

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

VAJE IZ BIOTEHNOLOGIJE

5. VAJA – KINETIKA RASTI MIKROORGANIZMOV V ŠARŽNEM PROCESU

Ljubljana, 05. 12. 2007

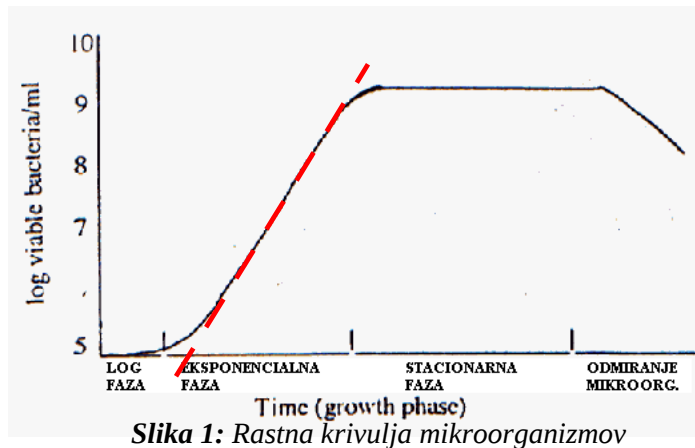
1. NALOGA

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.

2. 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



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

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

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

Čas t_d , potreben za podvojitev 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).

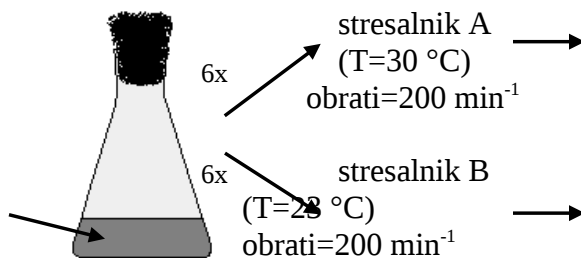
3. APARATURA IN POTEK POSKUSA

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 RAČUNI:

1. Štetje celic z mikroskopsko tehniko

A ($T=30^\circ\text{C}$)					
t [min]	vzorec	redčitev	št. celic	koncentracija [št. celic/mL]	lnc
0	A0	10	79	7900000	15,88237
30	A1	10	87	8700000	15,97883
60	A2	10	102	10200000	16,1379
90	A3	10	200	20000000	16,81124
120	A4	10	135	13500000	16,4182
150	A5	10	230	23000000	16,951
B ($T=23^\circ\text{C}$)					
t [min]	vzorec	redčitev	št. celic	koncentracija [št. celic/mL]	lnc
0	B0	10	71	7100000	15,77561
30	B1	10	74	7400000	15,81699

60	B2	10	85	8500000	15,95558
90	B3	10	90	9000000	16,01274
120	B4	10	84	8400000	15,94374
150	B5	10	115	11500000	16,25786

2. Merjenje optične gostote:

Umeritvena krivulja:

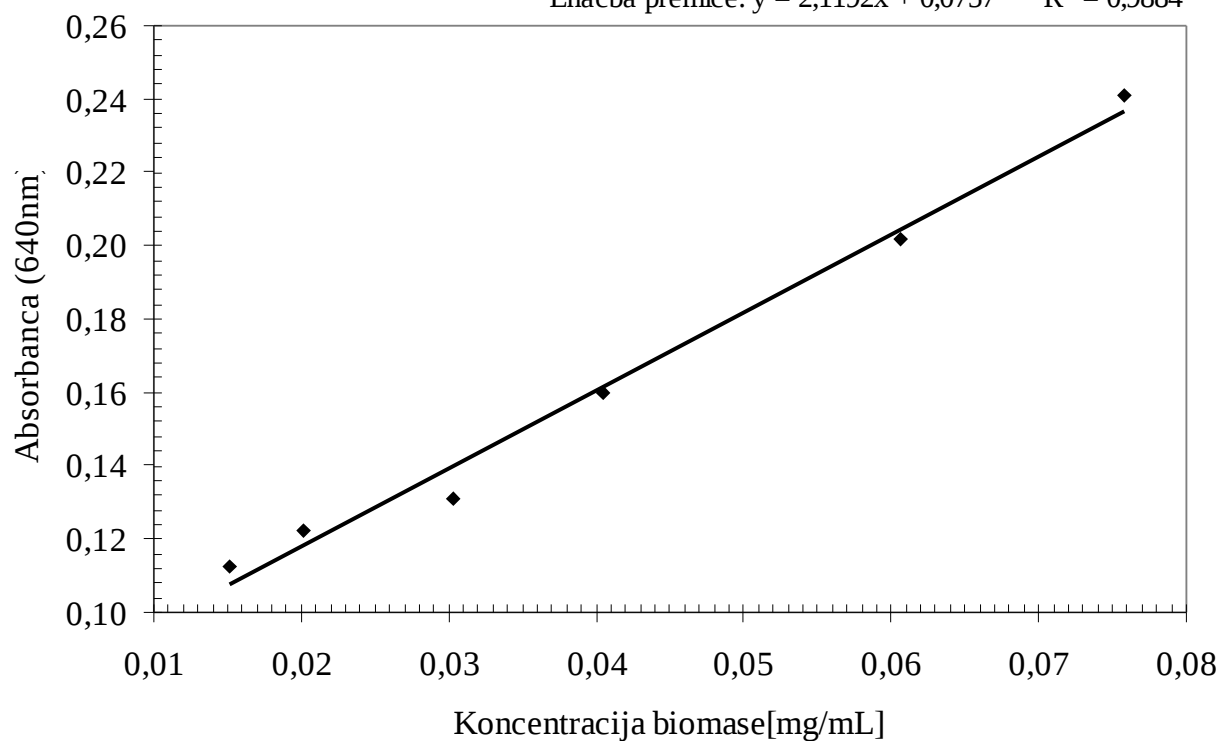
Iz predkulture				
R	A [640nm]	A [640nm]	povprecje	$C_{(biomase)}$ [mg/mL]
40	0,242	0,24	0,241	0,075833333
50	0,211	0,192	0,2015	0,060666667
75	0,16	0,16	0,16	0,040444444
100	0,122	0,14	0,131	0,030333333
150	0,117	0,128	0,1225	0,020222222
200	0,105	0,12	0,1125	0,015166667

Koncentracija biomase v 5 mL: 0,015167

Koncentracija biomase v 1 mL: 0,003033

Absorbanca v odvisnosti od koncentracije biomase

Enačba premice: $y = 2,1192x + 0,0757$ $R^2 = 0,9884$



Meritve:

A (T=30°C)						
čas [min]	vzorec	Redčitev	A [640]	c [mg/mL]	Inc	
0	A0	10	0,155	1,55	0,438255	
30	A1	10	0,225	2,25	0,81093	
60	A2	15	0,12	1,8	0,587787	
90	A3	15	0,14	2,1	0,741937	
120	A4	15	0,166	2,49	0,912283	
150	A5	15	0,178	2,67	0,982078	
B (T=23°C)						
čas [min]	vzorec	Redčitev	A [640]	c [mg/mL]	Inc	
0	B0	10	0,151	1,51	0,41211	
30	B1	10	0,213	2,13	0,756122	
60	B2	15	0,13	1,95	0,667829	
90	B3	15	0,135	2,025	0,70557	

120	B4	15	0,131	1,965	0,675492
150	B5	15	0,152	2,28	0,824175

3. Določanje suhe mase

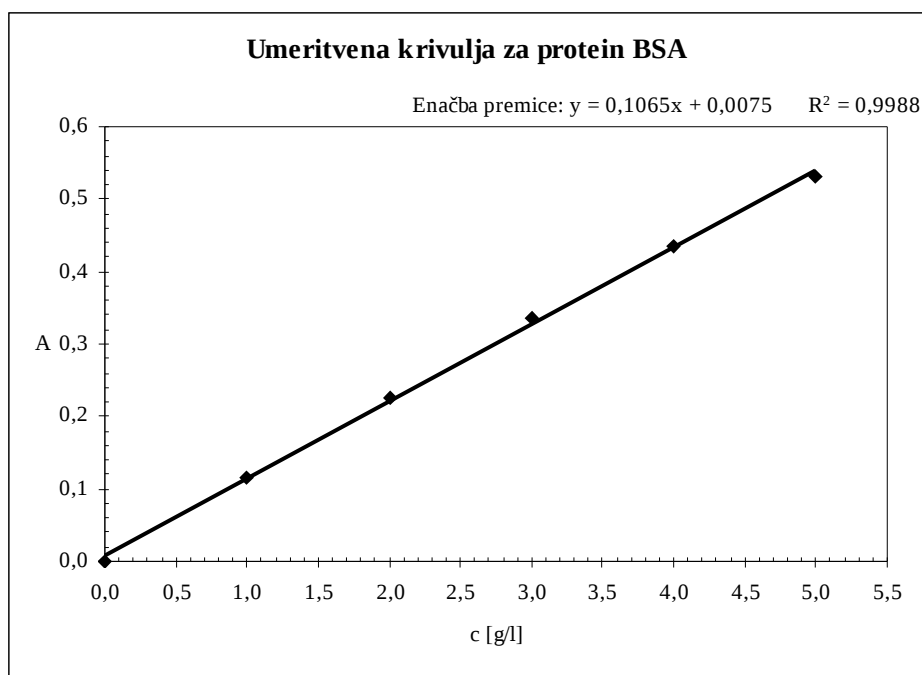
Predkultura	volumen [mL]	m _(filter) [g]	m _(filter+biomasa) [g]	m _(biomasa) [g]
P1	5	0,0846	0,1000	0,0154
P2	5	0,0845	0,1006	0,0161
P3	5	0,0847	0,0987	0,0140
Povprečna masa [g]:				0,015167

A (T=30°C)							
čas [min]	vzorec	volumen [mL]	m _(filter) [g]	m _(filter+biomasa) [g]	m _(biomasa) [g]	X (mg/L)	lnX (T=30°C)
0	A0	41	0,0843	0,0964	0,0121	295,1220	5,687389
30	A1	35	0,0846	0,0968	0,0122	348,5714	5,853843
60	A2	36	0,0842	0,0956	0,0114	316,6667	5,757850
90	A3	37	0,0841	0,0974	0,0133	359,4595	5,884601
120	A4	38	0,0843	0,0987	0,0144	378,9474	5,937397
150	A5	37	0,0840	0,1011	0,0171	462,1622	6,135916
B (T=23°C)							
čas [min]	vzorec	volumen [mL]	m _(filter) [g]	m _(filter+biomasa) [g]	m _(biomasa) [g]	X [mg/L]	lnX (T=23°C)
0	B0	41	0,0840	0,0996	0,0156	380,4878	5,941454
30	B1	35	0,0848	0,0975	0,0127	362,8571	5,894009
60	B2	36	0,0853	0,0994	0,0141	391,6667	5,970411
90	B3	37	0,0848	0,102	0,0172	464,8649	6,141747
120	B4	38	0,0843	0,1048	0,0205	539,4737	6,290594
150	B5	37	0,0844	0,1116	0,0272	735,1351	6,600054

4. Določanje vsebnosti proteinov

Umeritvena krivulja:

c [mg/ml]	A [540nm]
0	0
1	0,115
2	0,225
3	0,336
4	0,436
5	0,531



Meritve:

A (T=30°C)					
čas [min]	vzorec	A 540	5x c [mg/mL]	c [mg/mL]	ln c
0	A0	0,063	521,126761	104,2254	4,646555
30	A1	0,063	521,126761	104,2254	4,646555
60	A2	0,077	652,58216	130,5164	4,871499
90	A3	0,093	802,816901	160,5634	5,078689
120	A4	0,115	1009,38967	201,8779	5,307663
150	A5	0,125	1103,28638	220,6573	5,396611

B (T=23°C)					
čas [min]	vzorec	A 540	5x c [mg/mL]	c [mg/mL]	ln c
0	B0	0,052	417,840376	83,56808	4,425662
30	B1	0,059	483,568075	96,71362	4,571754
60	B2	0,063	521,126761	104,2254	4,646555
90	B3	0,073	615,023474	123,0047	4,812223
120	B4	0,078	661,971831	132,3944	4,885785
150	B5	0,091	784,037559	156,8075	5,055019

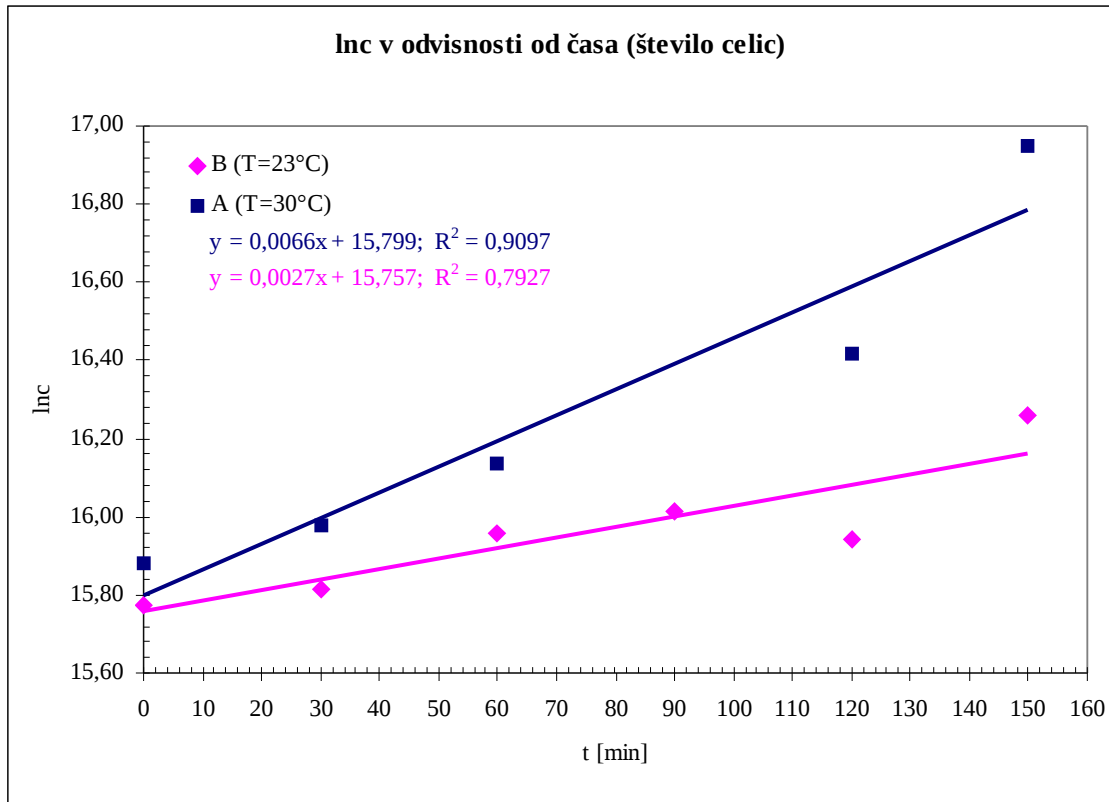
4.1. Utežni delež proteinov glede na koncentracijo celic, dobljeno iz določanja suhe mase

A (T=30°C)				
čas [min]	vzorec	c [g/L]	c proteina [g/L]	utežni % proteinov
0	A0	0,38	0,10	26
30	A1	0,36	0,10	28
60	A2	0,39	0,13	33
90	A3	0,46	0,16	35
120	A4	0,54	0,20	37
150	A5	0,74	0,22	30

B (T=23°C)				
čas [min]	vzorec	c [g/L]	c proteina [g/L]	utežni % proteinov
0	B0	0,29	0,08	28
30	B1	0,35	0,09	26
60	B2	0,31	0,10	32
90	B3	0,36	0,12	33
120	B4	0,38	0,13	34
150	B5	0,46	0,15	33

5.REZULTATI:

Štetje celic z mikroskopsko tehniko:

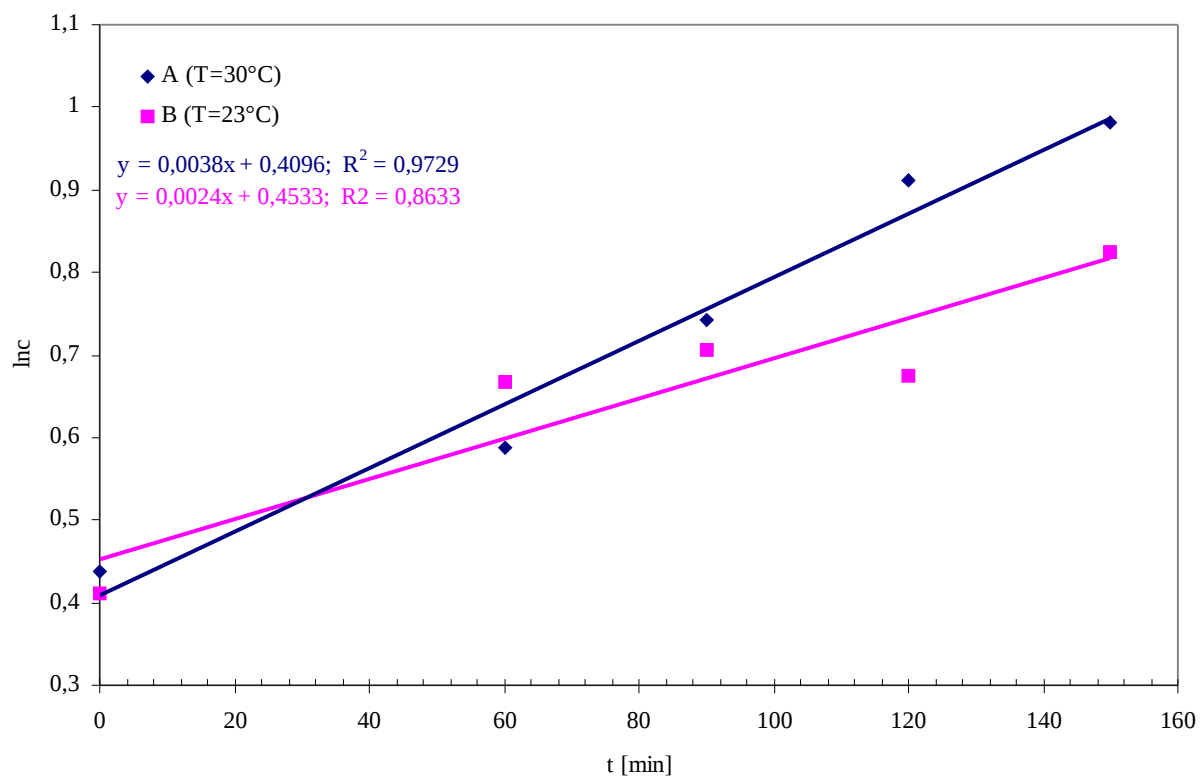


Opomba: pri A smo odstranili točko pri t=90min zaradi prevelikega odstopanja (napaka pri štetju).

	μ_{\max} [h ⁻¹]	td [h]
A (T=30°C)	0,396	1,75
B (T=23°C)	0,162	4,28

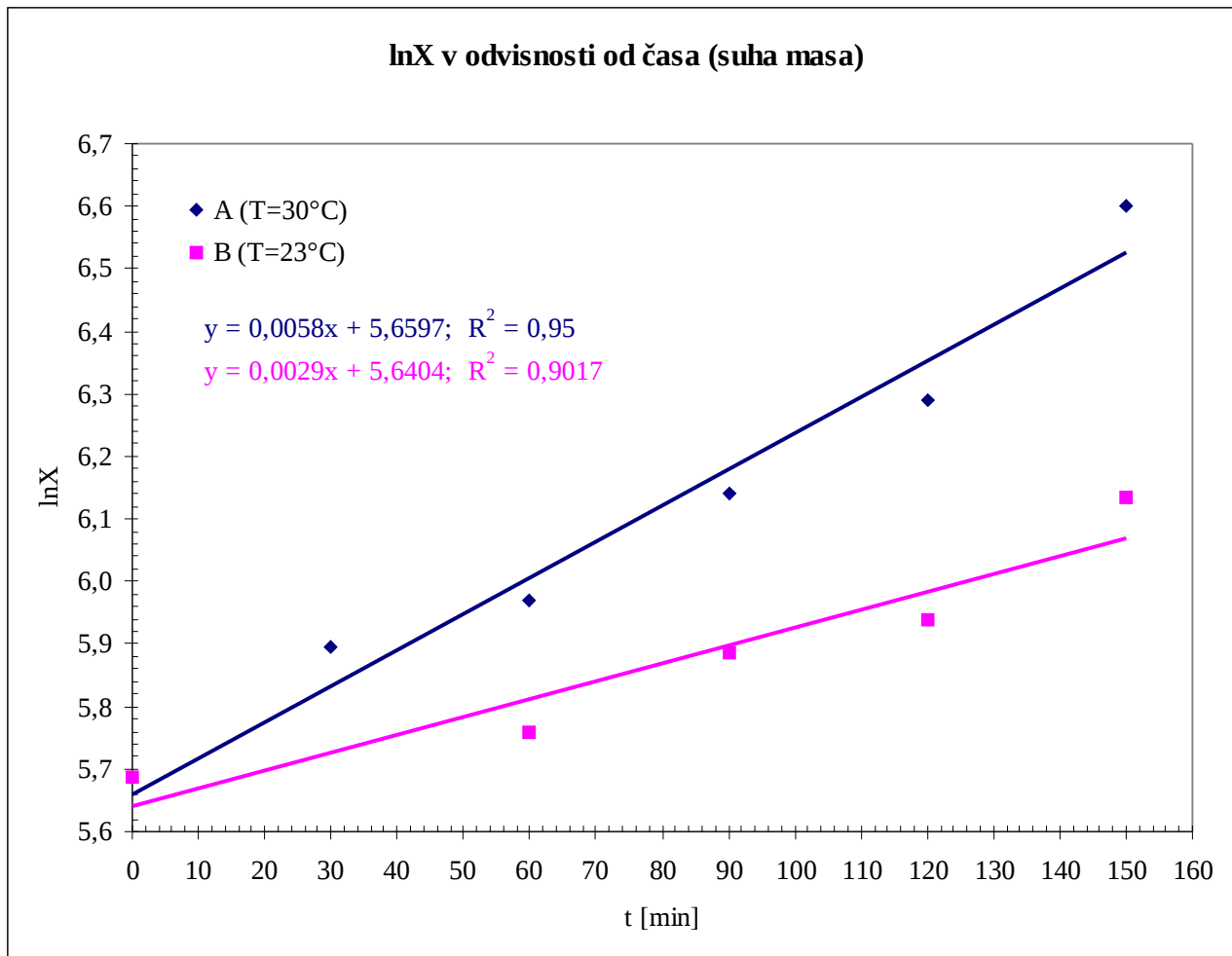
Merjenje optične gostote:

ln c v odvisnosti od časa (optična gostota)



	μ_{\max} [h ⁻¹]	td [h]
A (T=30°C)	0,228	3,04
B (T=23°C)	0,144	4,81

Določanje suhe mase:

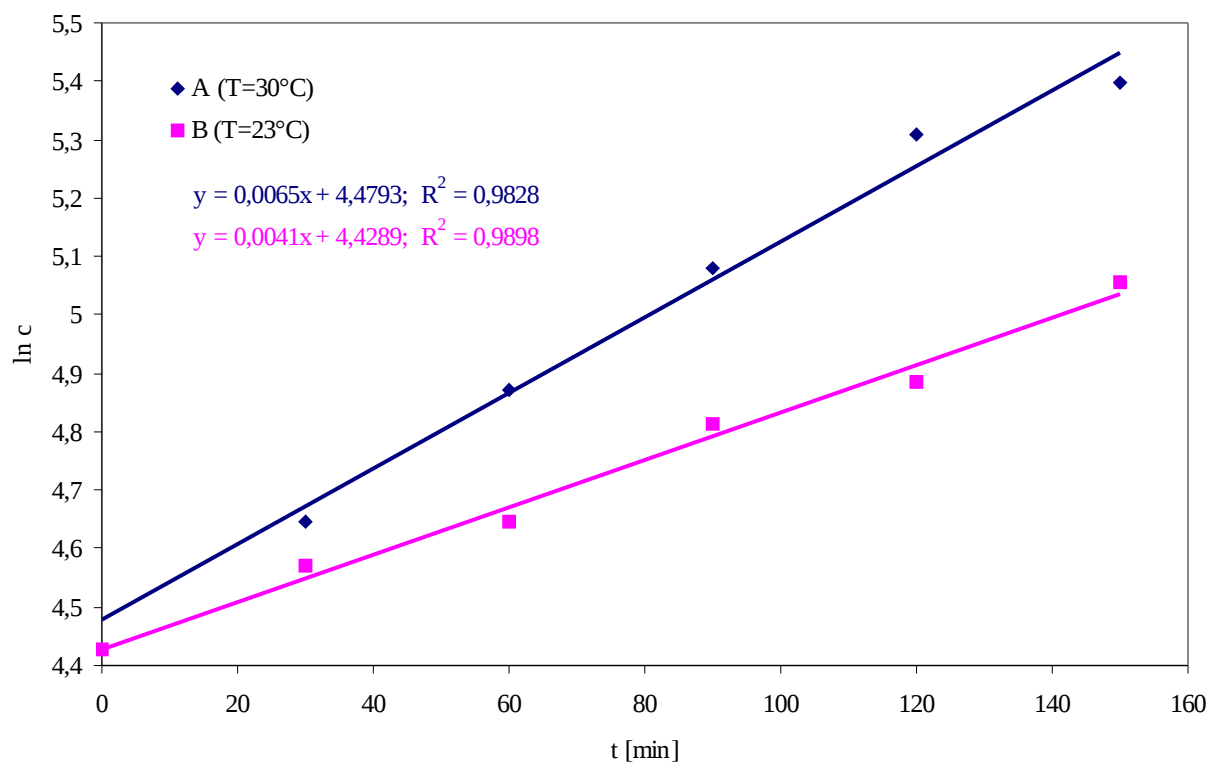


Opomba: zaradi prevelikega odstopanja smo pri A odstranil točko pri t=0min, pri B pa točko pri t=30min (v obeh primerih je bilo prisotno veliko nečistoč – previsoka masa biomase)

	μ_{\max} [h ⁻¹]	td [h]
A (T=30°C)	0,348	1,99
B (T=23°C)	0,174	3,98

Določanje vsebnosti proteinov:

ln c v odvisnosti od časa (koncentracija proteinov)

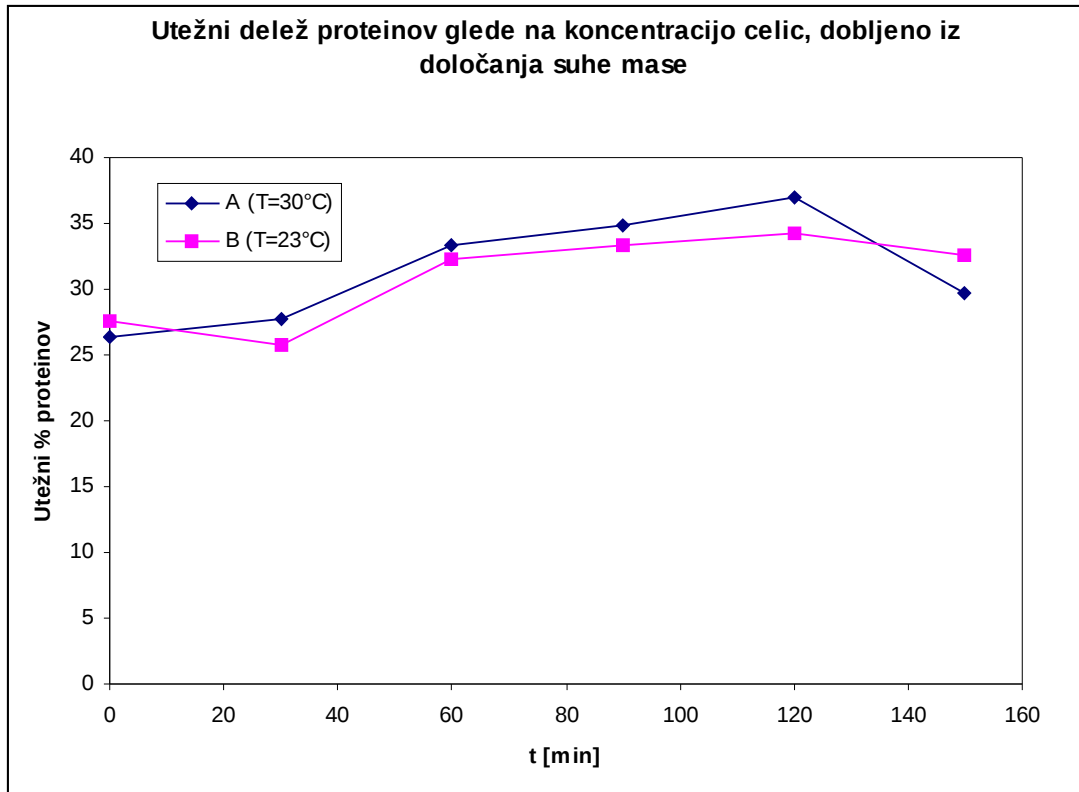


	μ_{\max} [h ⁻¹]	td [h]
A (T=30°C)	0,390	1,78
B (T=23°C)	0,246	2,82

Izračunane vrednosti μ_{\max} in td z različnimi metodami:

Metoda	30°C		23°C	
	μ_{\max} [h ⁻¹]	td [h]	μ_{\max} [h ⁻¹]	td [h]
Štetje celic	0,396	1,75	0,162	4,28
Optična gostota	0,228	3,04	0,144	4,81
Suha masa	0,348	1,99	0,174	3,98
Vsebnost proteinov	0,390	1,78	0,246	2,82

Utežni delež proteinov glede na koncentracijo celic, dobljeno iz določanja suhe mase:



6. KOMENTAR:

Pri vseh metodah so μ_{\max} pri višji temperaturi višje in posledično podvojevalni časi krajši. Iz tega lahko sklepamo, da do večjih napak ni prišlo pri nobeni metodi.

Najvišje vrednosti μ_{\max} (in s tem najkrajše zadrževalne čase) smo pri temperaturi gojenja 30°C dobili z metodo štetja celic, pri 23°C pa pri metodi določanja vsebnosti proteinov. Najnižje vrednosti μ_{\max} (in s tem najdaljše podvojevalne čase) smo pri obeh temperaturah dobili z merjenjem optične gostote. Pri štetju celic zlahka pride do napake zaradi nehomogenega vzorca ali premalo premešanja. Pri določanju suhe mase smo lahko naredili napako v tem, da smo med postopkom filtracije in spiranja gojišča povzročili lizo celic in s tem spiranje dela biomase. Pri nas je pri času A0 in B30 na filter papir prišla nečistoča zato smo ti dve točki na grafu zanemarili.

Pri merjenju optične gostote in vsebnosti proteinom smo dobili neke vmesne, primerljive vrednosti.

Iz izmerjenih parametrov je razvidno, da so za pekovsko kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* bolj ustrezni pogoji pri 30°C.

Utežni delež proteinov narašča s časom gojenja, kar je še posebej očitno pri 30°C. Naraščanje vsebnosti proteinov s časom lahko razložimo z različnimi metabolnimi procesi, ki sčasoma začnejo potekati v celicah. Pri 30°C so deleži proteinov večji, kar se ujema z ugotovitvijo, da je ta temperatura za celice ugodnejša; pride do intenzivnejše produkcije proteinov. Načeloma naj bi opazili nihanja v odvisnosti od faze celičnega cikla, v katerem se celica nahaja, vendar pri nas to ni najbolj vidno.

Velja omeniti, da povečanje mase ni nujno povezano s povečanjem števila celic in tudi ni nujno, da se količina proteinov podvojuje ob delitvi celi, tako da neposredne primerjave hitrosti rasti, določenih z različnimi tehnikami, ne morejo dati enakih rezultatov.