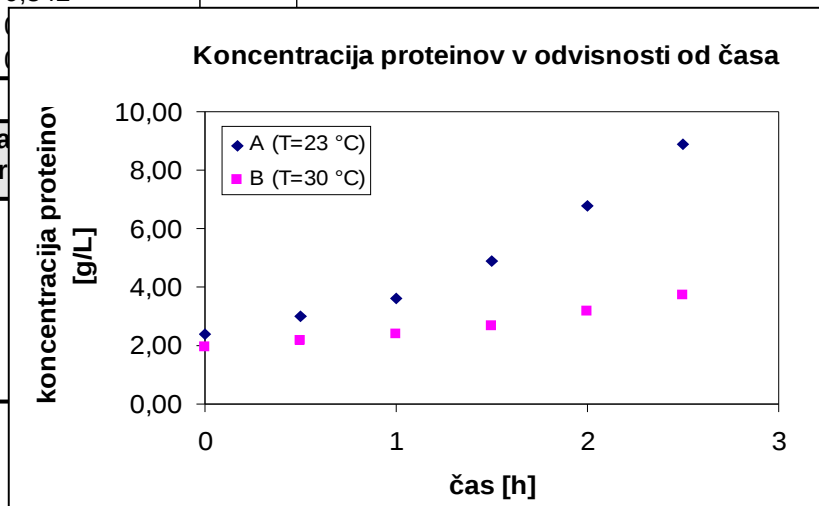


4.4. Proteini

Umeritvena c[g/L]	A [540]
5	0,534
4	0,442
3	0,342
2	
1	



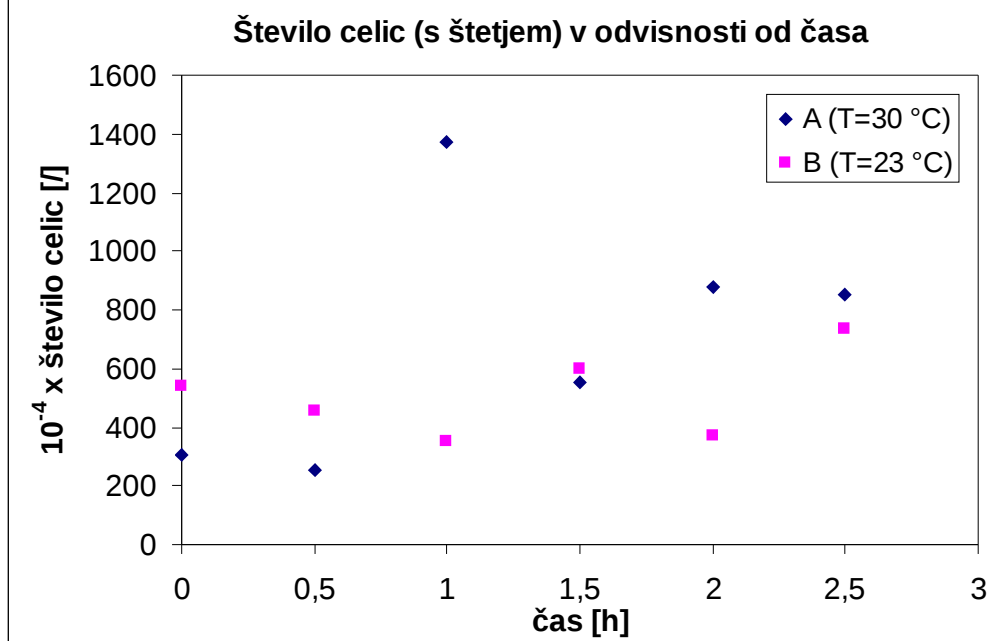
čas (h)	ozna h	vzor
0		
0,5		
1		
1,5		
2		
2,5		



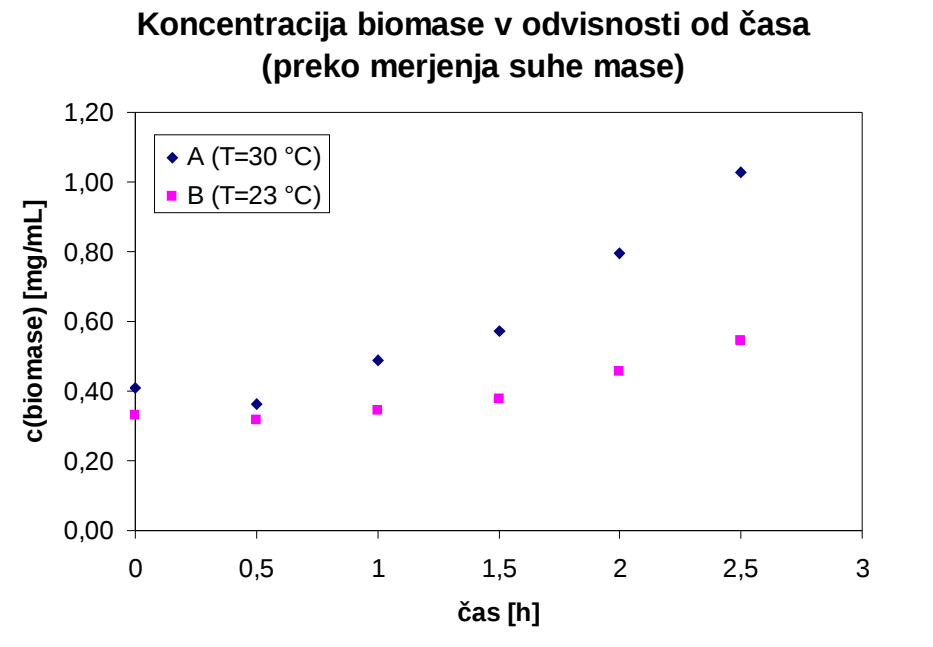
5. REZULTATI IN KOMENTAR

Rezultati v obliki grafov so podani na naslednji strani:

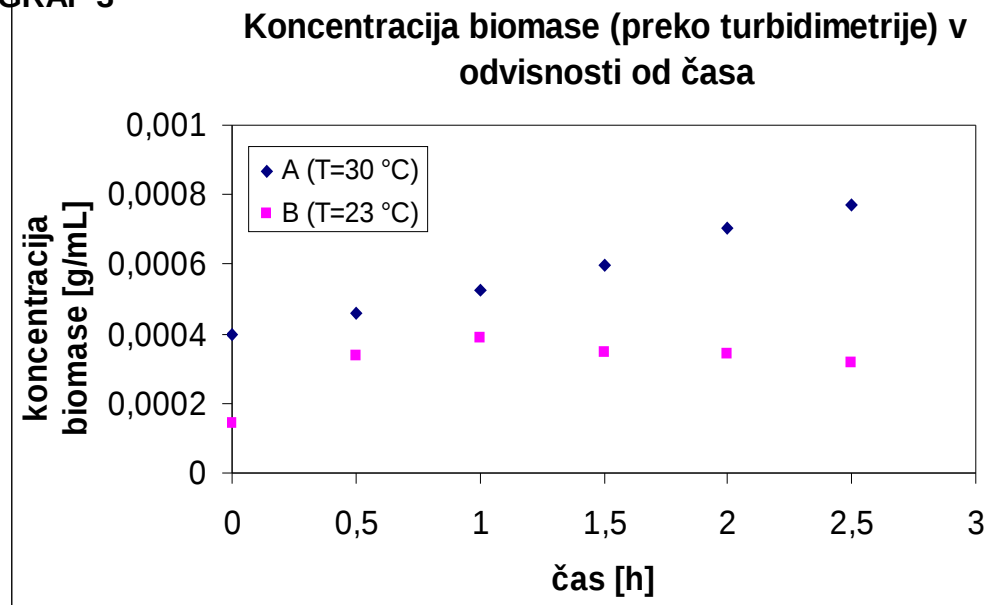
GRAF 1



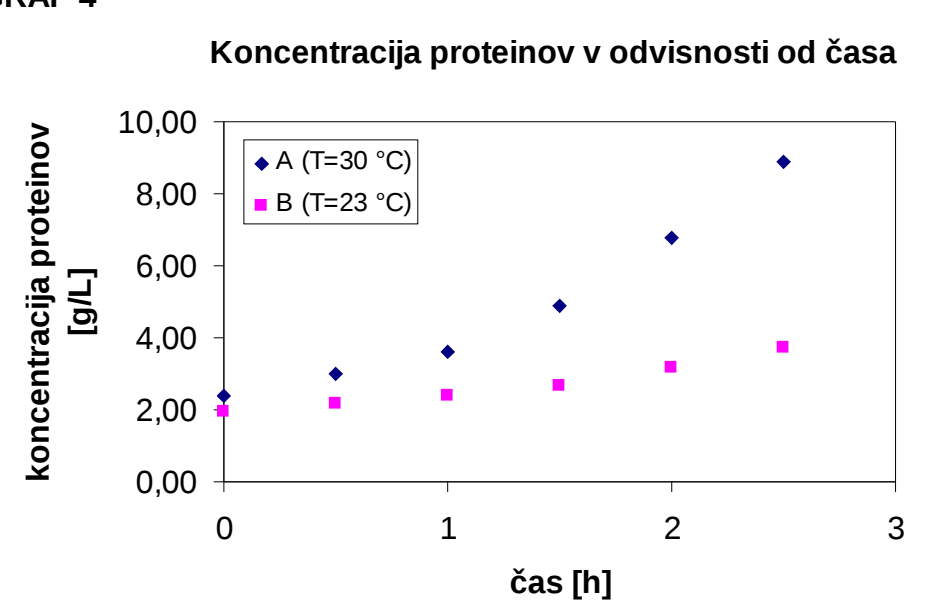
GRAF 2



GRAF 3

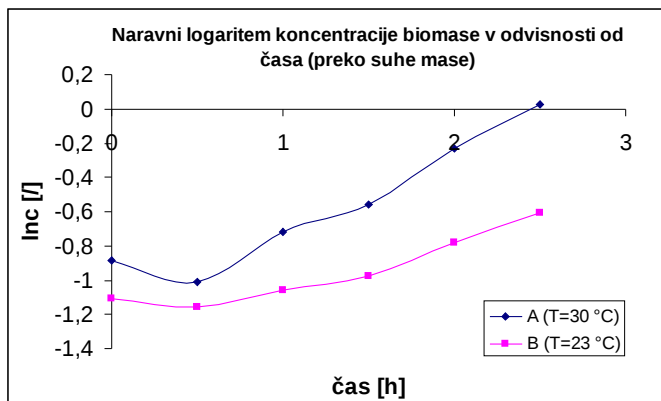


GRAF 4

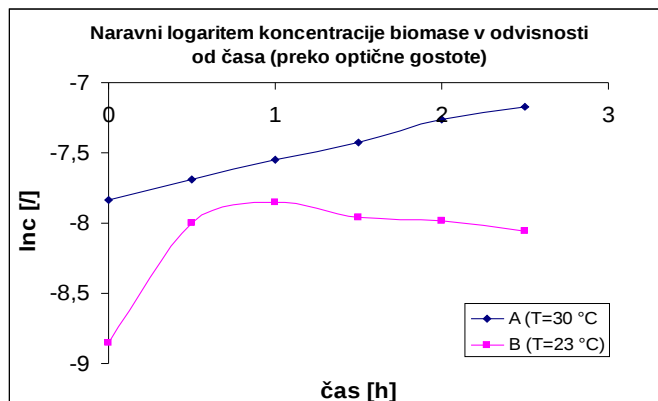


- Grafa za suho maso in optično gostoto kot $\ln c$ v odvisnosti od časa:

GRAF 5



GRAF 6



- Parametrov μ_{\max} in t_d za ta proces ne moremo določiti, ker po 2,5 h gojenja biomase (kolikor je trajal poskus) po podatkih, ki smo jih dobili z različnimi metodami, nismo še dosegli stacionarne faze. Tako tudi nimamo dovolj točk, oziroma ne vemo natančno ali se je že končala eksponentna faza rasti (ugibanje naklona bi bilo veliko in zaradi tega tudi odstopanje v vrednosti μ_{\max}).
- **Komentar:** Kot vidimo iz grafov na prejšnji strani, sta najbolj primerljivi (in s tem tudi zanesljivi) metodi *določanje suhe mase* (graf 2) in *vsebnosti proteinov* (graf 4).

Pri *metodi štetja* (graf 1) je treba upoštevati človeški faktor (tista skupina se je izjemno mučila s štetjem), zaradi česar so podatki pri tem poskusu praktično neuporabni (če bi pri krivulji A izvzeli točko pri $t=1h$ za to temperaturo še dobimo neko zmerno logično krivuljo, medtem ko je krivulja B popolnoma nerazložljiva).

Tudi rezultate *turbidimetrije* (graf 3) lahko jemljemo z zadržkom, glede na to, da ta skupina iz vzorcev pred redčenjem in meritvijo absorbance ni odstranila suspendiranih delcev, ki so pri daljših časih že motili merjenje absorbance (kot se vidi v krivulji B).

Pri vseh grafih je opazno, da je vrednost parametra (t.j. število celic, suha masa, proteini) preko katerega posredno sklepamo na koncentracijo biomase vedno večja pri krivuljah z oznako A, to je pri temperaturi 30 °C. To je logično, saj je po podatkih s spleta¹ optimalna temperatura za rast kvasovk *S. cerevisiae* 32 °C. Krivulje z oznako B (pri temperaturi 23 °C) kažejo isti trend, le da so parametra nižji, kot pri krivuljah A (izjema štetje celic, kjer je skupina nekaj zamočila).

6. LITERATURA

¹ Control of Glycolytic Oscillations by Temperature, Mair et al., *Biophysical Journal* 88:639-646 (2005)