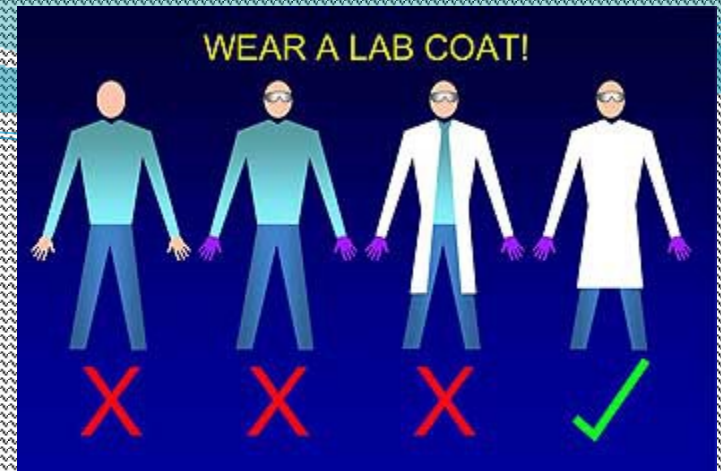


Uvod v delo v biotehnološkem laboratoriju

Vaje iz predmeta osnove biokemije z biotehnologijo

Režim na vajah



- Na vaje pridete pripravljeni
- Na vaje pridete ob točno navedenih urah
- Vaje so obvezne
- Na vajah imate VEDNO haljo, rokavice in očala
- Upoštevate navodila osebja
- Laboratorijski red

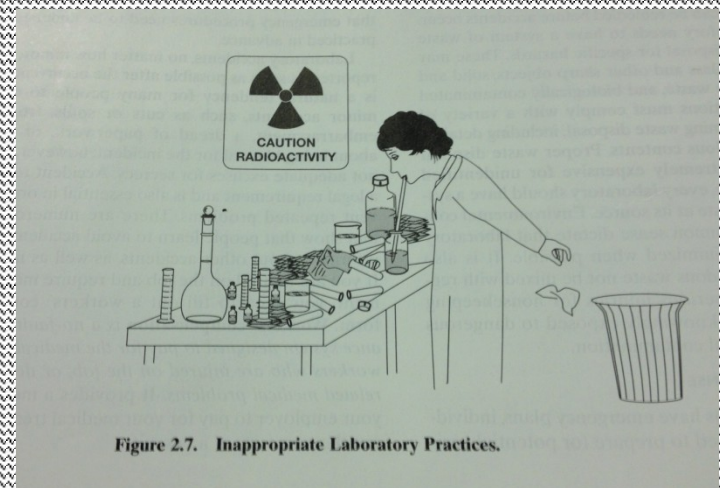


Figure 2.7. Inappropriate Laboratory Practices.

Poročila

- Poročilo za vsako vajo (3 poročila)
- Ime, priimek, datum, naslov vaje, turnus, skupina
- Namen vaje, osnove, podatki in meritve, rezultati, komentar
- Oddate pri naslednji vaji

Kemijska
Tehnologija, VSŠ
1. letnik
2013/2014

1. vaja Priprava gojišč in sterilizacija

Ime Priimek:
Datum:
Turnus:
Skupina

Poročila

● Tabela:

Vzorec	N	N*10-10
1	3*1010	3
2	2*1010	2

Enačba:

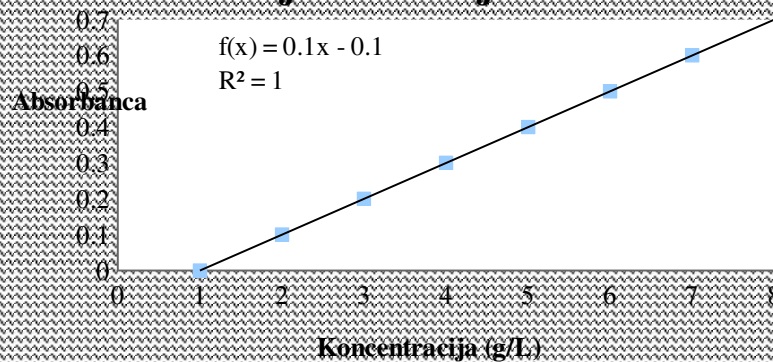
$$3 = N \cdot 10^{-10}$$

$$N = 3 / 10^{-10} =$$

$$3 \cdot 10^{10}$$

● Diagram:

Kalibracijska krivulja - maltoza



● Enote!

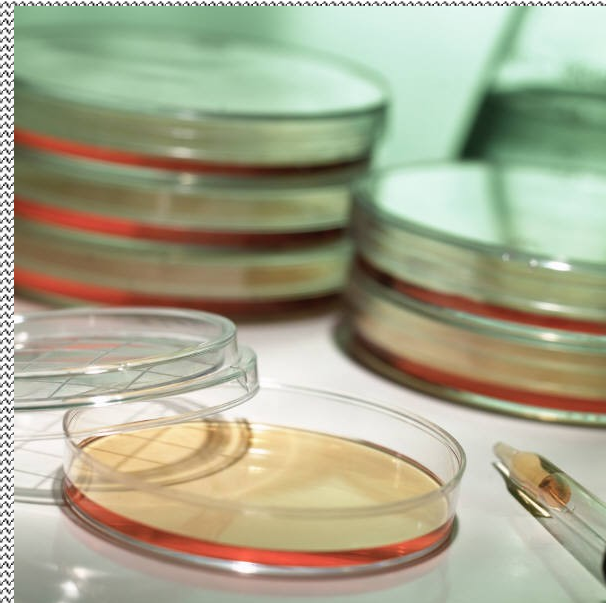
Vaje



- 1. vaja: Priprava gojišč in sterilizacija
- 2. vaja: Mikrobiološke osnove
- 3. vaja: Kinetika rasti v šaržnem procesu

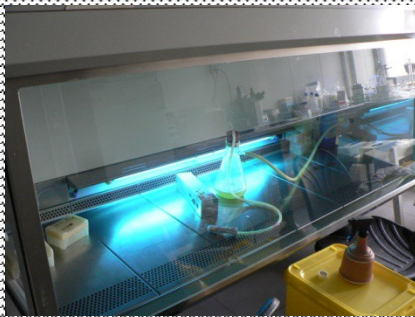
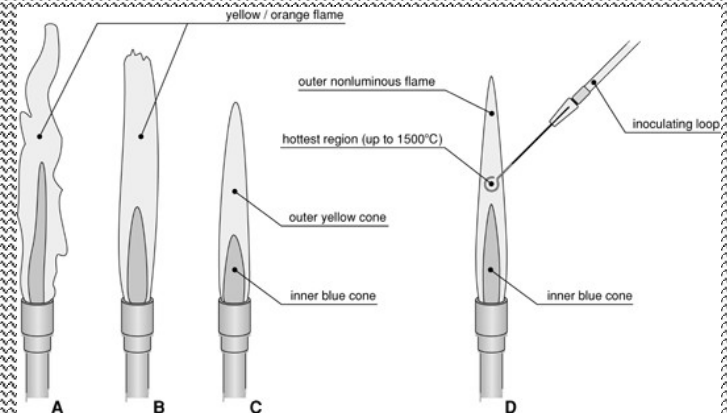
1. vaja: Priprava gojišč in sterilizacija

- Aseptične tehnike
- Priprava trdih in tekočih sterilnih gojišč
- Avtoklaviranje
- Bioreaktorji



1. vaja: Priprava gojišč in sterilizacija

- Aseptične tehnike
 - Sterilnost gojišč in raztopin
 - Preprečevanje okužb



Komora z laminarnim tokom sterilnega zraka



Plamen – območje sterilnosti



Sterilizacija površin

1. vaja: Priprava gojišč in sterilizacija

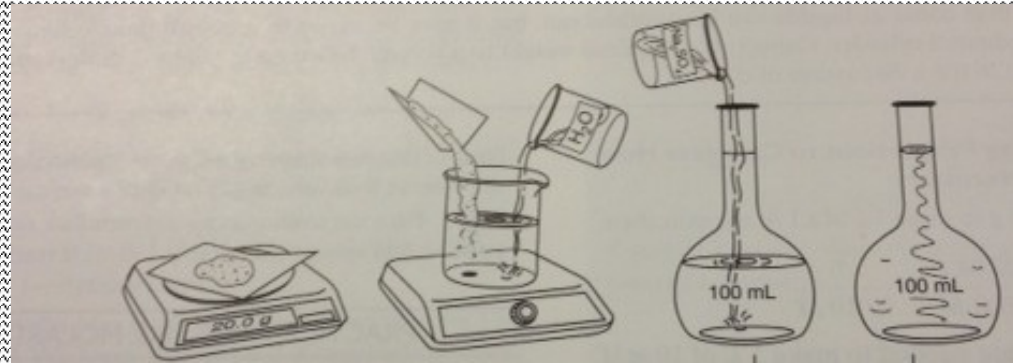
- Izračun koncentracije:

$c = 1 \text{ g/L}$ glukoze, koliko gramov v 800 ml?

1 g....1000 ml

X g.....800 ml

$x = 0,8 \text{ g}$



Pripravite 0,01 vol.% raztopino Tween-80

0,01 vol.% = 0,01 ml/100 ml

10 μl na 100 ml

1. vaja: Priprava gojišč in sterilizacija

- **Sterilizacija:**

čiste kulture vzdržujemo le v sterilnem okolju!

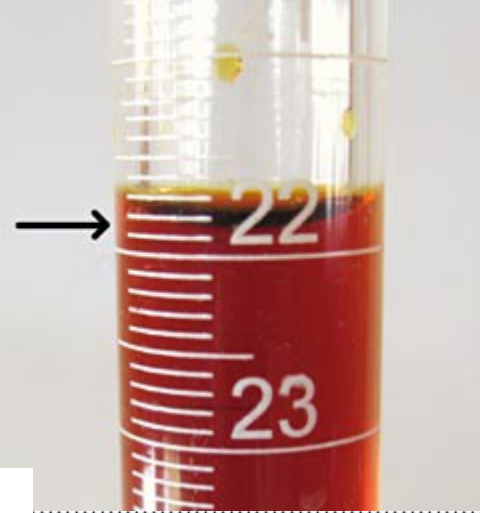
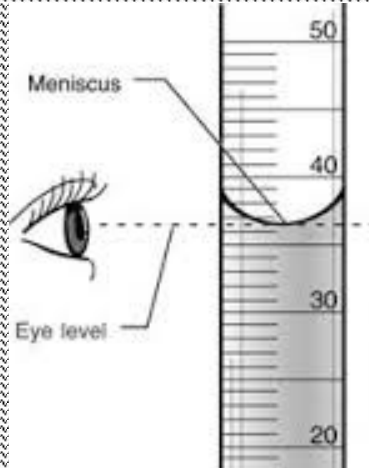
- **suha/mokra toplotna sterilizacija** (1 h 170° C/15-30 min 121° C)
- **tindalizacija** (3 d, 30 min, 100° C)
- **pasterizacija** (30 min 62° C, 15 min 71,6° C, UHT 2 s 141° C)
- **filtracija**
- **kemična sterilizacija** (ozon, formaldehid, etanol, peroksid)
- **radiacija** (UV, ionizirajoče sevanje)

2. vaja: Mikrobiološke osnove

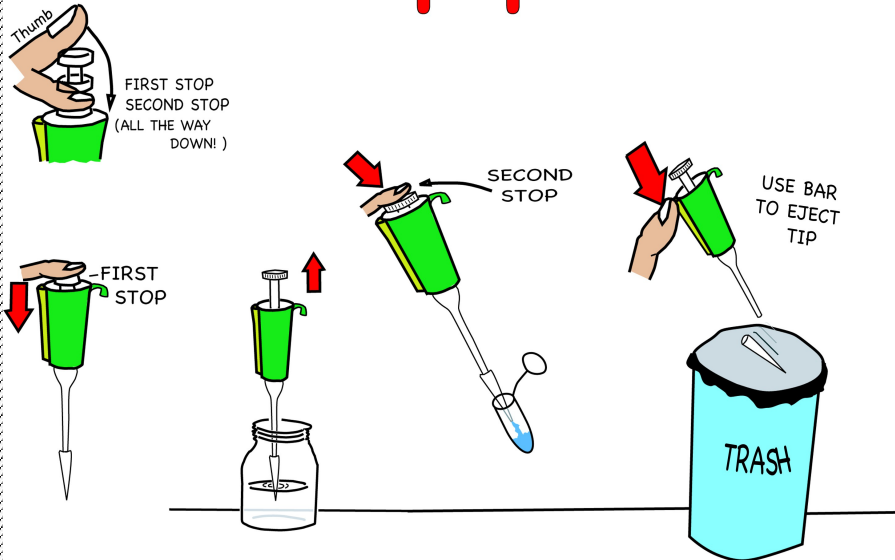
- Spoznavanje gojišč
- Uporaba mikroskopa
- Določanje števila celic
- Aseptično delo
- Priprava agarnih plošč in poševnih gojišč
- Precepljanje mikroorganizmov
- Določanje števila živih organizmov – razredčevalna serija
- Dokazovanje prisotnosti mikroorganizmov

2. vaja: Mikrobiološke osnove

● Pipetiranje:

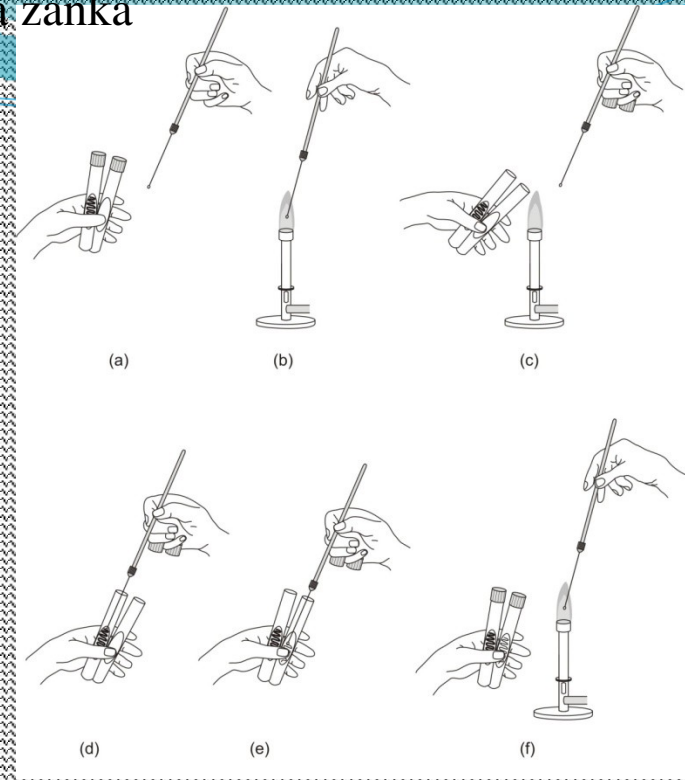


HOW TO USE Micropipettes



2. vaja: Mikrobiološke osnove

- Aseptično delo:
 - Čiste roke
 - Zaprta okna in vrata
 - Kihanje, kašljanje
 - Oznake na steklovini
 - Gorilnik pred sabo, desno cepilno orodje, levo kulture, posode
 - Sterilno steklovina – pri plamenu
 - Robove erlenmajeric, epruvel PRED in PO delu – obžgite v



2. vaja:

Mikrobiološke osnove

● Eksponenti:

$$10^2 = 10 \times 10$$

$$10^3 \times 10^6 = 10^9$$

$$10^{-2} = \frac{1}{10} \times \frac{1}{10}$$

Npr.

bakterijska celica je $0,00000001 \text{ m} = 1 \times 10^{-8}$

št. celic v litru raztopine: $1000000000000 = 1 \times 10^{11}$

Example

$$a^m \cdot a^n = a^{m+n}$$

$$2^3 \cdot 2^4 = 2^7$$

$$x^5 \cdot x^2 = x^7$$

$$(a^m)^n = a^{m \cdot n}$$

$$(2^3)^5 = 2^{15}$$

$$(x^6)^3 = x^{18}$$

$$(a^m b^n)^q = a^{mq} b^{nq}$$

$$(2^2 3^4)^4 = 2^8 3^{16}$$

$$(x^2 y^5)^2 = x^4 y^{10}$$

$$\frac{a^m}{a^n} = a^{m-n}$$

$$\frac{2^6}{2^2} = 2^{6-2} = 2^4$$

$$\frac{x^9}{x^5} = x^4$$

$$a^{-n} = \frac{1}{a^n}$$

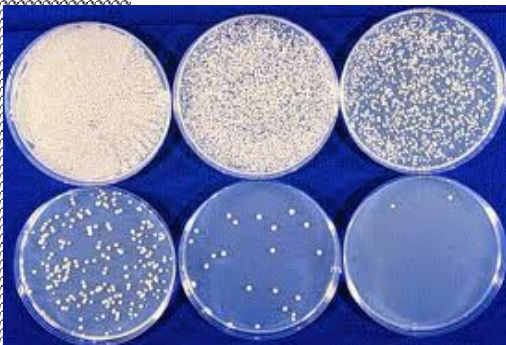
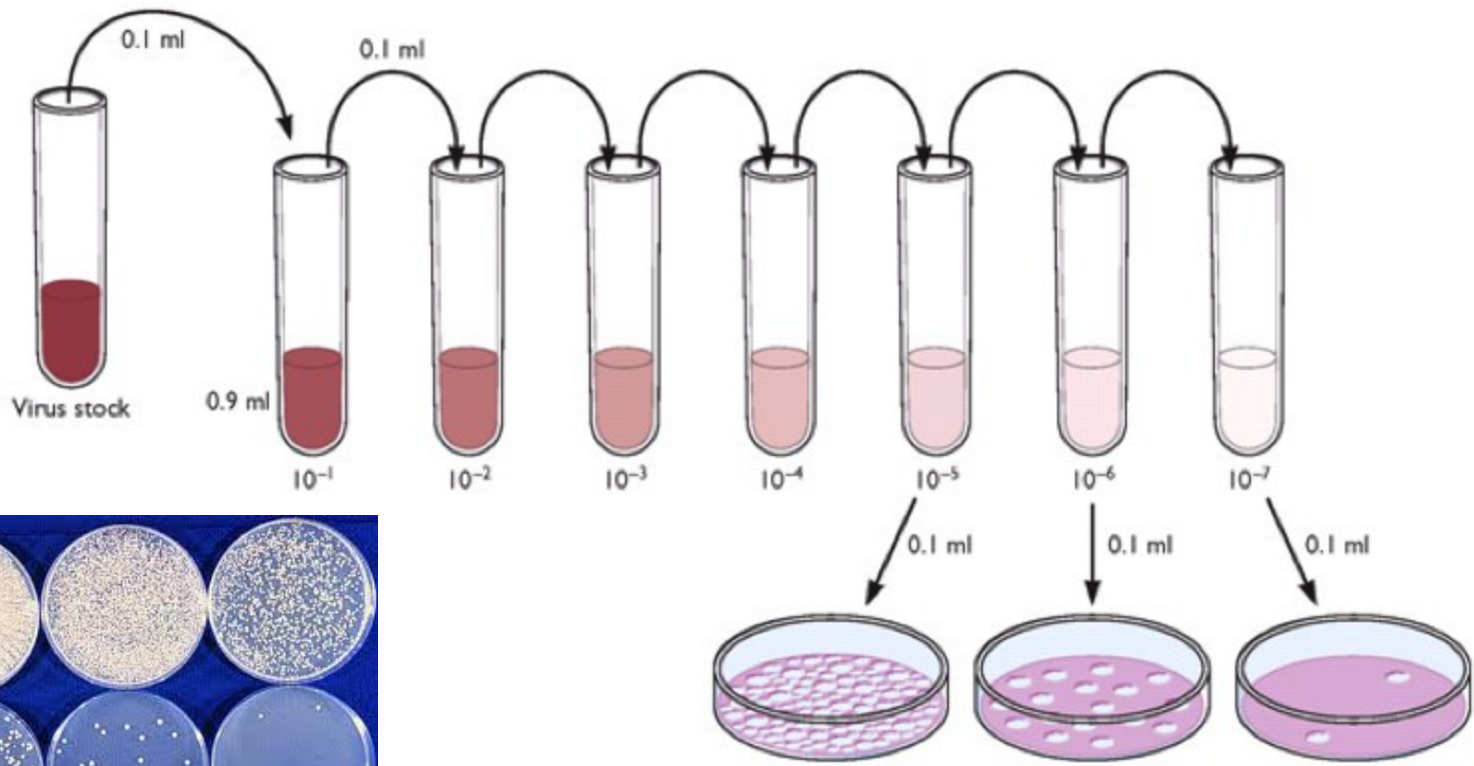
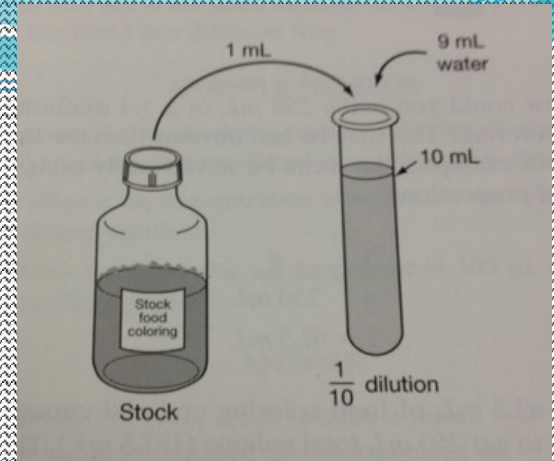
$$2^{-7} = \frac{1}{2^7}$$

$$x^{-2} = \frac{1}{x^2}$$

2. vaja: Mikrobiološke osnove

Razredčitve:

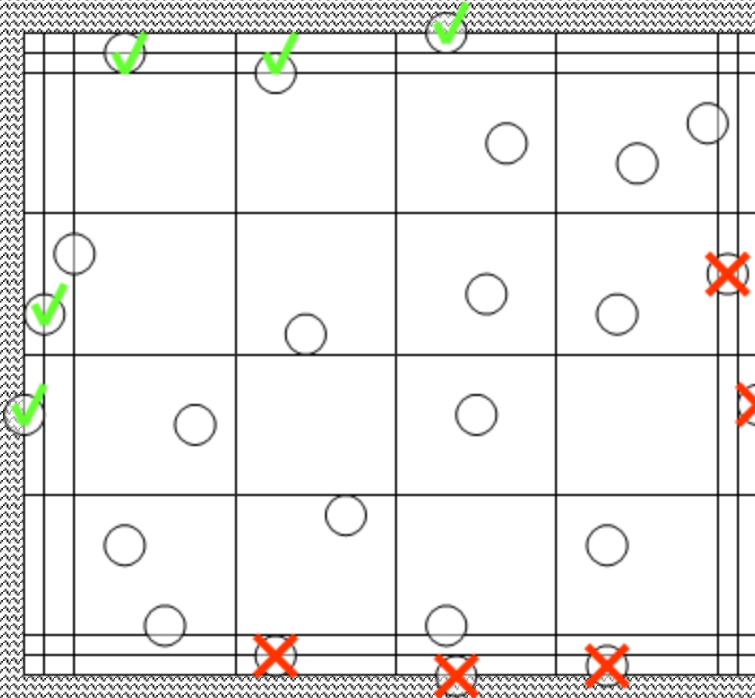
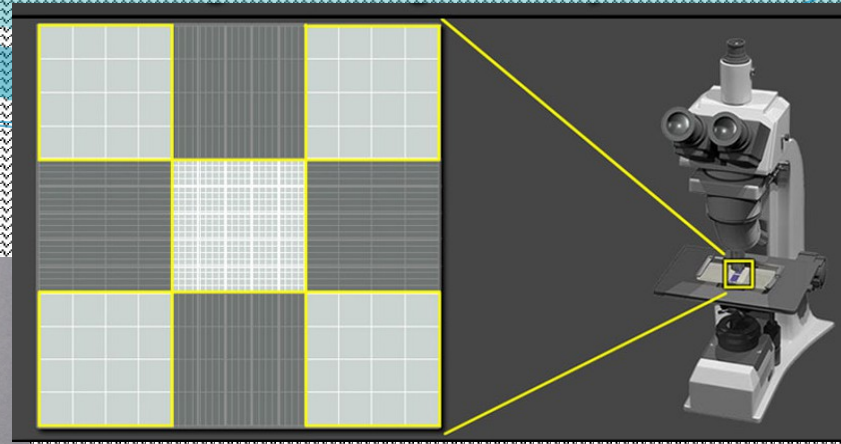
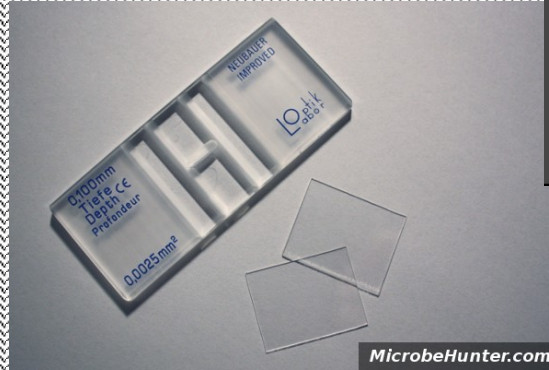
- 1 ml v 10 ml:
- 10 x razredčeno
- 10⁻¹
- 1/10
- 0,1



Določamo št. živih celic

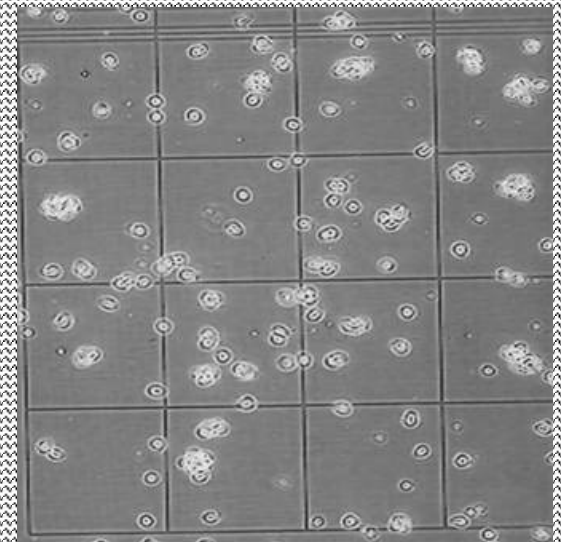
2. vaja: Mikrobiološke osnove

Štetje celic:



✓ Include cells touching middle line on top and left

✗ Exclude cells touching middle line on bottom and right



Določamo št. vseh celic

3. vaja: Kinetika rasti v šaržnem procesu

- Šaržno gojenje pekovske kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*
- Koncentracija biomase v odvisnosti od časa
- Rastne krivulje
 - Specifična hitrost rasti
 - Čas podvojevanja
- Vsebnost proteinov v celicah

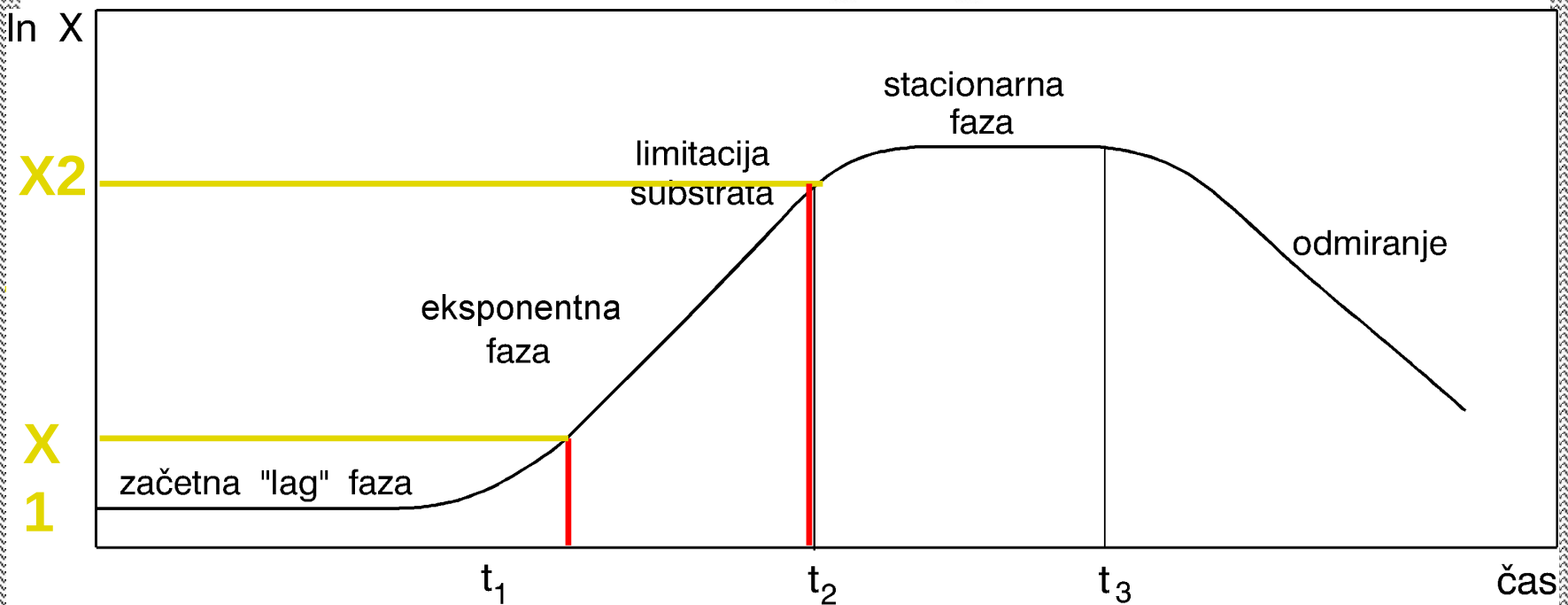
3. vaja: Kinetika rasti v šaržnem procesu

- Hitrost rasti biomase: $r_X = \mu X$
- Eksponentna faza rasti = maksimalna specifična hitrost rasti, $t=0$, $X=X_0$
 $X = X_0 \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}$ oz. $\ln X = \ln X_0 + \mu_{\max} \cdot t$
- Čas podvojevanja t_d :
 $\ln 2X_0/X_0 = \mu_{\max} \cdot t_d$ oz. $t_d = \ln 2 / \mu_{\max}$

3. vaja: Kinetika rasti v šaržnem procesu

- Rastna krivulja mikroorganizmov

$$\mu_{max} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$



3. vaja: Kinetika rasti v šaržnem procesu

- Tehnike merjenja hitrosti rasti
 - Štetje celic
 - Določanje suhe biomase
 - Merjenje optične gostote
 - Določanje vsebnosti proteinov

3. Kinetika rasti v šaržnem procesu

• Določanje suhe mase:

- Stehtamo filter (predhodno posušen) in zabeležimo težo
- Filter damo v lij/frito – uporabimo pinceto
- Čez filter prelijemo tekočino
- Filter posušimo v sušilniku/mikrovalovni pečici.
- Filter damo v eksikator
- Nato ga ponovno stehtamo.

m_f = masa filtra

m_{f+v} = masa filtra + vzorec

m_v = masa vzorca

$$m_v = m_{f+v} - m_f$$

Npr.

$$V = 39 \text{ mL}$$

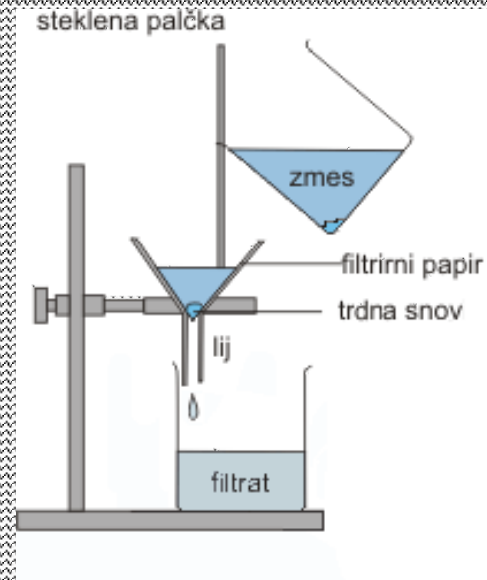
$$m_f = 0,0768 \text{ g}$$

$$m_{f+v} = 0,11693 \text{ g}$$

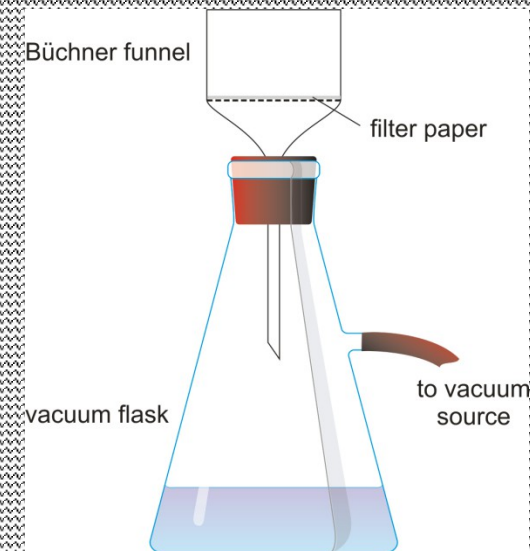
$$m_v = 0,11693 - 0,0768 = 0,04013 \text{ g}$$

$$c = 0,04013 \text{ g}/39 \text{ ml}$$

$$c = 1,029 \text{ g/L}$$



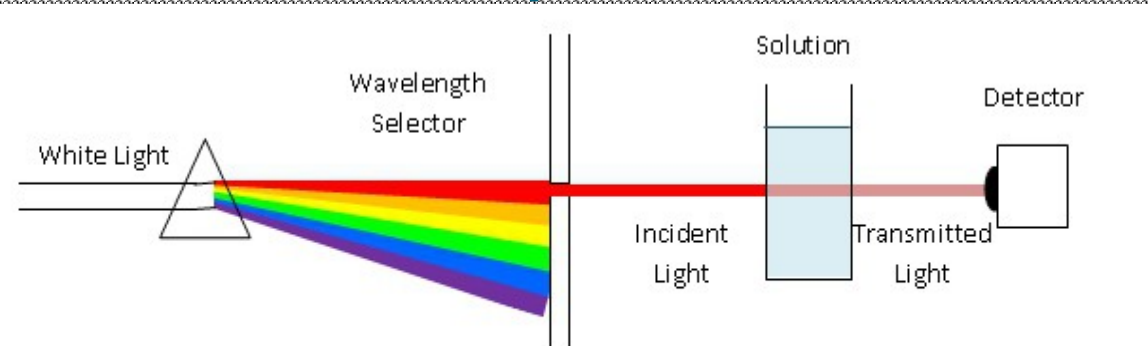
Običajna filtracija



Vakuumska filtracija

3. Kinetika rasti v šaržnem procesu

Spektrofotometer:



The difference between the incident and transmitted light indicates the absorbance

$$y = k \cdot x + n$$

y = absorbanca vzorca

x = koncentracija vzorca

n = presečišče grafa z ordinatno osjo

k = smer premice

Npr.

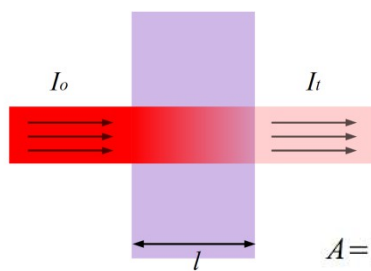
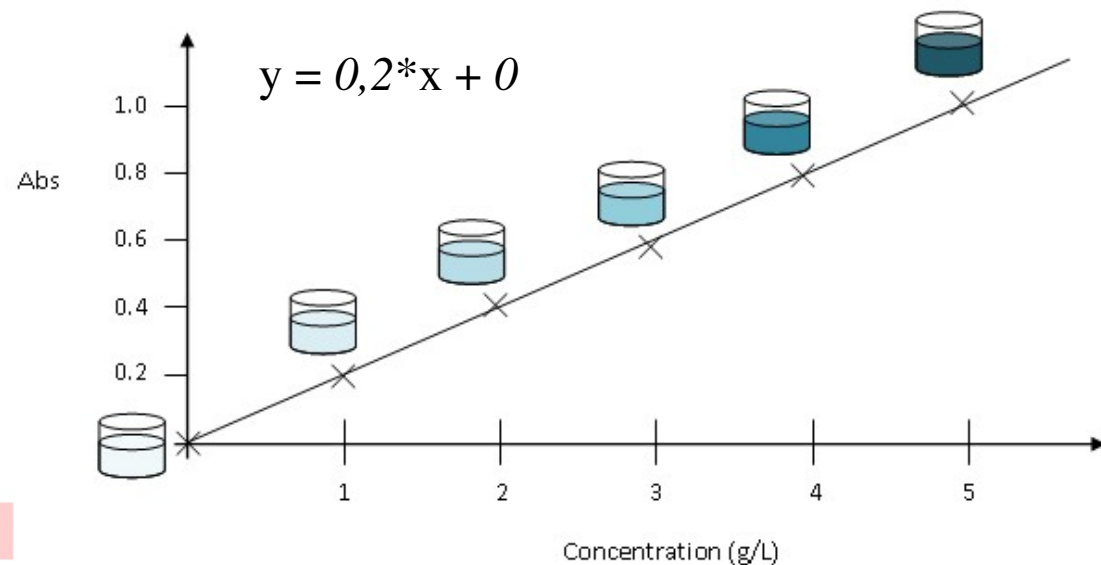
A vzorca = 0,362

$$y = 0,2 \cdot x + 0$$

$$0,362 = 0,2 \cdot x$$

$$x = 0,362 / 0,2$$

$$x = \underline{1,81 \text{ g/L}}$$



$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \log_{10} (\%T^{-1}) = \epsilon l c$$

Lambert-Beerov zakon

3. vaja: Kinetika rasti v šaržnem procesu

- Določanje vsebnosti proteinov
 - Sestavni del biomase:
 - virusi: 50-90%
 - bakterije: 50-70%
 - kvasovke: 35-45%
 - nitaste glive: 25-40%
 - Prisotni tudi v mediju (substrati ali produkti) – potrebno jih je odstraniti!
 - Biuretska metoda – kompleks med peptidno vezjo in Cu-atomi, absorbira pri 550 nm.