

Корнеев Михаил
Корнеев Алексей
Филиппова Надежда

Байжиев Назар

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА "ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСА ЭВМ-ФЕРМЕНТЕР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ БИОСИНТЕЗА" №5.

Цель работы: ознакомление с принципами контроля и управления процессами биосинтеза с использованием ЭВМ, с назначением, устройством и принципами работы, возможностями установки "ЭВМ-биореактор", конструкцией датчиков рН, рО₂, Eh, перемешивающего устройства и т.д., используемых в установке для проведения управляемого процесса культивирования.

Содержание работы.

- 1) Ознакомление с установкой "ЭВМ-биореактор" (система "Биодром-1").
- 2) Проведение процесса глубинного культивирования микроорганизмов с получением кривой роста микроорганизмов и измерением сопутствующих показателей.
- 3) Определение жизнеспособности и активности микроорганизмов по измерению дыхания популяции в ферментере с использованием показателя рО₂ (концентрации растворенного кислорода).

Ход выполнения работы.

После краткого ознакомления с установкой "ЭВМ-биореактор" необходимо приступить к проведению процесса глубинного культивирования микроорганизмов. Для этого получают задание от преподавателя и сведения об изучаемом процессе; вместе с преподавателем задают необходимые условия культивирования, вносят посевной материал и приступают к проведению ферментационного процесса.

В ходе ферментации:

- проводят отбор проб из ферментера (объем отбираемой пробы 8-10 мл, перед отбором предварительно необходимо слить жидкость из мертвого пространства пробовывборного шланга);

- определяют величину оптической плотности суспензии микроорганизмов на ФЭКе, кюветы l=5 мм, длина волны 540 нм), при необходимости при соответствующих разведениях (водопроводной водой) так, чтобы оптическая плотность суспензии была в интервале 0,05-0,35; показания оптической плотности определяют каждые 30-60 мин по трем повторностям (определения нужно выполнять оперативно, поскольку популяция микроорганизмов в отобранной пробе, оставленной в покое в тепле, может еще в течение какого-то времени размножиться; перед приготовлением разведений и определением оптической плотности пробу надо интенсивно встряхнуть, поскольку часть клеток может успеть осесть на дно пробирки или другого сосуда с отобранной пробой);

- контролируют и записывают каждые 15 мин основные показатели ферментации (температуру, концентрацию растворенного кислорода, рН, окислительно-восстановительный потенциал Eh) по показаниям на мониторе ЭВМ, а также расход воздуха - по показаниям ротаметра и расход титрующего агента - по показаниям на бюретке с титрантом;

- осуществляют микробиологический контроль роста популяции под микроскопом (вначале и в конце занятия); для наблюдения под микроскопом необходимо приготовить препарат типа "раздавленная капля" и зарисовать картину в поле зрения микроскопа (с объективом 40^x);

9.12.04.

- осуществляют визуальный контроль за протеканием процесса и работой установки.

Определяемые показания сводят в таблицу:

№ пробы	Время	Оптическая плотность биомассы			Т °С	pO ₂ %	pH	Eh мВ	Примечания	
		Разведение	Показания ФЭКа							Ср. значение + разведение

Определение дыхательной активности культуры микроорганизмов в ферментере.

Проблема снабжения кислородом физиологически активной культуры микроорганизмов, осуществляющих биосинтез в аэробных условиях, является одной из наиболее важных в организации ферментационного процесса. Особенно существенное значение эта проблема играет при биологической очистке сточных вод в аэротенках, поскольку на аэрацию биоценоза в данном случае тратится более половины всех эксплуатационных затрат.

Ввиду больших расходов электроэнергии на аэрацию очень важно подобрать оптимальный режим культивирования и аэрации, правильно выбрать конструкцию перемешивающего устройства и определить реальную потребность микробной популяции в кислороде.

Для определения режимов аэрации можно использовать кинетические зависимости изменения концентрации растворенного кислорода (pO₂) в различных условиях, фиксируя значение pO₂ датчиком растворенного кислорода. В установке "ЭВМ-биореактор" показатели pO₂ непосредственно выводятся на экран монитора ЭВМ (PC) в графическом виде (в режиме "on line"). Данные также могут быть обработаны после проведения ферментационного процесса (в режиме "off line").

Скорость изменения концентрации растворенного кислорода dC/dt (или dpO₂/dt) можно представить следующей зависимостью:

$$dC/dt = V_{\text{поступл.}} - V_{\text{потребл.}}$$

Кислород из воздуха поступает в среду за счет барботажа и перемешивания среды. Скорость его поступления можно представить зависимостью:

$$V_{\text{поступл.}} = K_{VO_2}(C^* - C)$$

где K_{VO_2} - объемный коэффициент массопереноса кислорода;

C^* - равновесная концентрация кислорода при данном парциальном давлении кислорода и данной температуре;

C - концентрация кислорода в среде культивирования.

Скорость потребления кислорода связана с дыхательной активностью популяции и определяется зависимостью:

$$V_{\text{потребл.}} = (V_{O_2/X}) * X$$

где $V_{O_2/X}$ - удельная дыхательная активность микробной популяции ($\text{гO}_2/\text{г АСБ}$);
 X - концентрация биомассы в ферментационной среде

В условиях экспоненциального роста популяции микроорганизмов и неизменности затрат на поддержание жизнедеятельности клеток и соответственно расходных коэффициентов $\alpha_{O_2/S}$ [кг потребленного кислорода на кг потребленного субстрата], $\alpha_{O_2/X}$ [кг потребленного кислорода на кг накопленной биомассы] $V_{\text{потребл.}}$ можно выразить как:

$$V_{\text{потребл.}} = \alpha_{O_2/X} \mu X$$

где μ - удельная скорость роста биомассы микроорганизмов

Датчик концентрации растворенного кислорода фиксирует в среде концентрацию C , отражающую суммарное равновесие в данный момент между поступлением и потреблением. $V_{\text{потребл.}}$ в первом приближении можно найти, отключив на некоторый момент времени барботаж и перемешивание. В этом случае C начнет резко падать (если культура активна), а кривая $C = f(t)$ будет отражать изменение только дыхательной активности с течением времени. На основе этой кривой можно оценить скорости потребления субстрата и накопления биомассы (через $\alpha_{O_2/S}$ и $\alpha_{O_2/X}$ соответственно) в текущий момент времени и построить зависимость изменения скорости потребления кислорода популяцией от концентрации растворенного кислорода $V_{\text{потребл.}} = f(C)$, (аналог кривой Михаэлиса-Ментен для углеродного субстрата).

Используя данный метод, в лабораторной работе можно определить зависимости удельной дыхательной активности микробной популяции от концентрации растворенного кислорода, т.е. $dC/(dt * X) = f(C)$.

Если после отключения аэрации C упало до величин, близких к лимитирующим, (0-10% от C^*), то в первый момент после повторного включения аэрации и перемешивания концентрация C должна резко возрастать. При этом сразу же после включения аэрации скорость потребления кислорода $V_{\text{потребл.}}$ еще незначительна и можно принять, что увеличение C обусловлено только $V_{\text{поступл.}}$, т.е. массообменными характеристиками ферментера. По углу наклона кривой возрастания C в первый момент после включения аэрации можно определить $V_{\text{поступл.}}$ и соответственно K_{VO_2} . Однако непосредственное наблюдение за кривой увеличения концентрации растворенного кислорода с помощью датчика pO_2 дает заниженные результаты определения K_{VO_2} из-за запаздывания отклика датчика на изменения концентрации pO_2 .

Для определения удельной дыхательной активности микробной популяции необходимо знать концентрацию биомассы X . Концентрацию биомассы определяют путем пересчета показателей оптической плотности на сухой вес. В соответствии с коэффициентом пересчета для данных условий определения (кюветы $l=5$ мм, длина волны 540 нм) $1 \text{ед.оптич. пл-ти} = 1,21 \text{ АСБ/л}$.

В отчете о лабораторной работе необходимо представить условия проведения ферментационного процесса и условия определения дыхательной активности, результаты измерений, сведенные в таблицу, графики изменения концентрации биомассы,

температуры, pO_2 , pH, расхода титранта от времени (в случае использования режима автоматического титрования), логарфимическую зависимость изменения концентрации биомассы от времени (с ее помощью найти удельную скорость роста микроорганизмов), кривую зависимости удельной скорости потребления кислорода от концентрации растворенного кислорода $dC/(dt \cdot X) = f(C)$, данные контроля под микроскопом.

Контрольные вопросы

1. Назначения, принципы использования и работы комплексов ЭВМ - биореактор.
2. Устройство установки "ЭВМ-биореактор", ее возможности.
3. Принцип работы и устройство датчиков pH, pO_2 , Eh, T° , систем пеногашения, термостатирования, аэрирования.
4. Методические особенности и возможные ошибки при определении концентрации биомассы на ФЭКе (гурбидиметрическим методом).
5. Принцип организации дистанционного доступа к установке для контроля за ходом ферментационного процесса.

Литература

1. Описание установки и программного обеспечения.
2. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов: в 8 кн./Под ред. Н.С.Егорова и др.
Кн.4. Автоматизация биотехнологических исследований/ Д.В.Зудин и др.-
М.: Высш. шк., 1987.-112с. (Обратить внимание на стр. 30-42, 48-75, 84-92).

Задача

(Конкретные цифры задаются преподавателем).

Допустим, что культура микроорганизмов *S. cerevisiae* растет в оптимальных условиях по экспоненциальному закону в периодическом режиме на углеродном субстрате при температуре $32^\circ C$, давлении $0,2$ ати при содержании кислорода в подаваемом воздухе $21,05\%$.

Пусть за время 30 час биомасса выросла с $0,2$ г/л до $0,5$ г/л.

Лимитирование роста биомассы начинается при концентрации кислорода $5,2\%$ от насыщения при заданных условиях культивирования.

Определить, хватит ли массообменной мощности перемешивающего устройства, обеспечивающего коэффициент массопереноса по кислороду на уровне 320 час $^{-1}$, чтобы на протяжении всего времени роста биомассы лимитирования роста кислородом не наблюдалось.

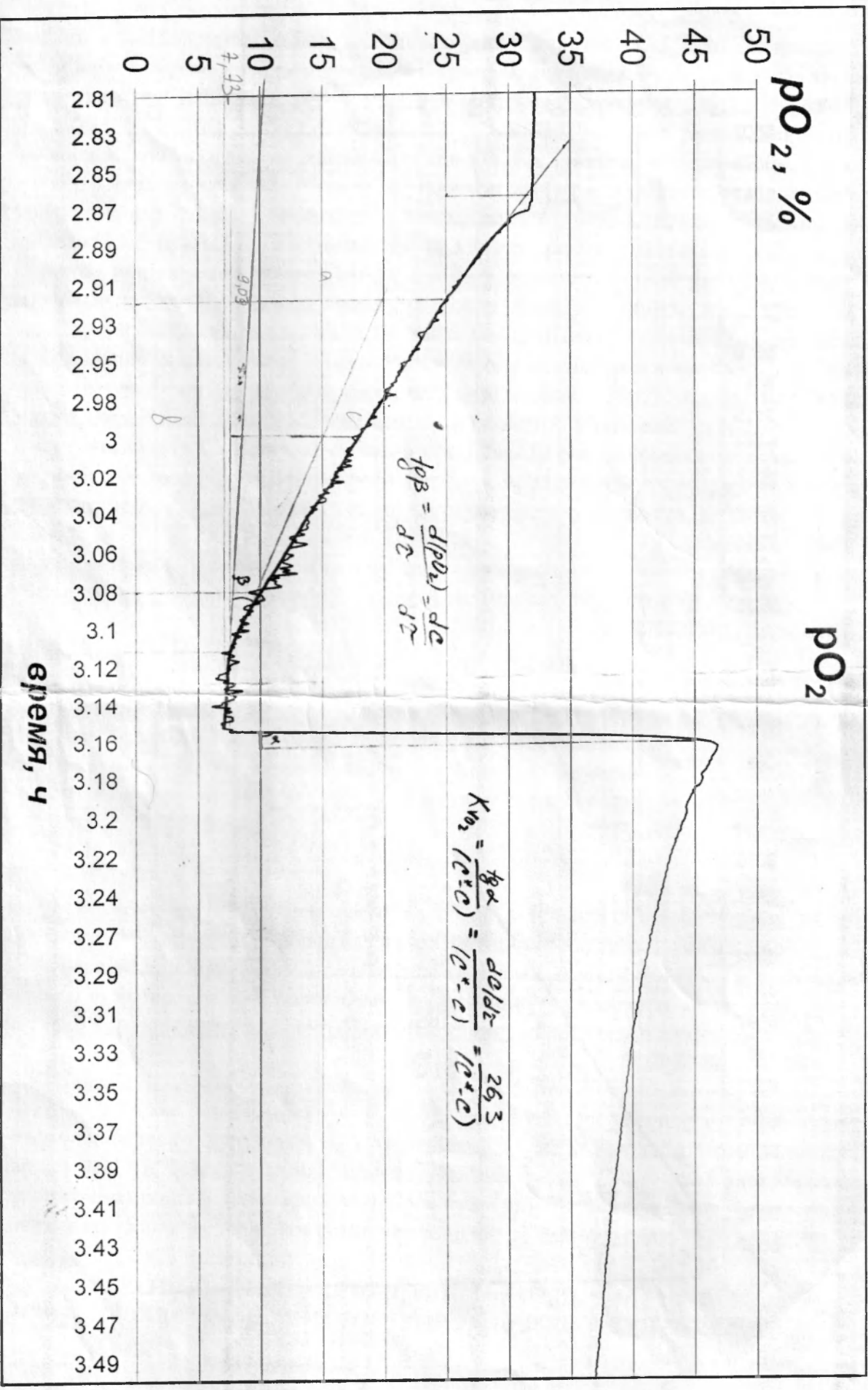
Какую конструкцию перемешивающего устройства можно применить в случае нехватки (избытка) массообменных возможностей ферментера для заданных условий и как это отразится на теплообменных характеристиках ферментера и других параметрах?

$\alpha_{O_2/X}$ ($Y_{O_2/X}$) рассчитать из уравнения биосинтеза при $Y_{X/S} = 0,5$ или по табличным значениям. Равновесную концентрацию растворенного кислорода при насыщении для заданных условий также рассчитать или найти по табличным значениям.

Прочими условиями (высотой столба жидкости в ферментере, изменением концентрации кислорода в газовой фазе по мере продвижения пузырьков воздуха через слой жидкости и др.) в расчетах пренебречь.

равновесная к-ция O_2

при $t = 30^\circ C$



PO₂, %

PO₂

время, ч

Определение содержания углеводов модифицированным методом Бертрана

Реактивы:

- раствор Фелинга I : 10 г кристаллогидрата сульфата меди (II) и 0,04 г метиленовой сини растворяют в дист.воде, доводят до 1 л в мерной колбе; $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$
- раствор Фелинга II : 50 г сегнетовой соли, 4 г желтой кровяной соли и 75 г гидроксида натрия растворяют последовательно в дист.воде в фарфоровой чашке, после охлаждения доводят до 1 л.

Ход анализа

В термоустойчивую коническую колбу наливают 5 мл раствора Фелинга I и 5 мл раствора Фелинга II, ставят на нагретую электроплитку и, закрыв колбу часовым стеклышком, доводят содержимое до кипения. Кипящий раствор титруют пробой до перехода фиолетовой окраски в бледно-желтую. Момент, когда окраска пробы станет желтой или желто-зеленой, является концом титрования. Фиксируют объем пробы, пошедший на титрование. Если пробы не хватило, то дотитровку проводят стандартным раствором глюкозы (1 мг/мл).

Расчет проводят по формуле :

$$\% \text{РВ} = [(T_{\text{глюкозы}} - V_{\text{глюкозы}} \times C_{\text{глюкозы}}) : 10V_{\text{пробы}}] \times \Pi,$$

где $T_{\text{глюкозы}}$ - титр растворов Фелинга по глюкозе, мг;

$V_{\text{глюкозы}}$ - объем глюкозы, пошедший на дотитровку, мл;

$C_{\text{глюкозы}}$ - концентрация глюкозы, мг/мл;

$V_{\text{пробы}}$ - объем анализируемой пробы, пошедший на титрование, мл.

Необходимо провести не менее 3-х параллельных определений. Количество анализируемого раствора, пошедшего на титрование, не должно отличаться более чем на 0,1-0,2 мл.

Титр меднощелочного раствора устанавливают отдельным титрованием по любому интересующему редуцирующему веществу. Титр меднощелочного раствора - это количество глюкозы (мг), идущее на восстановление 10 мл меднощелочного раствора при данных условиях титрования.

Определение содержания редуцирующих олигосахаридов и полисахаридов (метод Бертрана-Шорля)

В случае если анализируемый раствор содержит олиго- и полисахариды, то их определение осуществляют **методом Бертрана-Шорля**. Метод аналогичен методу Бертрана, но проба предварительно гидролизуется на кипящей водяной бане при определении олигосахаридов - 10 мин, а при определении полисахаридов - 40 мин. Для гидролиза проба смешивается с 2 Н НСL в соотношении 1:1. Затем проводят определение сахаров методом Бертрана. Калибровочная кривая строится по сахарозе, которая также подвергается предварительному гидролизу.