

5. VAJA: KINETIKA RASTI MIKROORGANIZMOV V ŠARŽNEM PROCESU

Datum: 15.12.2006

1. OSNOVE

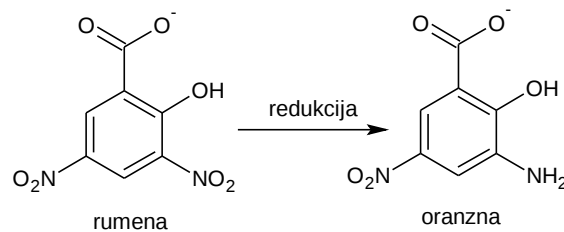
Kvasovka *S. cerevisiae* je fakultativni anaerob. V prisotnosti kisika (kot pri našem poskusu, ko prepihujemo z zrakom) je glavni produkt njenega metabolizma biomasa (piruvat gre v Krebsov cikel, v katerem nastaja CO_2), med fermentacijo (ko ni prisotnega kisika) pa etanol (piruvat gre v etanol preko acetaldehida – odcep CO_2). Opazili so, da je tudi med aerobnim procesom nastaja nekaj etanola, predvsem zaradi prevelikih količin piruvata (ves ne more v Krebsov cikel), ki potem dekarboksilira do etanola.

Pri aerobnem šaržnem procesu poteka pri tej kvasovki diavksična rast, kar pomeni, da se v prvi fazi porabi glukoza za tvorbo biomase in etanola, ko pa glukoze zmanjka, nastopi druga faza, v kateri kvasovka porablja etanol za nadaljnjo rast.

Proces bomo spremljali z naslednjimi parametri:

1.1. koncentracija biomase: z optično gostoto (metoda opisana pri vaji 5)

1.2. koncentracija glukoze: je hkrati vir ogljika in energije. Spremljamo jo z metodo za določevanje reducirajočih sladkorjev. To so tisti, ki v alkalnem reducirajo rumen DNS v oranžen produkt:



1.3. koncentracija etanola: s pomočjo plinskega kromatografa.

1.4. hitrost porabe kisika: ko pridemo v stacionarno fazo začnemo znova spremljati procesne spremenljivke, z dinamično metodo (t.j. ustavimo zračenje in zmanjšamo mešanje, da koncentracija kisika pade na kritično, potem pa spet odpremo zračenje in spremljamo hitrost porabe kisika) določimo r_{O_2} . (z računalnika ni bilo mogoče sneti online podatkov, ker ni imel nobenega izhoda)

2. NALOGA

V laboratorijskem bioreaktorju izvesti aerobni šaržni proces s kvasovko *S. cerevisiae* MZKI K86 in spremljati procesne spremenljivke, identificirati različne faze rasti, oceniti maksimalno hitrost rasti mikroorganizma in respiracije ter izračunati izkoristek biomase glede na substrat.

3. APARATURA IN POTEK POSKUSA

Gojišče, kateremu smo predhodno nastavili pH na 5,2 s fosforno kislino, prenesemo v laboratorijski bioreaktor, umerimo kisikovo elektrodo, vcepimo kulturo, temperaturo držimo konstantno na 30 °C in hitrost mešanja na 400 min⁻¹.

Shema odvzemanja vzorcev:

t [h]	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5
št. vzorca	1	2	3	4	5*	6*	7	8*	9	10

* Po petem, šestem in osmem odvzetem vzorcu smo pH v bioreaktorju spet uravnali na 5,0 (z dodatkom približno 10 mL raztopine NH₄OH).

4. MERITVE IN IZRAČUNI

4.1. Biomasa

Suha masa (vcepka)

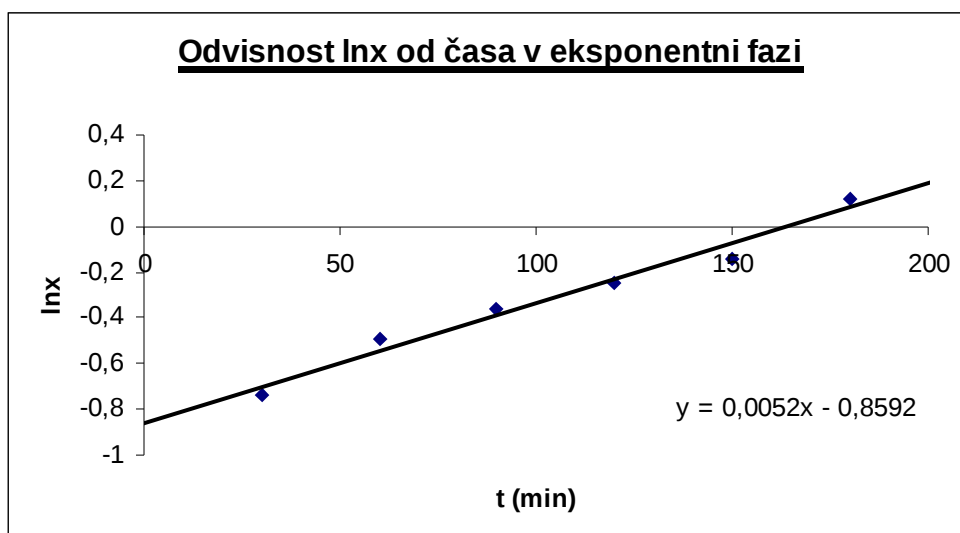
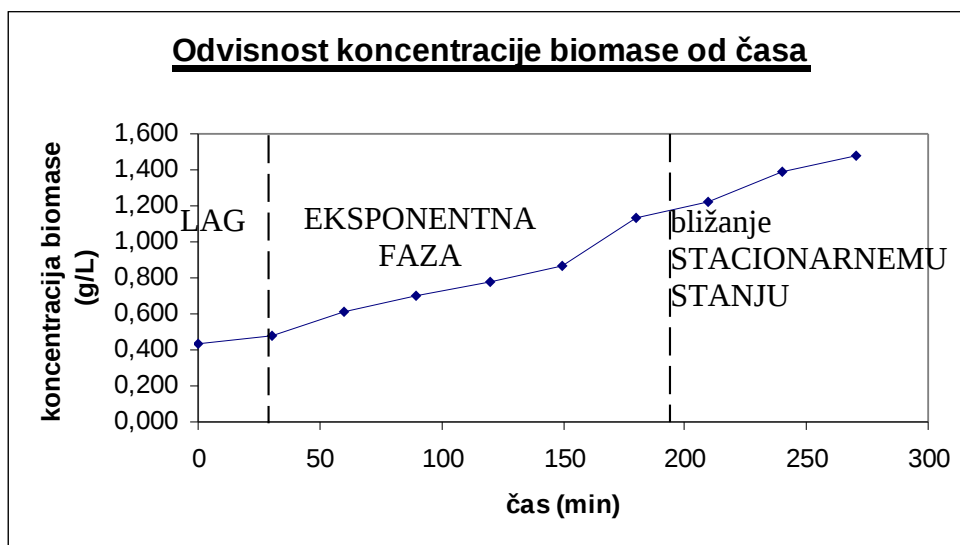
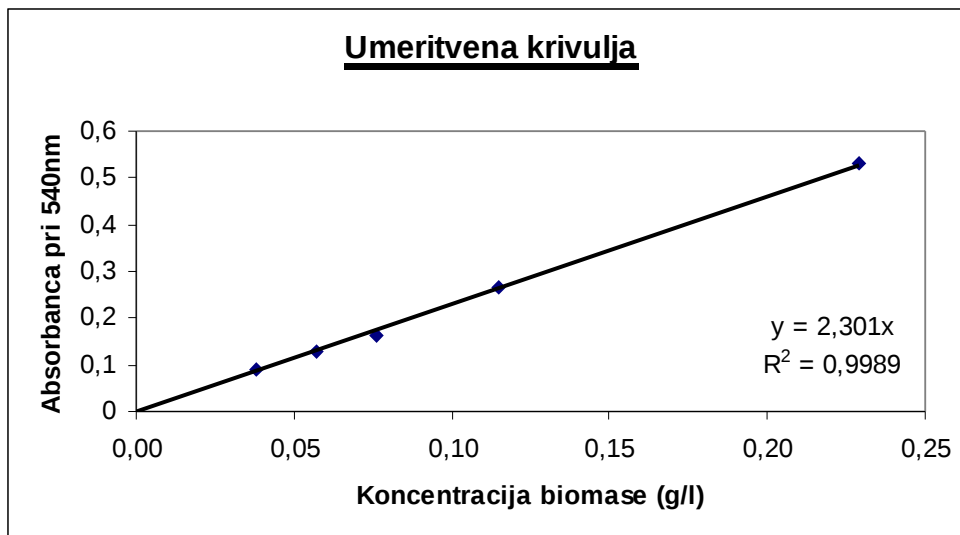
filter	m-filter (g)	m-filter+vzorec (g)	m-vzorec (mg)
1	0,1006	0,1290	28,4
2	0,0998	0,1275	27,7
3	0,0981	0,1279	29,8
povprečje =			28,63 mg
c =			5,73 g/l

Umeritvena krivulja

Redčitev	A1	A2	c (g/l)	povprečje A
25	0,52	0,54	0,23	0,53
50	0,26	0,27	0,11	0,265
75	0,16	0,17	0,08	0,165
100	0,12	0,14	0,06	0,13
150	0,09	0,09	0,04	0,09

Vzorci

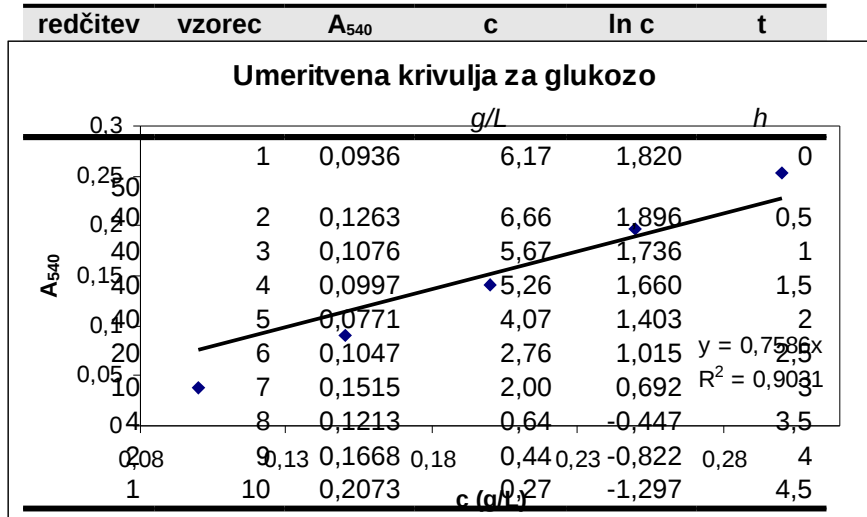
t (min)	Redčitev	A ₅₄₀	c (g/L)	Inc
0	5	0,2	0,435	
30	10	0,11	0,478	-0,73803
60	10	0,14	0,608	-0,49687
90	10	0,16	0,695	-0,36334
120	10	0,18	0,782	-0,24556
150	10	0,2	0,869	-0,1402
180	20	0,13	1,130	0,122168
210	20	0,14	1,217	
240	20	0,16	1,391	
270	20	0,17	1,478	



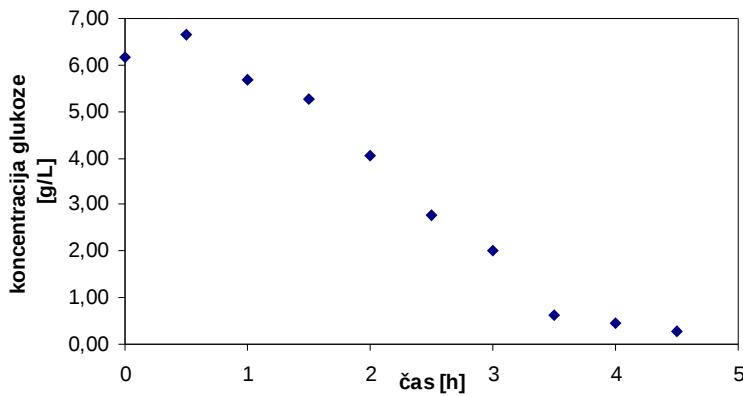
Iz tega grafa vidimo, da je naklon 0,0052, to je hkrati tudi maksimalna specifična hitrost rasti za *S. cerevisiae*, ki jo zapišemo kot $\mu_{\max} = 0,0052 \text{ min}^{-1}$.

4.2. Glukoza

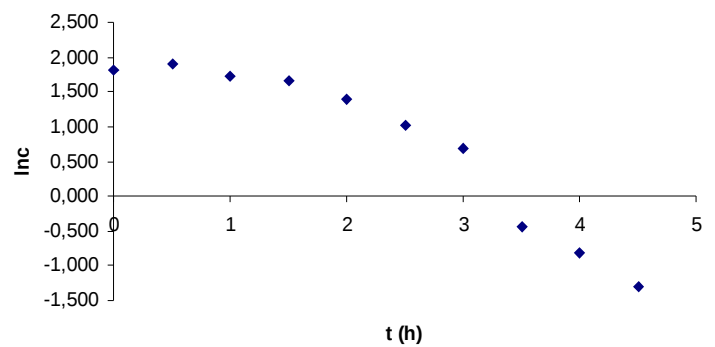
Umeritvena krivulja za glukozo			
c (g/L)	A ₅₄₀	A ₅₄₀	A ₅₄₀ povpr.
0,1	0,0385	0,0378	0,03815
0,15	0,0909	0,0895	0,0902
0,2	0,1387	0,1432	0,14095
0,25	0,1997	0,1946	0,19715
0,3	0,2496	0,2561	0,25285



Koncentracija glukoze v odvisnosti od časa

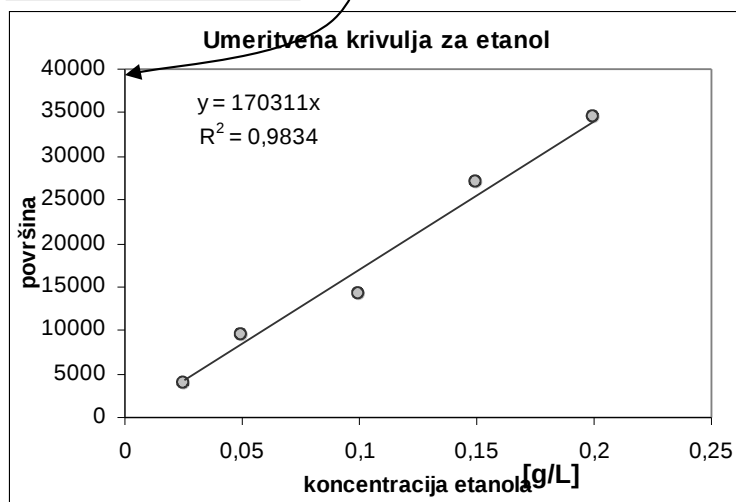


ln c (glukoze) v odvisnosti od časa

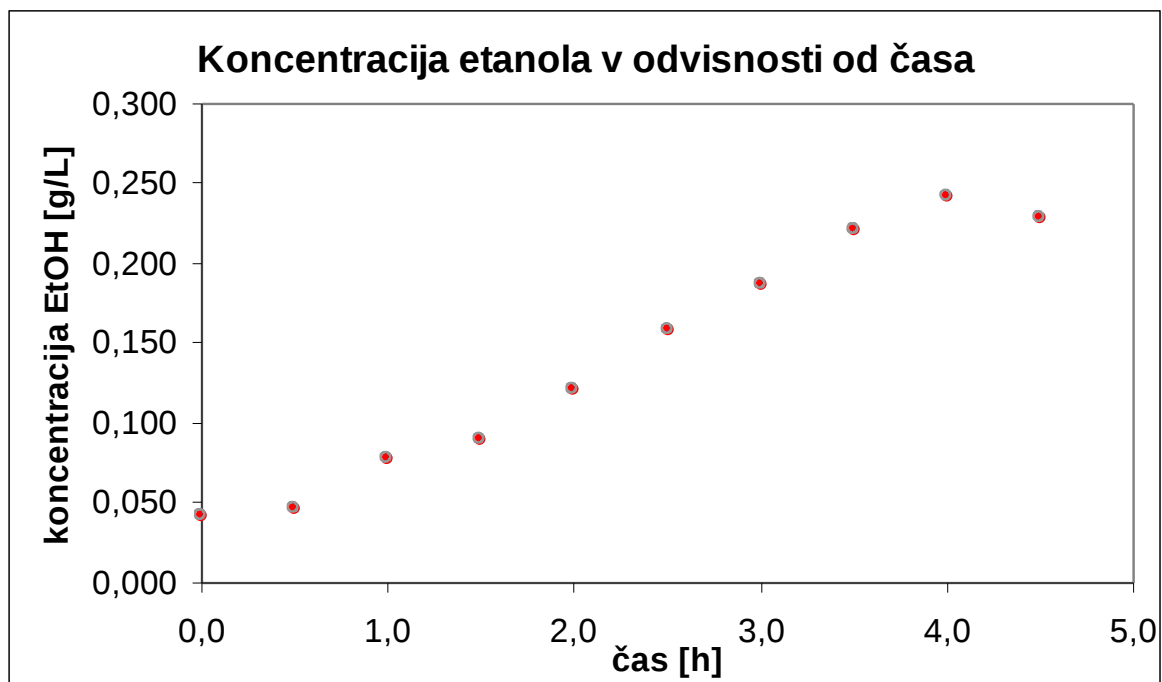


4.3. Etanol

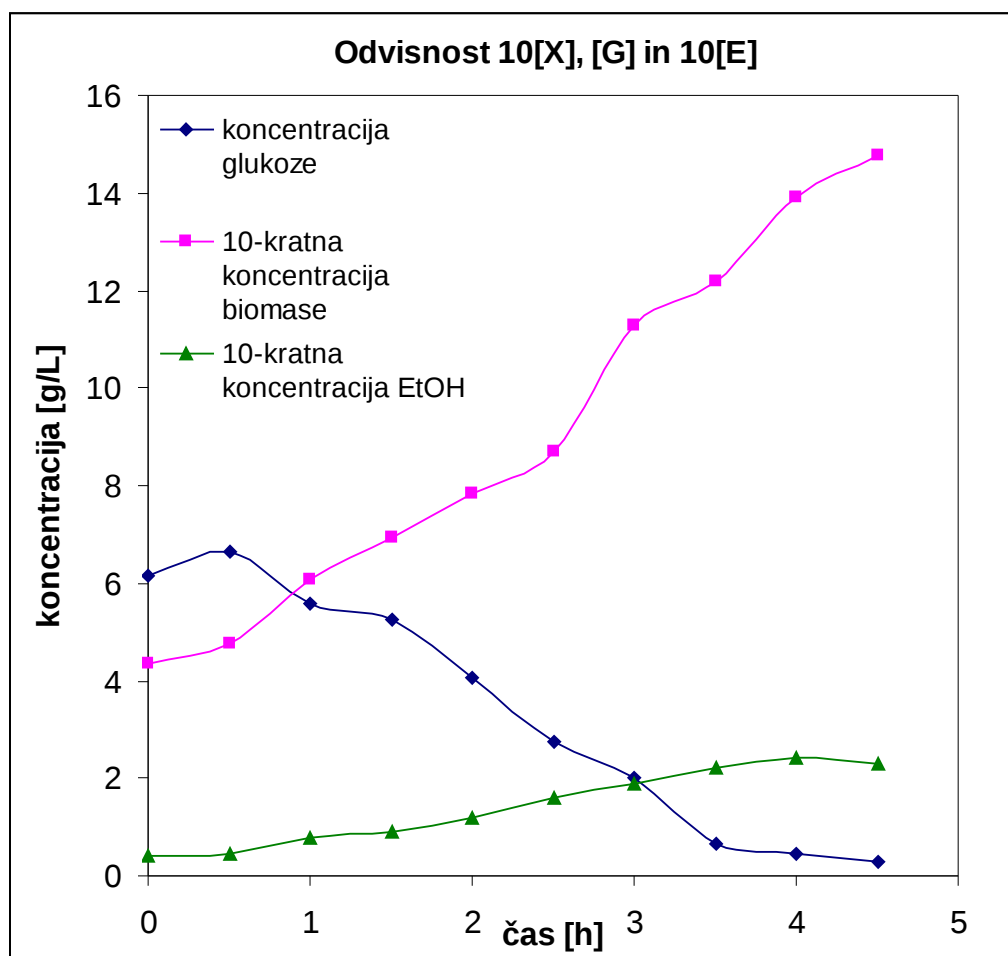
konc.	UMERITVENA		VZOREC	
	površina	povprečje	čas	površina
0,2	35277	34357,67	0	6908
	33680			7185
	34116			7914
0,1	12690	14211,33	0,5	8008
	14964			13483
	14980			12700
0,05	9976	9308,333	1	
	8483			
	9466			
0,025	3929	3786,333	n	170311
	3726			
	3704			



čas [h]	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5
površine	6908	7914	13483	15698	20236	26883	31766	37916	41162	37868
	7185	8008	12700	15008	20999	27007	32024	37500	40958	39550
povprečna površina			15056							38958
povprečna površina	7046,5	7961	13091,5	15254	20617,5	26945	31895	37708	41060	38792
koncentracija etanola	0,041	0,047	0,077	0,090	0,121	0,158	0,187	0,221	0,241	0,228



5. REZULTATI IN KOMENTAR



V zgornjem grafu sta koncentraciji biomase (X) in etanola (E) podani v 10-kratni vrednosti zaradi skale na ordinatni osi (lepši pregled).

izračun $Y_{X/S}$ (izkoristek biomase glede na glukozo)

	t h	X g/L	S=G g/L	$Y_{X/S}$
začetek	0	0,435	6,17	0,07
konec	4,5	1,478	0,27	5,47

- Ocenjena maksimalna specifična hitrost rasti naše kvasovke je $\mu_{\max} = 0,0052 \text{ min}^{-1}$.
- Izkoristek biomase glede na substrat (glukozo), se je iz začetnega 0,07 povečal na 5,47.
- Ne moremo priložiti diagrama on-line meritev, ker računalnik, na katerem smo delali ni imel izhoda za izvoz podatkov.
- Sklepamo da je bilo s poskusom vse v redu, porabljala se je glukozna, s časom je nastalo vse več biomase in etanola.