

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

PRAKTIKUM iz OSNOV BIOTEHNOLOGIJ

**drugi učbenik za študente univerzitetnega študija Živilstvo
in prehrana pri vajah predmeta Osnove biotehnologij**

Maja PAŠ in Peter RASPOR

Ljubljana, 2010

Naslov: **PRAKTIKUM iz OSNOV BIOTEHNOLOGIJ**

Avtorja: Maja PAŠ in Peter RASPOR

Založnik: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzenta: doc. dr. Aleš Podgornik
asist. dr. Štefan Fujs

Lektoriranje: Jezikovno svetovanje in lektoriranje, Marko Janša, s.p.

Leto izdaje: 2010

CIP-kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

602.4(075.8)(076.5)

PAŠ, Maja

Praktikum iz osnov biotehnologij [Elektronski vir] : drugi učbenik za študente univerzitetnega študija Živilstvo in prehrana pri vajah predmeta Osnove biotehnologij / Maja Paš in Peter Raspor. – El. knjiga. - Ljubljana : Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2010

Način dostopa (URL): <http://www.bf.uni-lj.si/knjiznice/knjiznica-odd-za-zivilstvo/ucbeniki-v-elektronski-obliki.html>

ISBN 978-961-6333-89-4

1. Raspor, Peter

COBISS.SI-ID 251748608

Po sklepu dekana Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani dne 16. 11. 2009 je delo PRAKTIKUM iz OSNOV BIOTEHNOLOGIJ drugi učbenik za študente univerzitetnega študija Živilstvo in prehrana pri vajah predmeta Osnove biotehnologij.

Vse pravice pridržane. Ponatis (grafični, elektronski ali mehanski, vključno s fotokopiranjem, snemanjem ali prenosom v baze podatkov) celote ali posameznih delov je dovoljen le s pisnim soglasjem nosilca avtorskih pravic.

PREDGOVOR

V proizvodnji živil in zdravil predstavljajo biotehnologije danes glavnino tehnoloških posegov. Čeprav se naivno zdi, da nekateri procesi ne sodijo na področje biotehnologije, saj jih človek pozna že tisočletja, si moramo priznati, da jih moramo obvladovati prav v tem okviru. Med tradicionalnimi in sodobnimi biotehnološkimi postopki, bioproceno gledano, ni velikih razlik. To je včasih razumljeno drugače, kar vnaša na to področje nemir. Treba je poudariti, da obvladovanje biotehnoloških procesov narekuje uporabo izredno zahtevne in kompleksne strojne opreme ter usklajen tim sodelavcev, ki obvladujejo bioprocen.

Resda je v proizvodnji živil še vedno glavnina anaerobnih bioprocen, kljub temu pa so aerobni bioproceni nepogrešljivi, zlasti v proizvodnji starterskih kultur, kamor sodi tisoče ton pekovskega kvasa, če ilustriramo samo z enim proizvodom in se ne spuščamo v naštevanje številnih aditivov ter procesnih dodatkov, brez katerih bi danes živilska industrija ostajala pri proizvodnji tradicionalnih proizvodov.

Praktikum Osnove biotehnologij tako ponuja samo izbor osnovnih bioprocen, ki so nujni za učinkovito obvladovanje biotehnološke proizvodnje. Študent/študentka se seznani z bioprocenom z enkratnim polnjenjem (zaprt) ter bioprocenom z neprestanim polnjenjem in praznjenjem (odprt), bioprocenom v tekočem in na trdnem gojišču. Bioproceni so opisani tako praktično kot tudi matematično in omogočajo študentu/študentki pregled nad osnovnimi orodji, ki so pomembna za njihovo izvedbo.

Praktikum je zastavljen tako, da teoretični razlagi sledi pojasnitev poskusa, ki bo dokazal uporabnost takega bioprocena. Na tak način se seznanimo z vsemi potrebnimi elementi aparatur in z njihovo praktično uporabnostjo v biotehnoloških aplikacijah. Podani so tudi izbrani izračuni in naloge, ki pomagajo, da študent/študentka vzpostavi kritičen stik z znanjem in spretnostmi, ki so potrebne za obvladovanje bioprocen.

Avtorja

V Ljubljani, julij 2010

VSEBINA

1	PROIZVODNJA KVASNE BIOMASE	7
1.1	Teoretične osnove	7
1.2	Naloga	11
1.3	Potreben material	11
1.3.1	Kultura	11
1.3.2	Gojišča	11
1.3.3	Aparature in oprema	12
1.3.3.1	<u>Bioreaktorski sistem</u>	12
1.3.3.2	<u>Druga oprema</u>	12
1.3.4	Kemikalije (reagenti)	12
1.4	Potek vaje	12
1.4.1	Priprava inokuluma	13
1.4.2	Priprava bioreaktorskega sistema in zagon bioprocesa (inokulacija)	13
1.4.3	Nadzor (spremljanje) bioprocesa	14
1.4.4	Analize vzorcev	14
1.4.4.1	<u>Merjenje vrednosti pH</u>	14
1.4.4.2	<u>Določanje koncentracije kvasnih celic</u>	14
1.4.4.3	<u>Določanje skupnih reducirajočih sladkorjev</u>	14
1.4.4.4	<u>Določanje koncentracije etanola</u>	14
1.5	Meritve, izračuni in rezultati	15
1.5.1	Meritve	15
1.5.2	Izračuni	15
1.5.3	Predstavitev rezultatov	15
2	PROIZVODNJA AMILAZ S PLESNIJO <i>Aspergillus oryzae</i>	15
2.1	TEORETIČNE OSNOVE	16
2.2	Naloga	19
2.3	Potreben material	19
2.3.1	Kultura	19
2.3.2	Gojišča	19
2.3.3	Aparature in oprema	19
2.3.3.1	<u>Bioreaktorski sistem</u>	19
2.3.3.2	<u>Druga oprema</u>	20
2.3.4	Kemikalije (reagenti)	20
2.4	Potek vaje	20

2.4.1	Priprava inokuluma	20
2.4.2	Priprava bioreaktorskega sistema in zagon bioprocesa (inokulacija)	21
2.4.3	Nadzor (spremljanje) bioprocesa	21
2.4.4	Analize vzorcev	21
2.4.4.1	Merjenje vrednosti pH	21
2.4.4.2	Spektrofotometrično določanje amilolitične aktivnosti (modificirana metoda po Fuwi)	21
2.5	Meritve, izračuni in rezultati	23
2.5.1	Meritve	23
2.5.2	Izračuni	23
2.5.3	Predstavitev rezultatov	23
3	PRENOS KISIKA – DOLOČITEV k_La	24
3.1	Teoretične osnove	24
3.1.1	Prenos snovi v sistemu plin-tekočina	24
3.1.2	Poraba kisika v aerobnih bioprocseh	27
3.1.3	Stacionarno stanje	29
3.1.4	Eksperimentalno določanje k_La	30
3.2	Naloga	33
3.3	Potreben material	33
3.3.1	Kultura	33
3.3.2	Gojišče	33
3.3.3	Aparature in oprema	33
3.3.3.1	Bioreaktorski sistem	33
3.3.3.2	Druga oprema	34
3.4	Potek vaje	34
3.4.1	Razplinjevalna metoda	34
3.4.2	Dinamična metoda z mikroorganizmi	35
3.5	Meritve, izračuni in rezultati	35
3.5.1	Meritve	35
3.5.2	Izračuni	35
3.5.3	Predstavitev rezultatov	35
4	SIMULACIJA BIOPROCESA Z NEPRESTANIM POLNJENJEM IN PRAZNJENJEM (ODPRT BIOPROCES)	36
4.1	Teoretične osnove	36
4.2	Naloga	43

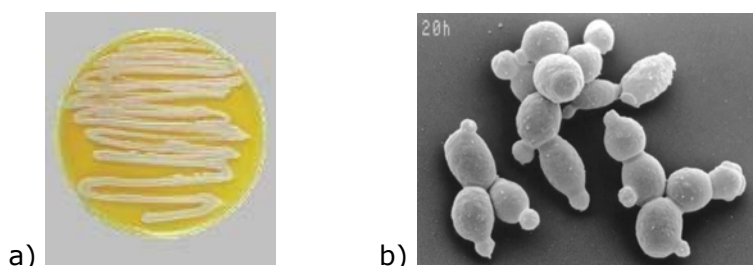
4.3	Potreben material.....	43
4.3.1	Aparature in oprema	43
4.4	Potek vaje.....	43
4.4.1	Kemostat brez reciklacije	43
4.4.2	Kemostat z reciklacijo	44
4.5	Meritve, izračuni in rezultati.....	44
4.5.1	Predstavitev rezultatov	44
4.5.2	Komentar	44
5	RAČUNSKÉ NALOGE	45
	Priloga 1: SEZNAM SIMBOLOV	46
	Priloga 2: GOJIŠČA	49
	Priloga 3: RAZNO	50
	Priloga 4: POROČILO O OPRAVLJENI VAJI	51
	LITERATURA	53

1 PROIZVODNJA KVASNE BIOMASE

1.1 Teoretične osnove

Mikrobna biomasa oziroma biomasa mikrobiološkega izvora je organski biološki material enoceličnih mikroorganizmov (bakterije, kvasovke, plesni, alge). To so tiste mikrobne celice, ki so se sposobne deliti in rasti v določenih razmerah v svojem okolju. Z rastjo in razmnoževanjem se spreminja njihova aktivnost in povečuje celotna celična masa mikrobne kulture. Mikrobno biomaso na osnovi njene aktivnosti lahko razdelimo na aktivno in neaktivno. V aktivno mikrobno biomaso sodijo različne starterske kulture (tudi pekovski kvas), nitrifikacijske bakterije, bioinsekticidi. Zanje je značilno, da je encimsko (popolnoma ali omejeno) in reprodukcijsko (popolnoma ali omejeno) aktivna. Neaktivna biomasa se nanaša na celični material različnih mikroorganizmov, ki jih gojimo predvsem zaradi visoke vsebnosti proteinov za krmo ali hrano.

Kvas so za pripravo kruha pred 5000 leti uporabljali že stari Egipčani. Danes se kvasovke uporabljajo v tradicionalnih vejah živilske industrije (pekarstvo, proizvodnja alkoholnih pijač), za proizvodnjo etanola kot energetskega vira (bioetanol), vse bolj pa se uveljavljajo tudi kot gostiteljski organizmi za vnos tujega genetskega materiala z namenom pridobivanja različnih celičnih sestavin in produktov (encimi, barvila, protitelesa, proteini itd.).



Slika 1. Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* a) razmaz na površini agarja (Connecticut Valley Biological Supply Company, 2009) in b) mikrografija (Paš, 2000)

Proizvodnja pekovskega kvasa s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* sodi med najstarejše vodene bioprocese.

V principu bioprocen definiramo kot sterilizacijo in polnjenje bioreaktorskega sistema, inokulacijo, vodenje bioprocasa, ki mu sledi praznjenje, čiščenje ter priprava za naslednjo polnitev.

Bioprocen se praktično začne z inokulacijo. Inokulum/vcepek aseptično dodamo v gojišče, čemur sledi rast in razmnoževanje kulture. Inokulum predstavlja homogeno kulturo izbranih mikroorganizmov v odgovarjajoči količini, da zagotovi hitro namnoževanje in prevlado v bioreaktorju. Proizvodnja pekovskega kvasa je zgodovinsko potekala kot bioprocen z enkratnim polnjenjem (šaržni, zaprt, batch). Bioprocen z enkratnim polnjenjem je definiran kot proces, v katerem inokulum vnesemo v sterilizirano gojišče in med potekom ne dodajamo substratov za rast, pri čemer kisik ni obravnavan kot substrat. Po letu 1916 pa so uvedli dohranjevanje s substratom (polzaprti, »zu-lauf«, »fed-batch«), kar je pomenilo začetek nove tehnologije kultivacije z večjimi izkoristki, produktivnostjo in boljšo kakovostjo končnega proizvoda. Z uporabo bioprocasa z

dohranjevanjem se namreč izognemo negativnemu učinku visoke vsebnosti sladkorja v gojišču in posledično nastanku etanola (Crabtree efekt), ki pri proizvodnji biomase močno zmanjša izkoristek.

Pekovski kvas proizvajamo v tekočem gojišču, to je tako imenovana submerzna kultura, ki je najlažje vodljiv način izvedbe bioprocesa. V submerznem bioreaktorju so razmere najbližje homogenim. S stališča vodenja bioprocesa je pomembno, da znamo ključne bioprocene spremenljivke meriti, saj na osnovi tega lahko nadziramo bioproces na način, ki omogoča doseganje maksimalne produktivnosti. Temu cilju so podrejeni tako sestava gojišča kot bioproceni parametri.

Zahtevam za optimalno vodenje bioprocesa najlažje zadostimo, če izvajamo gojenje v bioreaktorju. Bioreaktorska posoda je navadno opremljena z mešalom, s sistemom za regulacijo temperature in vnosa zraka ter s senzorji, ki omogočajo sprotne meritve ključnih biotehnoloških spremenljivk, kot so pH, pO_2 , temperatura in optična gostota. Vse skupaj imenujemo bioreaktorski sistem. Preostale bioprocene parametre navadno merimo »off-line«, kar pomeni, da odvezamemo reprezentativni vzorec bioprocene brozge (tj. suspenzija celic, njihovih metabolnih produktov in preostanek hranilnih snovi v vodi) in ga analiziramo z različnimi metodami.

Zaradi hitrejše rasti, ki se odrazi v visoki koncentraciji biomase in posledično mnogo večji produktivnosti, kot jo dosežemo v anaerobnem bioprocusu (pri katerem se tvori etanol), je proizvodnja kvasne biomase aeroben bioproces, v katerem se sladkor (glukoza) pretvori do naslednjih končnih produktov po tej poenostavljeni reakciji:



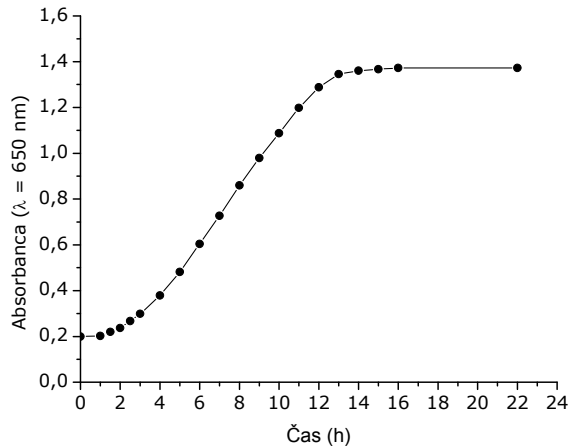
Da bi zagotovili zadostno raztapljanje kisika v mediju, v katerem gojimo kvasovke, in tako zadostili potrebam delovne biokulture po kisiku, je potrebno prepričevanje z zrakom, hkrati pa tudi mešanje. Načini zagotavljanja zadostne količine kisika biokulturi in težave, ki pri tem nastopajo, kakor tudi druge zakonitosti raztapljanja kisika v bioprocenih brozgah, so opisani v vaji Prenos kisika – določitev $k_L a$.

Hitrost rasti mikroorganizmov lahko opišemo s kinetično enačbo 1. reda:

$$r_X = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (1)$$

pri čemer je r_X oziroma $\frac{dX}{dt}$ hitrost rasti ($kg \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$), X koncentracija biomase ($kg \cdot m^{-3}$), μ pa specifična hitrost rasti glede na biomaso (h^{-1}). *Specifična hitrost rasti* je lastnost mikroorganizma, vezana na njegovo dedno zasnovo in odvisna od razmer v okolju, v katerem mikroorganizem raste. Maksimalno specifično hitrost rasti lahko doseže le v optimalnih razmerah med gojenjem.

Ker so v bioprocusu z enkratnim polnjenjem nestacionarne razmere za rast, kar pomeni, da se okolje med bioprocusom spreminja, dobimo značilno rastno krivuljo mikroorganizmov, sestavljeno iz več faz rasti (na sliki 2 ni prikazana faza odmiranja).



Slika 2. Primer rastle krivulje kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* kultivirane v tekočem kemijsko definiranem gojišču v bioprocesu z enkratnim polnjenjem (prirejeno po Paš s sod., 2007)

Specifična hitrost rasti (μ) se spreminja glede na fazo rasti:

- **Faza prilagajanja (lag faza):** takoj po inokulaciji se giblje vrednost μ okoli nič. Celice se v tej fazi prilagajajo novemu okolju s sintetiziranjem encimov ali sestavnih delov celic, medtem ko ostaja njihovo število konstantno. Dolžina te faze je odvisna od fiziološkega stanja celic v vcepku (inokulumu) in sprememb glede na predhodno gojenje (sestava gojišča, temperatura itd.).
- **Faza pospešene rasti:** koncentracija biomase začne naraščati, celice se začnejo intenzivno razmnoževati ($\mu < \mu_{\max}$).
- **Eksponentna faza rasti:** mikroorganizmi se razmnožujejo s konstantno maksimalno specifično hitrostjo rasti ($\mu = \mu_{\max}$) in koncentracija biomase (celic) s časom eksponentno narašča. Celice vzdržujejo konstantno sestavo s prilagajanjem metabolizma okolju, rast je uravnotežena (»balanced growth«). Po integriranju pri začetnem pogoju $t = 0$, $X = X_0$, dobimo v takem primeru iz enačbe (1) naslednji izraz:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\max} \cdot t \quad (2)$$

oziroma

$$X = X_0 \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t} \quad (3)$$

Čas, ki je potreben za podvojitev koncentracije celic med eksponentno fazo rasti, imenujemo čas podvojevanja ali tudi delitveni oziroma generacijski čas (t_d). Če v izraz (2) vnesemo $X = 2 \cdot X_0$, lahko generacijski čas izračunamo kot:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (4)$$

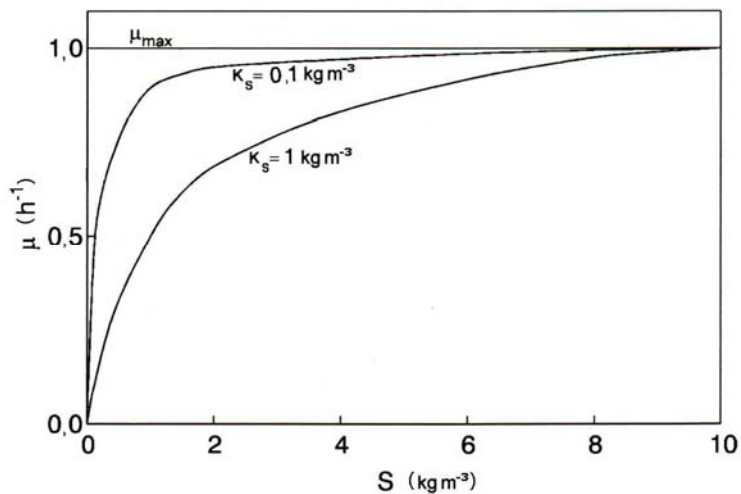
Parametra $\mu_{\max}$ in t_d sta pomembna za opisovanje eksponentne rasti mikroorganizmov. $\mu_{\max}$ je v optimalnih razmerah med kultivacijo za vsak organizem specifična lastnost in je gensko opredeljena.

- **Faza pojemajoče rasti:** zaradi izrabe hranil in/ali nakopičenja metabolitov, ki zavirajo rast, se rast upočasni ($\mu < \mu_{\max}$). Monod je leta 1942 postavil model, ki je temeljil na

empiričnih opažanjih, da se specifična hitrost rasti biomase (μ) pri majhnih koncentracijah limitnega substrata (S) zmanjša. To zakonitost je matematično opisal z izrazom:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \quad (5)$$

katerega graf je prikazan na sliki 3.



Slika 3. Grafični prikaz Monodovega modela rasti mikroorganizmov (prirejeno po Žnidaršič in Pavko, 2002)

K_S ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$) v enačbi (5) je konstanta nasičenja za celoten proces rasti, empirično določena vrednost, ki pomeni tisto koncentracijo limitnega substrata, pri kateri je specifična hitrost rasti enaka polovici maksimalne specifične hitrosti rasti ($\mu_{\max}$). K_S za *S. cerevisiae* in glukozo kot limitni substrat je $0,025 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

- *Stacionarna faza rasti*: koncentracija biomase je konstantna, saj se mikroorganizmi zaradi pomanjkanja hranilnih snovi (predvsem vira energije), lahko tudi kisika ali nakopičenja zaviralnih metabolitov, ne morejo več razmnoževati. Mikrobne celice ostanejo žive zaradi ohranitvenega metabolizma na račun rezervnih snovi, rast in razmnoževanje pa se ustavi, torej je $\mu = 0$.
- *Faza odmiranja*: vedno več celic odmre ali razpade (liza celic), kar zaznamo kot padanje koncentracije celic in zapišemo kot:

$$\frac{dX}{dt} = -\beta \cdot X \quad (6)$$

pri čemer je β specifična hitrost odmiranja (h^{-1}), značilna za vsako vrsto v danem ekološkem sistemu.

Pri ovrednotenju hitrosti porabe substrata (r_S) moramo upoštevati porabo substrata za rast in razmnoževanje mikroorganizmov in porabo substrata za vzdrževanje procesov v celicah. Tako dobimo naslednji izraz:

$$r_S = -\frac{r_X}{Y_{XS}} - m_S \cdot X \quad (7)$$

pri čemer je Y_{XS} izkoristek, ki pomeni razmerje med proizvedeno biomaso in porabljenim substratom v istem času ($-Y_{XS} = \frac{dX}{dS}$), m_S pa koeficient vzdrževanja ($\text{kg}_{\text{substrata}} \cdot \text{kg}_{\text{biomase}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

V eksponentni fazi rasti lahko predpostavimo, da je Y_{XS} konstanten, v realnih bioprocesih pa je močno odvisen od obratovalnih razmer in se med bioprocesom spreminja.

Produktivnost bioprocesa (P) je definirana kot masa nastalega produkta (na primer biomase – P_X) v volumnu bioprocesne brozge skozi celoten bioproces ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$):

$$P_X = \frac{\Delta X}{t} \quad (8)$$

pri čemer je t čas trajanja bioprocesa.

Če v enačbi (8) upoštevamo še čas, ki je potreben za pripravo (sterilizacija, umerjanje senzorjev ipd.) – t_1 in za pobiranje pridelka – t_2 , lahko izračunamo tako imenovano produktivnost sistema ($P_{X\text{sistema}}$):

$$P_{X\text{sistema}} = \frac{\Delta X}{t_1 + t + t_2} \quad (9)$$

1.2 Naloga

Prireditve laboratorijskega bioreaktorskega sistema za aerobni tip kultivacije. Priprava sestavljenega gojišča in inokuluma čiste kulture *Saccharomyces cerevisiae*. Inokulacija gojišča in proizvodnja kvasne biomase. Spremljanje bioprocesa z merjenjem optične gostote bioprocesne brozge, vrednosti pH, določanjem preostalega izvora ogljika v brozgi, ovrednotenjem vsebnosti nastalega etanola po končanem bioprocesu.

1.3 Potreben material

1.3.1 Kultura

Čista kultura kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*.

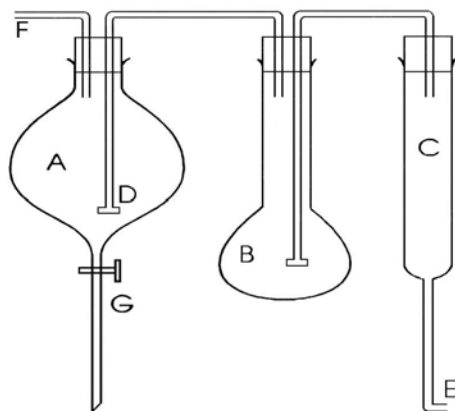
1.3.2 Gojišča

Kompleksno sintetično gojišče za izvedbo bioprocsov proizvodnje kvasne biomase vsebuje različne količine saharoze – vira C (sestava gojišč je podana v prilogi 2.1). Sterilizacija gojišč je potekala 20 min v avtoklavu pri 121 °C in tlaku 1,2 bar.

1.3.3 Aparature in oprema

1.3.3.1 Bioreaktorski sistem

Laboratorijski bioreaktorski sistem prikazuje slika 4. Posamezni sestavni deli so bili sterilizirani v avtoklavu (121 °C, 20 min).



Slika 4. Laboratorijski bioreaktorski sistem: A – bioreaktorska posoda, B – vlažilnik zraka, C – filter za sterilizacijo zraka, D – razpršilnik zraka (frita), E – vhod zraka, F – izhod zraka, G – odvzem vzorca (prirejeno po Raspor in Smole-Možina, 1993)

1.3.3.2 Druga oprema:

- centrifuga
- termoblok
- refraktometer
- HPLC
- spektrofotometer
- pH-meter
- mikroskop
- Bürker-Türkova števna ploščica
- rotameter
- laboratorijska steklovina

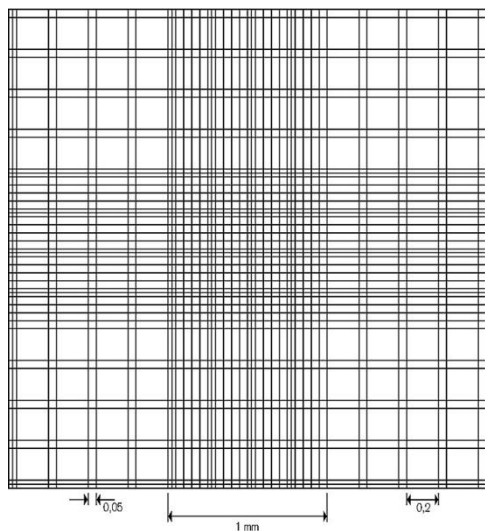
1.3.4 Kemikalije (reagenti):

- fiziološka raztopina (0,9 M vodna raztopina NaCl)
- silikonski protipenilec
- DNS-reagent

1.4 Potek vaje

1.4.1 Priprava inokuluma

Inokulum predstavlja suspenzija kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v fiziološki raztopini. Z neposrednim štetjem pod mikroskopom s pomočjo Bürker-Türkoviš števnih ploščic (slika 5) določimo koncentracijo kvasnih celic v suspenziji (inokulumu). Pred nanosom na števno ploščico inokulum razredčimo, tako da je v števnem polju približno 20 celic. Za redčenje uporabimo metodo po Kochu, pri kateri prenesemo 1 ml homogene izvirne kulture v 9 ml destilirane vode, homogeniziramo in postopek ponavljamo do primerne gostote celic v suspenziji.



Slika 5. Bürker-Türkova števna ploščica (Brand on line catalogue, 2008)

Na Bürker-Türkovi števnih ploščici je vgravirana mreža, sestavljena iz 9 velikih kvadratov – površina vsakega od njih je 1 mm^2 . Veliki kvadrati so razdeljeni na 16 manjših, katerih stranice so dolge 0,2 mm. V sredini števne ploščice je vsak takšen kvadrat (s stranico 0,2 mm) razdeljen še na 16 manjših kvadratov – stranice teh najmanjših kvadratov merijo 0,05 mm (njihova površina je $0,0025 \text{ mm}^2$). Višina prostora med števno ploščico (objektnim stekelcem) in krovnim stekelcem je 0,1 mm.

Iz koncentracije kvasovk v inokulumu izračunamo potreben volumen inokuluma, da bo začetna koncentracija celic v gojišču takoj po inokulaciji $1 \cdot 10^6 \text{ celic} \cdot \text{ml}^{-1}$.

1.4.2 Priprava bioreaktorskega sistema in zagon bioprocesa (inokulacija)

Sestavimo posamezne sestavne dele laboratorijskega statičnega kolonskega bioreaktorskega sistema, kot prikazuje slika 4. V bioreaktorsko posodo (A) aseptično prenesemo 1000 ml sterilnega gojišča, mu dodamo kapljico silikonskega protipenilca in ga inokuliramo z izračunanim volumnom inokuluma (točka 1.4.1).

Sestavljen in napolnjen bioreaktorski sistem prenesemo v komoro, v kateri bo potekal bioproces. Temperaturo termostata uravnamo na 28°C . Z rotametrom uravnamo pretok zraka za aeracijo na $1 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$, kar ustreza 1 vvm (vvm = volumen zraka na volumen gojišča na minuto), ter ga povežemo z bioreaktorskim sistemom.

1.4.3 Nadzor (spremljanje) bioprocesa

Dogajanje v bioreaktorju med bioprocenom spremljamo »off-line«, tako da v določenih časovnih odsekih jemljemo vzorce bioprocene brozge in jih zamrznemo do analiz ($T = -18\text{ °C}$).

1.4.4 Analize vzorcev

Vzorce odmrznemo in jih premešamo.

1.4.4.1 Merjenje vrednosti pH

S predhodno umerjenim pH-metrom izmerimo vrednost pH v vzorcih tako, da elektrodo potopimo v vzorec in odčitamo vrednost pH.

1.4.4.2 Določanje koncentracije kvasnih celic

Pripravimo umeritveno krivuljo $\log N$ v odvisnosti od T_{650} (%). Iz suspenzije kvasovk v fiziološki raztopini (inokulum) pripravimo takšne redčitve, da je propustnost svetlobe (transmitanca) pri valovni dolžini 650 nm v merilnem območju spektrofotometra ($T_{650} = 10\text{--}90\%$). V istih vzorcih s štetjem pod mikroskopom določimo koncentracijo celic N (celic·ml⁻¹).

Za določitev koncentracije kvasnih celic v vzorcih bioprocene brozge te najprej razredčimo po Kochu, tako da je izmerjena T_{650} v merilnem območju instrumenta, nato pa s pomočjo enačbe umeritvene krivulje določimo koncentracijo celic v vzorcih.

1.4.4.3 Določanje skupnih reducirajočih sladkorjev

Glukozo kot vir ogljika in energije v vzorcih bioprocene brozge spremljamo z metodo za določevanje reducirajočih sladkorjev, ki temelji na barvni reakciji med reducirajočo skupino pri sladkorjih in dinitrosalicilno kislino v alkalnem mediju. Takšni sladkorji v alkalni raztopini reducirajo rumeno 3,5-dinitrosalicilno kislino (DNS) v oranžno 3-amino-5-nitrosalicilno kislino. Kemizem reakcije je zapleten, zato standardna krivulja ne gre vedno skozi izhodišče. Prav tako različni sladkorji dajejo različno intenzivne barvne odtenke, zato metoda ni primerna za določanje kompleksnih mešanic reducirajočih sladkorjev. (Plummer, 1987)

2 ml vzorca 5 min centrifugiramo pri 4000 min⁻¹. Supernatant ustrezno razredčimo, tako da je vsebnost glukoze pod 0,3 g·l⁻¹ (1:100 oziroma 1:1000). K 3 ml razredčenega vzorca dodamo 1 ml DNS-reagenta in 5 minut inkubiramo pri 100 °C. Ohladimo v ledeni kopeli na sobno temperaturo in izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 540 nm proti slepemu vzorcu. Vzoredno z vzorcem pripravimo slepi vzorec, pri čemer namesto vzorca uporabimo 3 ml destilirane vode.

Za umeritveno krivuljo pripravimo raztopine glukoze različnih koncentracij (0–0,3 g·l⁻¹), izvedemo reakcijo po zgoraj opisanem postopku in izmerimo absorbanco pri 540 nm proti slepemu vzorcu.

Iz umeritvene krivulje in ob upoštevanju redčenja izračunamo vsebnost glukoze v vzorcih.

1.4.4.4 Določanje koncentracije etanola

Koncentracijo etanola v brozgi po končanem bioprocesu določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). 2 ml bioprocesne brozge centrifugiramo v Eppendorferjevih centrifugirkah 5 min pri 12000 min^{-1} . Nato supernatant še prefiltriramo skozi filter z velikostjo por $0,2 \mu\text{m}$, da odstranimo manjše delce, ki bi lahko vplivali na analizo. Po primerjavi kromatogramov standardnih raztopin etanola in kromatogramov vzorcev izračunamo koncentracijo etanola v bioprocesni brozgi.

1.5 Meritve, izračuni in rezultati

1.5.1 Meritve

Tabelarični prikazi:

- umeritvena krivulja (T_{650} , $\log N$)
- umeritvena krivulja (C_{glukoze} , A_{540})
- v vzorcih izmerjene vrednosti pH , T_{650} , A_{540}

1.5.2 Izračuni:

- koncentracija kvasnih celic v inokulumu ($\text{celic} \cdot \text{ml}^{-1}$)
- volumen inokuluma (ml)
- koncentracija etanola v brozgi ob koncu bioprocesa (iz kromatograma)
- primer izračuna N iz umeritvene krivulje odvisnosti $\log N$ od T_{650}
- primer izračuna koncentracije reducirajočih sladkorjev iz umeritvene krivulje A_{540} v odvisnosti od C_{glukoze}
- maksimalna specifična hitrost rasti (μ_{max}) in generacijski čas (t_d) iz rastne krivulje
- izkoristki: Y_{XS} (praktičen), Y_{EtOHS} (teoretičen, praktičen, dejanski)
- produktivnosti bioprocesa: P_X , P_{EtOH}

1.5.3 Predstavitev rezultatov

Tabelarični prikazi:

- izračunane vrednosti $\log N$, N , $\ln N$ in koncentracija reducirajočih sladkorjev v vzorcih

Grafični prikazi:

- umeritvena krivulja odvisnosti $\log N$ od T_{650}
- umeritvena krivulja odvisnosti A_{540} od C_{glukoze}
- vrednost pH , $\ln N$, koncentracija reducirajočih sladkorjev v odvisnosti od časa trajanja bioprocesa
- odvisnost vsebnosti etanola v bioprocesnih brozgah od začetne koncentracije glukoze v gojiščih (rezultati vseh bioprocesov z različnimi gojišči)

2 PROIZVODNJA AMILAZ S PLESNIJO *Aspergillus oryzae*

2.1 TEORETIČNE OSNOVE

Polisaharid škrob je mogoče najti v številnih rastlinah (denimo v koruzi, krompirju, rižu, pšenici, ržu, kasavi) v obliki mikroskopsko majhnih škrobnih zrn in pomeni zalogo energije, ki omogoča rast semena v novo rastlino. Škrobna molekula je homopolimer, zgrajen le iz D-glukoznih enot, ki so med seboj povezane z α -1,4- in α -1,6-glikozidnimi vezmi. Nerazvejen enoverižni polimer, sestavljen iz 500 do 2000 glukoznih podenot, povezanih z α -1,4-glikozidnimi vezmi, je amiloza. Prisotnost α -1,6-glikozidnih vezi vodi do nastanka razvejenega polimera glukoze, amilopektina (približno 1 razvejenje na 25 glukoznih enot). Razmerje med amilozo in amilopektinom je odvisno od vrste rastline, večina škrobov pa vsebuje 15 do 30 % amiloze.

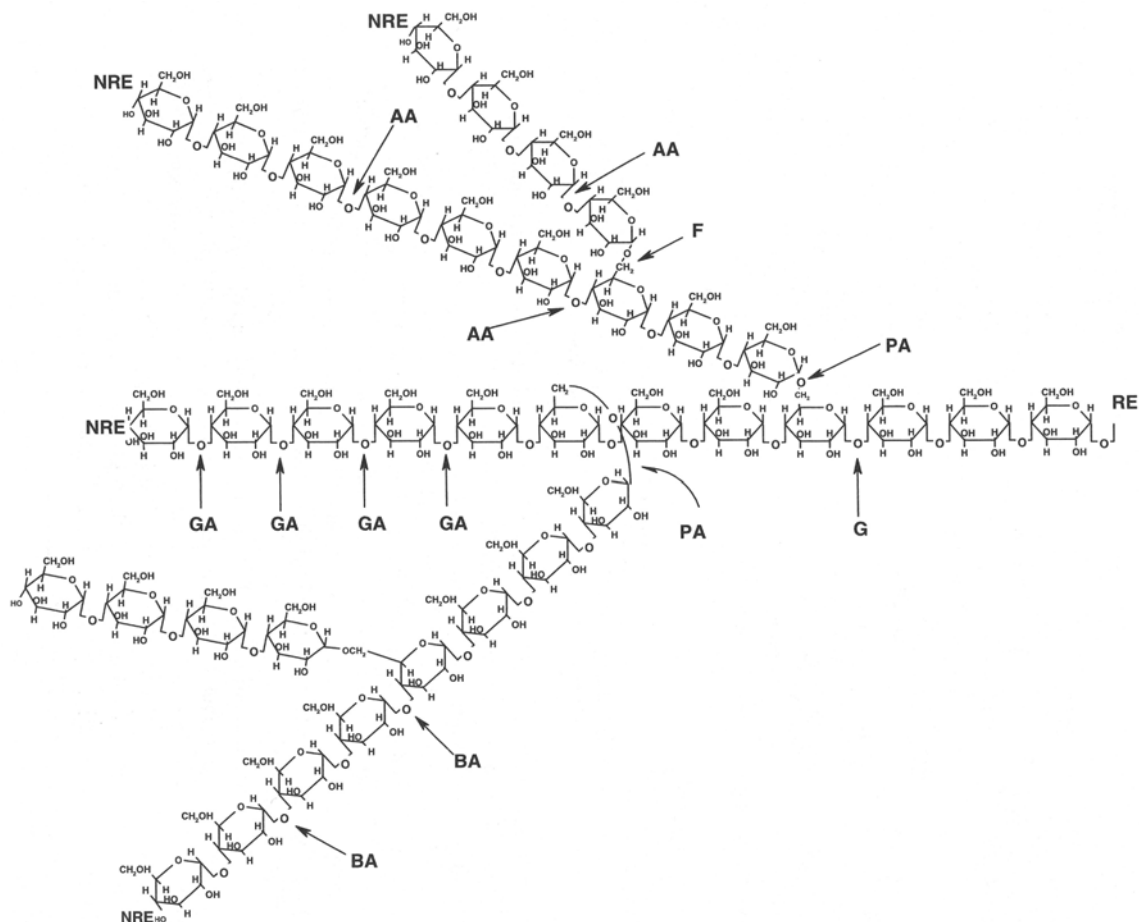
Da lahko izkoristimo škrob kot vir ogljika in energije, se mora ta polimer med presnovo najprej razgraditi do manjših izkoristljivih sladkorjev – monosaharidov, disaharidov, oligosaharidov. Prav to naredijo tudi mikroorganizmi, ki se »prehranjujejo« s škrobom. Z izločanjem ekstracelularnih encimov v okolico celica razgradi substrat na komponente, ki lahko vstopajo skozi celično membrano v citosol in s tem v metabolizem (katabolizem) celice. Biosinteza amilolitičnih encimov je torej neposredno povezana z rastjo mikroorganizmov, zato pravimo, da so ti encimi *primarni metaboliti*. Tak način prehranjevanja mikroorganizmov (predvsem plesni in bakterij) lahko izkoristimo za proizvodnjo encimov (denimo amilaz, proteaz, celulaž) v industrijskem merilu. Vrsta in količina sintetiziranih ekstracelularnih encimov je odvisna od vrste mikroorganizma, substrata ter načina kulture.

Številni mikroorganizmi sintetizirajo ekstracelularne hidrolaze (amilaze), ki omogočajo razgradnjo škroba. Glede na vez, ki jo cepijo, delimo amilaze na α -1,4-glukanaze in α -1,6-glukanaze. Endoglukanaze cepijo vezi v notranjosti škrobne molekule, eksoglukanaze pa z nereducirajočega konca verige. Produkti razgradnje škroba z amilazami so tako dekstrini, maltoza in glukoza. Med najpogostejše ekstracelularne mikrobne amilaze sodijo α -amilaze in glukoamilaze (amiloglukozidaze).

α -amilaze so α -1,4-endoglukanaze, ki bodisi zmanjšajo viskoznost škroba (utekočinjenje), pri čemer nastanejo oligosaharidi (dekstrini), bodisi povzročijo nastanek večjih koncentracij mono- in disaharidov (saharifikacija). Bakterijske α -amilaze sodijo v prvo skupino, α -amilaze gliv pa cepijo drugo glikozidno vez z nereducirajočega konca ravne verige in sprostijo maltozo.

Glukoamilaze (amiloglukozidaze) sproščajo glukozne ostanke z nereducirajočega konca škroba, dekstrinov ali maltoze s hidrolizo α -1,4-vezi. Imajo tudi šibko α -1,6-hidrolizno aktivnost (predvsem glukoamilaze plesni iz rodu *Rhizopus*), zato odcepljajo stranske verige.

Slika 6 prikazuje delovanje različnih amilaz na molekulo škroba.



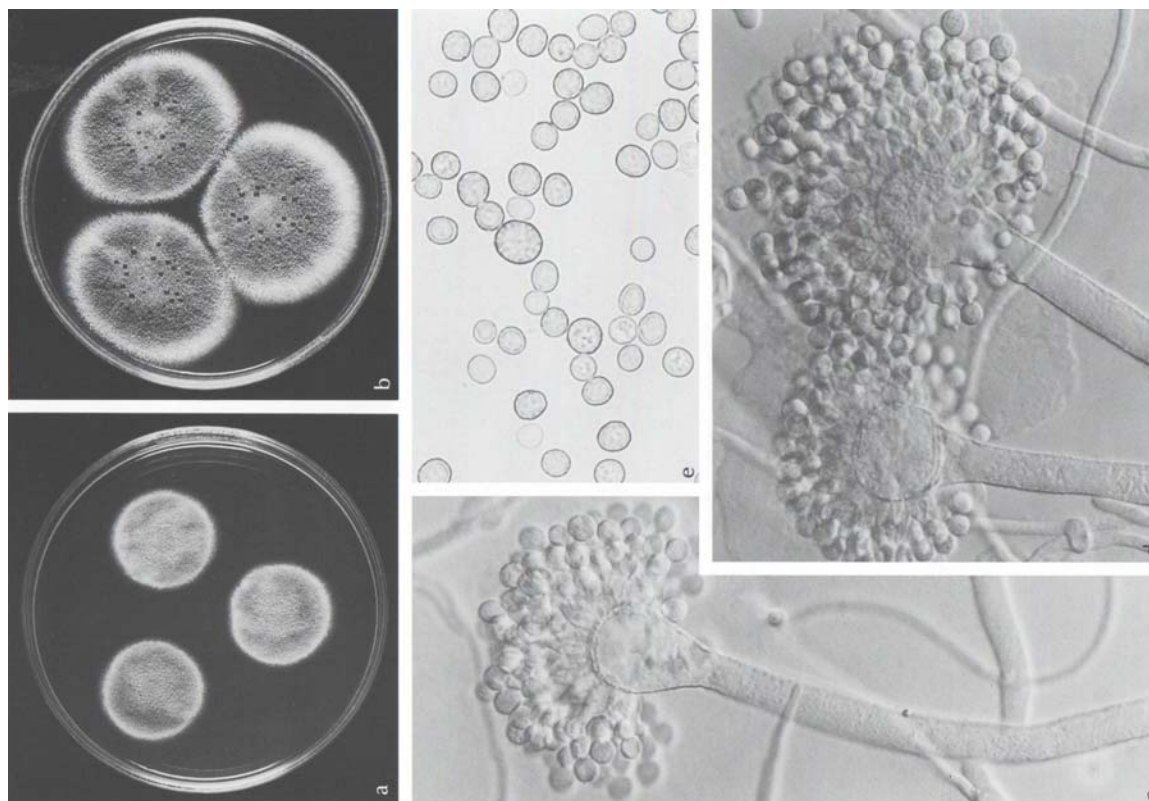
Slika 6. Delovanje amilaz na molekulo škroba (Ravi-Kumar in Umesh-Kumar, 2006)

AA – α -amilaze oziroma endo 1,4- α -D-glukan glukanohidrolaze; GA – glukoamilaze oziroma ekso 1,4- α -D-glukan glukanohidrolaze; BA – β -amilaze oziroma ekso 1,4- α -D-glukan maltohidrolaze; PA – pululanaze oziroma endo α -dekstrin 6-glukanohidrolaze; RE – reducirajoči konec; NRE – nereducirajoči konec; F – α -1,6-glikozidna vez; G – α -1,4-glikozidna vez

Med plesnimi so najpomembnejši proizvajalci ekstracelularnih encimov predstavniki rodov *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* in *Trichoderma*.

Če imajo hrane v izobilju, hife gliv intenzivno rastejo in tvorijo nitasto strukturo, imenovano micelij. Do spolne ali nespodne sporulacije pride zaradi spremenjenih razmer v okolju, denimo pomanjkanja hranil. Spore imajo v življenju gliv dve glavni nalogi: razširitev na novo okolje ali preživetje, dokler ne nastopijo ugodnejše razmere. Nespolna ali vegetativna sporulacija višjih gliv (kamor sodi tudi *Aspergillus oryzae*) je povezana s tvorbo velikega števila konidiospor ali konidijev, ki nastajajo na nosilcu, imenovanem konidiofor. Spolni cikel je bolj kompleksen in vključuje nastanek spolnih spor z mejozo v zaprtih plodiščih (velja za spolne oblike rodu *Aspergillus*).

Na sliki 7e so prikazani konidiji glive *A. oryzae*.



Slika 7. *Aspergillus oryzae*; a, b – kolonije; c, d – konidiofori; e – konidiji (Samson s sod., 2000)

Bioproces proizvodnje amilolitičnih encimov lahko poteka v tekočih substratih (submerzno) ali na/v trdnih oziroma čvrstih (»solid«) substratih. Rast plesni in drugih mikroorganizmov na/v trdnih substratih v odsotnosti proste, sorpcijsko nevezane vode imenujemo s tujko *solid state* kultivacija ali tudi *solid state fermentation* (SSF).

Solid state kultivacija se uporablja že stoletja – prvič je omenjena okoli 1000 let pr. n. št. v povezavi s proizvodnjo sojine omake na Kitajskem (tako imenovana tehnologija koji), medtem kot se v zahodnih državah tradicionalno uporablja pri proizvodnji plesnivih sirov, za mlečnokislinsko fermentacijo in pri kompostiranju. Danes je poleg tega načina mogoče pridobiti številne uporabne proizvode, kot so encimi, organske kisline, topila (etanol), bioinsekticidi, polisaharidi, antibiotiki in še mnogo drugih. Kljub temu pa ni mnogo velikih podjetij, ki bi uporabljala to tehnologijo, saj gre za precej kompleksne sisteme, tako na makro- kot na mikroravni, predvsem z vidika prenosa toplote in mase (kisika). S tem je povezana velika poraba energije za odvajanje nastale toplote, mešanje, dovajanje kisika. Poleg tega je težavno tudi spremljanje in reguliranje bioprocenih parametrov. Kljub temu ima solid state kultivacija nekatere prednosti v primerjavi s submerznim načinom kultivacije: to so predvsem manjša možnost kontaminacije substrata zaradi manjše vsebnosti vode, manjši delovni volumen za pretvorbo enake količine substrata in posledično veliki dobitki proizvodov na enoto volumna bioreaktorja, enostavnejša priprava gojišča itd.

Za solid state kultivacijo lahko uporabimo zelo enostavne bioreaktorje brez možnosti uravnavanja bioprocenih parametrov, denimo pladenski in stolpni bioreaktor. V računalniško vodenih bioreaktorjih pa lahko bioproces spremljamo in deloma tudi vodimo.

Uporabljajo se različni mešalni bioreaktorji, kot so horizontalni rotirajoči ali mešalni bioreaktor, vertikalni mešalni bioreaktor, bioreaktor z lebdečim slojem, tračni bioreaktor, cevni bioreaktor. S stališča masne bilance so to navadno bioreaktorji z enkratnim polnjenjem, redkeje z neprestanim polnjenjem in praznjenjem ali z dohranjevanjem.

2.2 Naloga

Prireditve laboratorijskega cevnega bioreaktorja za aerobni tip kultivacije na/v trdnem gojišču (solid state). Priprava trdnega gojišča in inokuluma čiste kulture *Aspergillus oryzae*. Proizvodnja ekstracelularnih amilaz s solid state kultivacijo plesni *A. oryzae* na/v pšeničnih otrobih. Spremljanje bioprocesa z makroskopsko kontrolo rasti plesni in z merjenjem amilolitične aktivnosti ter vrednosti pH.

2.3 Potreben material

2.3.1 Kultura

Čisto kulturo plesni *A. oryzae* inkubiramo 7 do 10 dni pri 28 °C na poševnem agarju SAŠ (točka 2.3.2) v demetrijevi steklenički do zadostne sporulacije.

2.3.2 Gojišča

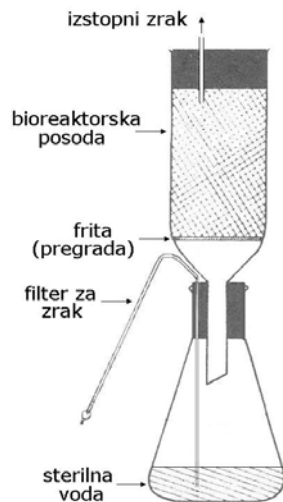
SAŠ (sladni agar z dodatkom škroba – sestava gojišča je podana v prilogi 2.2) služi za vzdrževanje kulture plesni *A. oryzae*, za indukcijo sinteze amilolitičnih encimov in za oblikovanje spor. Sterilizacija gojišča je potekala 20 min v avtoklavu pri 121 °C in tlaku 1,2 bar.

Gojišče iz pšeničnih otrobov se uporablja za solid state kultivacijo. V čašo zatehtamo 200 g navlaženih pšeničnih otrobov (1 kg pšeničnih otrobov, ki vsebujejo okoli 10 % vode, navlažimo z 1,4 l destilirane vode). Sterilizacija gojišča je potekala 20 min v avtoklavu pri 121 °C in tlaku 1,2 bar.

2.3.3 Aparature in oprema

2.3.3.1 Biorektorski sistem

Laboratorijski statični kolonski biorektorski sistem je prikazan na sliki 8. Posamezni sestavni deli so bili sterilizirani v avtoklavu (121 °C, 20 min).



Slika 8. Laboratorijski statični kolonski bioreaktor (prirejeno po Raspor in Smole-Možina, 1993)

2.3.3.2 Druqa oprema:

- homogenizator ultra-turrax
- centrifuga
- vodna kopel
- ledena voda
- spektrofotometer
- pH-meter
- mikroskop
- Bürker-Türkova števna ploščica
- rotameter
- laboratorijska steklovina

2.3.4 Kemikalije (reagenti):

- fiziološka raztopina (0,01 M Na-fosfatni pufer, $pH = 5$)
- škrobovica (0,5 % raztopina škroba v 0,04 M fosfatnem pufru, $pH = 6$)
- jodovica ($8 \cdot 10^{-4}$ M $J_2 + KJ$)

2.4 Potek vaje

2.4.1 Priprava inokuluma

Namnoženo kulturo *A. oryzae* aseptično prelijemo s 30 ml fiziološke raztopine, ki ji je bilo dodanih nekaj kapljic Tweena za lažje dispergiranje hidrofobnih spor. S cepilno zanko sprostimo spore v sterilno tekočino v demetrijevi steklenički. Z neposrednim štetjem pod mikroskopom s pomočjo Bürker-Türkoviš števnih ploščic (slika 5) določimo koncentracijo spor v suspenziji (inokulumu). Pred nanosom na števno ploščico inokulum po potrebi razredčimo po Kochu.

2.4.2 Priprava bioreaktorskega sistema in zagon bioprocesa (inokulacija)

Iz koncentracije spor v inokulumu izračunamo potreben volumen inokuluma, da bo začetna koncentracija spor v gojišču takoj po inokulaciji $1 \cdot 10^6$ spor·g⁻¹. Izračunani volumen inokuluma aseptično prenesemo v 200 g pšeničnih otrobov in dobro premešamo, da se spore čim enakomerneje razporedijo po gojišču.

Na dno bioreaktorske posode (steklena kolona) prenesemo frito in kolono napolnimo do 2/3 z inokuliranim gojiščem. Pazimo, da se vsebina bioreaktorja ne posede (ne tlačimo, stresamo ipd.).

Sestavimo posamezne sestavne dele laboratorijskega statičnega kolonskega bioreaktorskega sistema, kot prikazuje slika 8. Delamo aseptično.

Sestavljen in napolnjen bioreaktorski sistem prenesemo v komoro, v kateri bo potekal bioproces. Temperaturo termostata uravnamo na 28 °C. Z rotametrom uravnamo pretok zraka za aeracijo na 1 l·min⁻¹ ter ga povežemo z bioreaktorskim sistemom.

2.4.3 Nadzor (spremljanje) bioprocesa

Dogajanje v bioreaktorju med bioprocenom spremljamo na več načinov:

- Vizualno
Opisno vrednotimo preraščenost gojišča s plesnijo, prisotnost spor.
- Z vzorčenjem in merjenjem vrednosti pH ter amilolitične aktivnosti vzorcev
Med potekom bioprocesa trikrat vzorčimo: ob času 0 (takoj po inokulaciji), med bioprocenom in na koncu bioprocesa. Vzorce shranimo v zamrzovalniku (pri -18 °C) do analiz.

2.4.4 Analize vzorcev

2.4.4.1 Merjenje vrednosti pH

Vzorce odmrznemo in iz njih ekstrahiramo amilaze po spodaj prikazanem analitičnem postopku A. V **nerazredčenem** supernatantu izmerimo vrednost pH s predhodno umerjenim pH-metrom. Analiziramo 2 paralelki istega vzorca.

2.4.4.2 Spektrofotometrično določanje amilolitične aktivnosti (modificirana metoda po Fuwi)

Amilolitično aktivnost (AA) posredno vrednotimo s spektrofotometričnim določanjem preostalega škroba po inkubaciji z vzorci, ki so amilolitično aktivni.

Enota amilolitične aktivnosti pomeni razgradnjo 0,1 mg topnega škroba v minuti.

Analitični postopek za določanje amilolitične aktivnosti vzorcev:

A)

0,5 g vzorca + 5 ml dest. H₂O
↓
homogenizacija (1 min)
↓
centrifugiranje (4000 min⁻¹, 5 min)
↓
odlitje supernatanta
↓
redčenje supernatanta po Kochu
↓

B)

1 ml razredčenega supernatanta + 1 ml škrobovice
↓
inkubacija 10 min, 40 °C
↓
hitro hlajenje v ledeni vodi
↓
0,2 ml inkubata + 5 ml jodovice
↓
razvitje barve (10 min na sobni temperaturi)
↓
merjenje A ($\lambda = 600 \text{ nm}$)*

* A₆₀₀ mora biti v linearnem območju umeritvene krivulje A₆₀₀ v odvisnosti od koncentracije topnega škroba. Če je A₆₀₀ prenizka, vzorec (supernatant) dodatno razredčimo, če je previsoka, vzamemo manj razredčen vzorec oziroma podaljšamo čas inkubacije pri 40 °C.

Slepi vzorec

Po postopku B, le da 1 ml supernatanta dodamo škrobovici po 10-minutni inkubaciji pri 40 °C.

Umeritvena krivulja

Pripravimo raztopine topnega škroba v koncentracijskem območju od 0 do 5 mg·ml⁻¹. Odpipetiramo po 0,1 ml vsake raztopine, dodamo 0,1 ml destilirane vode in 5 ml jodovice. Po razvitju barve (10 min na sobni temperaturi) izmerimo A₆₀₀. Narišemo graf odvisnosti A₆₀₀ od koncentracije topnega škroba.

Izračun amilolitične aktivnosti vzorcev (AA·g⁻¹)

vzorec: A₆₀₀ → koncentracija nerazgrajenega škroba (c_{vz.})

slepi vzorec: A₆₀₀ → koncentracija celokupnega škroba (c_{sl. vz.})

koncentracija razgrajenega škroba (Δc): $\Delta c = c_{\text{sl. vz.}} - c_{\text{vz.}}$

$$\frac{AA}{g} = \frac{\Delta c \cdot R \cdot 10 \cdot 1 \text{ ml}}{0,1 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot t} \quad (10)$$

R – redčitev vzorca, t – čas inkubacije pri 40 °C (min)

2.5 Meritve, izračuni in rezultati

2.5.1 Meritve

Tabelarični prikazi:

- umeritvena krivulja ($c_{\text{škroba}}$, A_{600})
- vrednost pH (vzorci), A_{600} (vzorci in slepi vzorci), amilolitična aktivnost
- opis rasti plesni med bioprocesom (rezultati vizualnega spremljanja bioprocesa)

2.5.2 Izračuni:

- koncentracija spor v inokulumu ($\text{spor} \cdot \text{ml}^{-1}$)
- volumen inokuluma (ml)
- amilolitična aktivnost vzorcev ($\text{AA} \cdot \text{g}^{-1}$)

2.5.3 Predstavitev rezultatov

Grafični prikazi:

- umeritvena krivulja odvisnosti A_{600} od $c_{\text{škroba}}$
- vrednost pH in amilolitična aktivnost vzorcev v odvisnosti od časa trajanja bioprocesa

3 PRENOS KISIKA – DOLOČITEV $k_L a$

3.1 Teoretične osnove

3.1.1 Prenos snovi v sistemu plin-tekočina

Pri prenosu snovi gre za premik materialnih delcev ene komponente v drugi, ki lahko poteka z difuzijo ali s konvekcijo.

Difuzija je posledica gibanja molekul zaradi neenakomerne porazdelitve koncentracije, konvekcija pa je vezana na usmerjeno gibanje tekočine, pri čemer je pomemben tokovni režim tekočine.

Laminarni tok nastopi pri počasnem gibanju tekočine, ko plasti mirno drsijo druga ob drugi brez medsebojnega premešavanja. Tako se prenos snovi z difuzijo odvija le v smeri, pravokotni na tokovnice. Tak način prenosa snovi je v bioprocenih brozgah mogoče najti:

- v najmanjših vrtincih, kjer je tok tekočine laminaren
- v skupkih celic ali encimov (trdni delci)
- na stiku dveh faz (denimo plinaste in tekoče)

V *turbulentnem toku*, ki nastopi pri večjih frekvencah mešanja, se tekočina razdrobi v vrtince, ki se neurejeno gibljejo in mešajo med seboj. Do prenosa snovi lahko pride v vseh smereh. Vzporedno s konvektivnim prenosom snovi poteka tudi difuzija, ki pa je pri intenzivni konvekciji zanemarljiva.

Pomembnost prenosa snovi med plinom in tekočino v bioprocenstvu se kaže predvsem v aerobnih bioprocenih, pri katerih je treba zagotoviti dovolj raztopljenega kisika v bioprocenih brozgi. Med mešanjem mehurčkov zraka, ki vsebujejo kisik, se odvija snovni prenos kisika iz plina v tekočino prek mejnega sloja in fazne meje, ki ga lahko opišemo s *teorijo mejnega sloja*. Ta predpostavlja, da na vsaki strani fazne meje, to je znotraj plinskega mehurčka in v tekočini, obstajata mirujoči plasti plina in tekočine določene debeline, kjer poteka snovni prenos komponente A (kisika) z difuzijo. Snovni prenos tako povečujejo tisti faktorji, ki zmanjšujejo debelino sloja. To je predvsem intenzivno mešanje, ki je opredeljeno z večjim *Reynoldsovim številom*, na kar lahko vplivamo denimo s temperaturo. Uvedel ga je Osborne Reynolds leta 1883 med proučevanjem toka tekočin v ceveh. Za tok tekočine po ceveh okroglega preseka velja naslednja enačba:

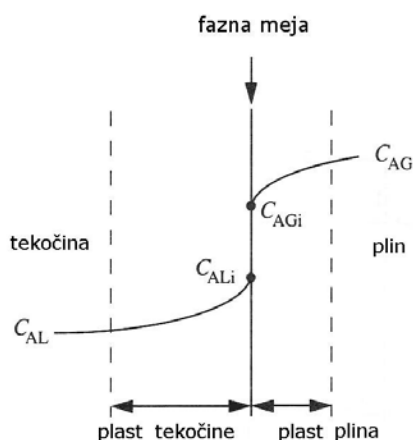
$$Re = \frac{D \cdot v \cdot \rho}{\eta} \quad (11)$$

pri čemer je Re Reynoldsovo število, D je premer cevi, v splošnem karakteristična dimenzija, v je povprečna linearna hitrost tekočine, ρ je gostota tekočine, η pa dinamična viskoznost tekočine. V gladkih ceveh je tok tekočin laminaren do Re 2100, turbulenten pa pri Re več kot 4000. Med 2100 in 4000 je prehodno območje, v katerem je tok lahko laminaren ali turbulenten, odvisno od razmer na vstopu v cev in drugih spremenljivk. Za mešalne posode (bioreaktorje) pa izrazimo Reynoldsovo število kot:

$$Re_i = \frac{N_i \cdot D_i^2 \cdot \rho}{\eta} \quad (12)$$

pri čemer je Re_i Reynoldsovo število mešala, D_i je premer mešala, N_i pa frekvenca mešanja. Za mnoge mešalne sisteme, ki se največkrat uporabljajo, velja, da je tok laminaren, če je $Re_i \leq 10$.

Slika 9 prikazuje primer porazdelitve komponente A pri snovnem prenosu iz plina v tekočino. Koncentracija komponente A v tekočini je C_{AL} oziroma C_{ALi} na fazni meji, koncentracija komponente A v plinu pa je C_{AG} oziroma C_{AGi} na fazni meji.



Slika 9. Koncentracijska porazdelitev komponente A pri snovnem prenosu iz plina v tekočino (prirejeno po Doran, 1995)

Snovni tok (fluks) komponente A (N_A ; $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ali $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) skozi film plina lahko zapišemo kot:

$$N_{AG} = k_G \cdot a (C_{AG} - C_{AGi}) \quad (13)$$

fluks skozi film tekočine pa

$$N_{AL} = k_L \cdot a (C_{ALi} - C_{AL}) \quad (14)$$

pri čemer je k_G koeficient snovnega prestopa oziroma snovna prestopnost v plinski fazi ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), k_L je snovna prestopnost v tekočini ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), a pa medfazna površina ($\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$).

Če predpostavimo, da se na fazni meji vzpostavi ravnotežje, lahko zapišemo:

$$C_{AGi} = m \cdot C_{ALi} \quad (15)$$

in

$$C_{ALi} = \frac{C_{AGi}}{m} \quad (16)$$

pri čemer je m porazdelitveni (distribucijski) faktor. Izraza (15) in (16) vstavimo v enačbi (13) in (14) in dobimo naslednja zapisa:

$$N_A \left(\frac{1}{k_G \cdot a} + \frac{m}{k_L \cdot a} \right) = C_{AG} - m \cdot C_{AL} \quad (17)$$

in

$$N_A \left(\frac{1}{m \cdot k_G \cdot a} + \frac{1}{k_L \cdot a} \right) = \frac{C_{AG}}{m} - C_{AL} \quad (18)$$

Izraza v oklepajih pomenita snovno prehodnost, in sicer snovno prehodnost v plinski fazi, ki jo zapišemo kot:

$$\frac{1}{K_G \cdot a} = \frac{1}{k_G \cdot a} + \frac{m}{k_L \cdot a} \quad (19)$$

ter snovno prehodnost v tekočini:

$$\frac{1}{K_L \cdot a} = \frac{1}{m \cdot k_G \cdot a} + \frac{1}{k_L \cdot a} \quad (20)$$

Hitrost prenosa snovi oziroma snovni tok komponente A v sistemu plin-tekočina lahko torej izrazimo z dvema enačbama:

$$N_A = K_G \cdot a (C_{AG} - m \cdot C_{AL}) \quad (21)$$

in

$$N_A = K_L \cdot a \left(\frac{C_{AG}}{m} - C_{AL} \right) \quad (22)$$

V enačbah (21) in (22) navadno uporabimo ravnotežne koncentracije. Koncentracijo komponente A v plinu, ki je v ravnotežju s C_{AL} , zapišemo kot:

$$C_{AG}^* = m \cdot C_{AL} \quad (23)$$

koncentracijo komponente A v tekočini, ki je v ravnotežju s C_{AG} , pa kot:

$$C_{AL}^* = \frac{C_{AG}}{m} \quad (24)$$

Enačbi (21) in (22) se sedaj glasita:

$$N_A = K_G \cdot a (C_{AG} - C_{AG}^*) \quad (25)$$

in

$$N_A = K_L \cdot a (C_{AL}^* - C_{AL}) \quad (26)$$

Če je komponenta A slabo topna v tekočini, denimo kisik v vodnih raztopinah, je upor za prenos snovi v tekočini zelo velik, torej je snovna prestopnost v plinski fazi k_G mnogo večja od snovne prestopnosti v tekočini k_L . Iz enačbe (20) tako sledi, da sta $K_L \cdot a$ in $k_L \cdot a$ približno enaka. Enačbo (26) lahko zato poenostavimo in jo zapišemo kot:

$$N_A = k_L \cdot a (C_{AL}^* - C_{AL}) \quad (27)$$

Za hitrost prenosa kisika iz zračnega mehurčka v bioprocesno brozgo lahko uporabimo enačbo (27), v kateri je N_A hitrost prenosa kisika na volumensko enoto brozge ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$), k_L je koeficient snovne prestopnosti v tekočini ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), a je stična površina med plinom in tekočino na volumensko enoto brozge ($\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$), C_{AL} je koncentracija kisika v brozgi ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$), C_{AL}^* pa koncentracija kisika v brozgi v ravnotežju s plinsko fazo, ki ji pravimo tudi *topnost* kisika v brozgi ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$). Razlika med maksimalno možno in dejansko koncentracijo kisika v brozgi ($C_{AL}^* - C_{AL}$) je gonilna sila za prenos kisika.

Podatki o topnosti kisika v vodi v odvisnosti od temperature in sestave plina, s katerim prepihujemo vodo, so zbrani v prilogi 3.1. Seveda teh podatkov ne moremo uporabiti neposredno za bioprocesne sisteme, saj ima poleg drugih parametrov pomemben vpliv na topnost kisika sestava medija oziroma v vodi raztopljene snovi. Tako je topnost kisika v tipičnem bioprocesnem gojišču, ki vsebuje različne topljence (sladkorje, anione, katione, protipenilce), za 5 do 25 % manjša od topnosti kisika v vodi pri enakih razmerah (temperatura, tlaki).

Na topnost kisika v tekočini vplivata tudi tlak plina, s katerim prepihujemo tekočino, in parcialni tlak kisika v tem plinu. Uporabimo lahko Henryjev zakon ravnotežja, ki se glasi:

$$p_{AG} = H_e \cdot C_{AL}^* \quad (28)$$

p_{AG} je parcialni tlak komponente A v plinu, H_e je Henryjeva konstanta, odvisna od temperature.

3.1.2 Poraba kisika v aerobnih bioprocesih

Celice med aerobno kultivacijo porabljajo raztopljeni kisik iz bioprocesne brozge. Hitrost prenosa kisika iz plina v tekočino je zato zelo pomembna, še posebno pri velikih koncentracijah celic, pri katerih lahko pride do limitacije rasti zaradi (ne)razpoložljivosti kisika v brozgi.

Celice aerobnih organizmov med intenzivno rastjo zaradi slabe topnosti kisika v brozgi hitro porabijo raztopljeni kisik, zato ga je treba nenehno dovajati s prezračevanjem. V brozgi s koncentracijo aktivno dihajočih celic približno $1 \cdot 10^9$ celic $\cdot \text{ml}^{-1}$ je treba vsebnost kisika v brozgi nadomestiti okoli 12-krat na minuto, da pokrijemo potrebe po kisiku.

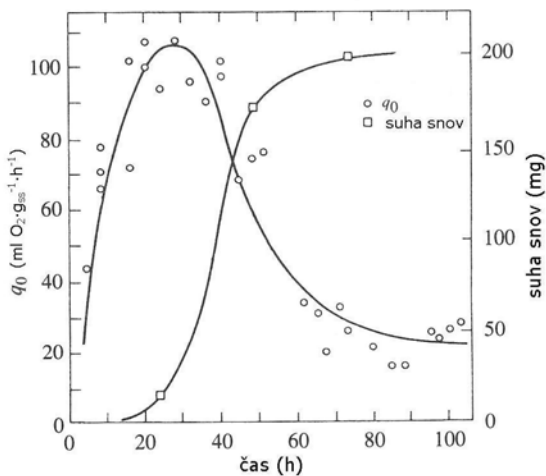
Hitrost porabe kisika iz bioprocesne brozge določa hitrost, s katero raztapljamo kisik v brozgi. Na potrebe po kisiku vplivajo predvsem naslednji faktorji:

- vrsta organizma
- faza rasti kulture
- vir ogljika v gojišču (celice denimo najhitreje porabijo glukozo, zato so hitrosti porabe kisika večje, če je vir C v gojišču glukoz)

V bioprocesu z enkratnim polnjenjem (zaprt) se hitrost porabe kisika spreminja s časom, in sicer zaradi:

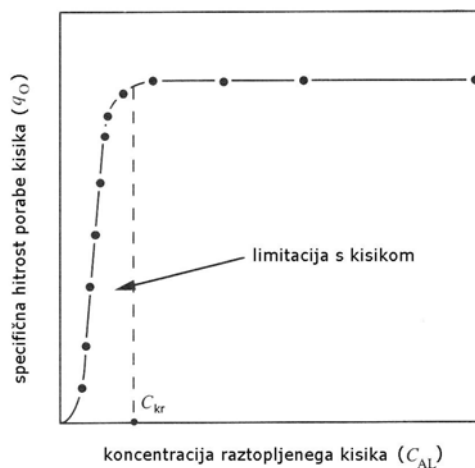
- vedno večje koncentracije celic – skupna (celotna) hitrost porabe kisika je sorazmerna številu prisotnih celic
- spreminjanja *specifične hitrosti porabe kisika* (q_O) ($\text{mol O}_2 \cdot \text{g}_{\text{biomase}}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

Specifična hitrost porabe kisika je hitrost porabe kisika na celico in je odvisna predvsem od biokemijske narave (lastnosti) celice in od njenega okolja. Iz slike 10 je razvidno, da je q_O največja v zgodnji eksponentni fazi rasti.



Slika 10. Spreminjanje specifične hitrosti porabe kisika in koncentracije biomase med bioprosom z enkratnim polnjenjem (prirejeno po Doran, 1995)

Ko pa koncentracija raztopljenega kisika v brozgi pade pod določeno vrednost, tj. *kritična koncentracija raztopljenega kisika* (C_{kr}), postane q_O odvisna tudi od koncentracije kisika v brozgi (C_{AL}). Odvisnost q_O od C_{AL} prikazuje slika 11.



Slika 11. Odvisnost specifične hitrosti porabe kisika od koncentracije raztopljenega kisika (prirejeno po Doran, 1995)

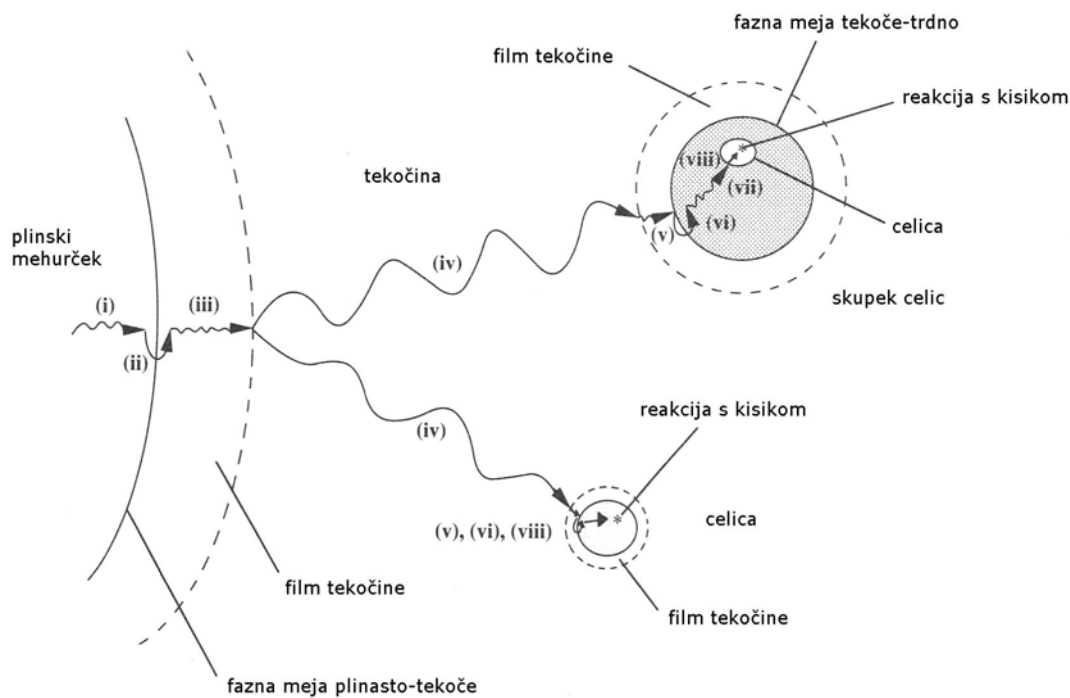
Koncentracija raztopljenega kisika v brozgi mora biti v vsaki točki bioreaktorja večja od C_{kr} , da ne pride do limitacije rasti s kisikom. Vrednost kritične koncentracije raztopljenega kisika je odvisna od organizma, navadno se giblje med 5 in 10 %.

Hitrost porabe kisika na volumensko enoto brozge Q_0 ($\text{mol O}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$) lahko zapišemo kot:

$$Q_0 = q_0 \cdot X \quad (29)$$

pri čemer je X koncentracija celic ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$).

Preden se molekula kisika porabi v celici, mora na poti od zračnega mehurčka do mitohondrija premagati številne upore (prikazani kot (i) do (viii) na sliki 12). Ker je kisik slabo topen plin, je največji upor za prenos kisika laminarni sloj (plast) tekočine okoli zračnega mehurčka, v katerem poteka prenos z difuzijo (iii). Transport skozi ta film je torej korak, ki limitira celotni proces ter kontrolira skupno hitrost prenosa snovi.



Slika 12. Koraki pri prenosu kisika iz zračnega mehurčka do celice (prirejeno po Doran, 1995)

3.1.3 Stacionarno stanje

V stacionarnem stanju ni akumulacije kisika nikjer v bioreaktorju, torej mora biti hitrost prenosa kisika iz zračnih mehurčkov enaka hitrosti porabe kisika. Zapišemo lahko:

$$k_L \cdot a (C_{AL}^* - C_{AL}) = q_0 \cdot X \quad (30)$$

Enačbo (30) lahko uporabimo za različne namene:

- Izračunamo lahko maksimalno koncentracijo celic, ki jo dosežemo v določenem sistemu prenosa kisika v bioreaktorju. V določenih razmerah med obratovanjem je hitrost prenosa kisika maksimalna, ko je koncentracijska razlika ($C_{AL}^* - C_{AL}$), tj. gonilna sila za prenos kisika, največja. To pa je takrat, ko je koncentracija

raztopljenega kisika (C_{AL}) enaka nič. Maksimalno koncentracijo biomase $X_{\max}$ torej zapišemo kot:

$$X_{\max} = \frac{k_L \cdot a \cdot C_{AL}^*}{q_O} \quad (31)$$

Če je $X_{\max}$ manjša od tiste koncentracije biomase, ki jo želimo doseči v bioprocesu, moramo izboljšati $k_L \cdot a$.

- Določimo lahko minimalni oziroma kritični $k_L \cdot a$, ki je potreben, da vzdržujemo koncentracijo raztopljenega kisika v bioprocesni brozgi nad kritično koncentracijo raztopljenega kisika ($C_{AL} > C_{kr}$):

$$(k_L \cdot a)_{kr} = \frac{q_O \cdot X}{(C_{AL}^* - C_{AL})} \quad (32)$$

3.1.4 Eksperimentalno določanje $k_L a$

V realnih sistemih, ki vključujejo prenos snovi, je zelo težko določiti kontaktno medfazno površino (a). Ta je neposredno povezana s številom in z velikostjo plinskih mehurčkov v tekočini, kar pa je odvisno od številnih faktorjev, kot so sestava medija, frekvenca mešanja in pretok plina (zraka). Zato v praksi navadno določamo produkt $k_L \cdot a$, volumenski koeficient snovnega prestopa oziroma prenosa kisika.

Kot rezultat mnogih študij so nastale *empirične korelacije* med $k_L \cdot a$ in drugimi pomembnimi procesnimi spremenljivkami, kot so premer mehurčkov, hitrost tekočine, gostota, viskoznost, difuzivnost kisika idr. Kljub temu je le na podlagi korelacij težko napovedati, kakšen bo $k_L \cdot a$ v določenem bioreaktorju, zato koeficient snovne prestopnosti navadno *določamo eksperimentalno*.

Metode za določanje $k_L \cdot a$ so zelo različne, pri vseh pa moramo zagotoviti enake eksperimentalne pogoje, kot so med obratovanjem v bioreaktorju.

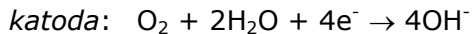
Če je koncentracija kisika, ki jo merimo med eksperimentom, konstantna, je metoda *stacionarna*. Spremljamo vsebnost kisika v vstopnem plinu v bioreaktor in izstopnem plinu iz bioreaktorja. Razlika med njima mora biti enaka hitrosti prenosa kisika iz plina v tekočino. Metodo je mogoče izvesti med normalnim obratovanjem bioreaktorjev.

Pri *dinamičnih metodah* se koncentracija kisika s časom spreminja. Temeljijo torej na nestacionarnih pogojih. Obstajajo različne različice dinamične metode. Med najpogostejšimi sta:

- razplinjevalna metoda (modificirana po Wiseju)
- dinamična metoda z mikroorganizmi (modificirana po Taghuchiju in sodelavcih)

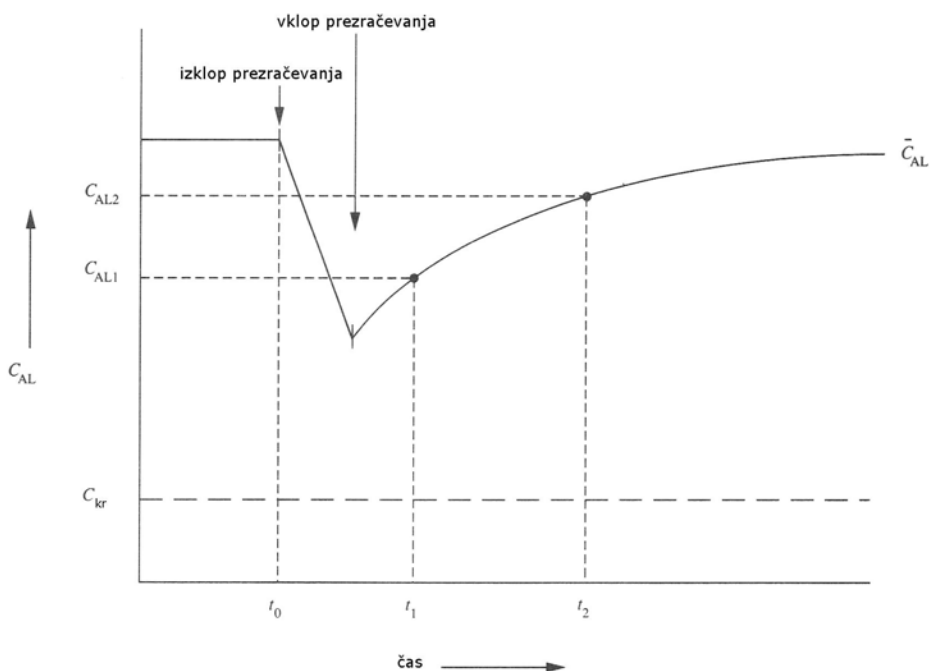
Eksperiment poteka med aerobnim bioprocesom z enkratnim polnjenjem v mešalnem bioreaktorju. Koncentracijo raztopljenega kisika v brozgi spremljamo s senzorjem za merjenje kisika (kisikova oziroma pO_2 -elektroda). Kisikov senzor je zgrajen iz ohišja s polprepustno membrano, skozi katero difundira kisik. Na notranji strani senzorja je elektrolit z anodo in katodo. Kisik difundira skozi film tekočine na zunanji strani tik ob

membrani ter nato skozi polprepustno membrano v notranjost senzorja, kjer sodeluje pri hitri elektrokemijski reakciji:



Izhodni električni tok je proporcionalen snovnemu toku kisika do katode, torej njegovi aktivnosti oziroma parcialnemu tlaku, zato izraz koncentracija kisika pravzaprav pomeni parcialni tlak kisika. Snovni tok kisika do katode je tako odvisen od dveh uporov: upora membrane in upora filma na zunanji strani senzorja. Na rezultate meritev lahko vplivajo tudi mehurčki, ki se med merjenjem »lepijo« na membrano oziroma ostajajo v raztopini, če uporabimo dinamično metodo s prepihovanjem. Tako se lahko v določenem trenutku vrednost koncentracije kisika, ki jo kaže elektroda, in dejanska vrednost razlikujeta v primeru, ko senzor ne more slediti hitrim spremembam koncentracije v tekočini oziroma takrat, ko medij, v katerem merimo, povzroča kakšne nezaželene pojave. Zato imajo stacionarne metode celo nekatere prednosti pred dinamičnimi.

V nekem času ($t = 0$) začnemo brozgo deoksigenirati, tako da izklopimo prezračevanje in zmanjšamo frekvenco mešanja na minimum, da še ne pride do posedanja mikroorganizmov, hkrati pa preprečimo površinsko aeracijo. Koncentracija raztopljenega kisika v brozgi (C_{AL}) začne padati, saj ga celice porabljajo (slika 13). Za ta del krivulje velja enačba (29).



Slika 13. Spreminjanje koncentracije raztopljenega kisika v bioprocesni brozgi med dinamično metodo določanja $k_L \cdot a$ (prirejeno po Doran, 1995)

Prezračevanje moramo ponovno vklopiti, preden koncentracija raztopljenega kisika v brozgi doseže C_{kr} , saj je pomembno, da hitrost porabe kisika ni odvisna od koncentracije raztopljenega kisika. Po vklopu prezračevanja sledi reoksigenacija, tj. ponovno raztapljanje kisika in povečevanje koncentracije raztopljenega kisika v brozgi do *ravnotežne koncentracije raztopljenega kisika* ($\bar{C}_{AL}$), ki je odraz ravnotežja med vnosom in porabo kisika. C_{AL1} in C_{AL2} na sliki 13 sta med reoksigenacijo izmerjeni koncentraciji kisika ob časih t_1 in t_2 .

Med reoksigenacijo sistem ni v stacionarnem stanju, ker gre tako za vnos kisika v brozgo ($k_L \cdot a(C_{AL}^* - C_{AL})$) kot za porabo s celicami ($q_O \cdot X$). Tako velja naslednja enačba:

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_L \cdot a(C_{AL}^* - C_{AL}) - q_O \cdot X \quad (33)$$

Ko pa se vzpostavi stacionarno stanje, je $C_{AL} = \bar{C}_{AL}$, $\frac{dC_{AL}}{dt} = 0$, saj se koncentracija raztopljenega kisika s časom ne spreminja. Iz enačbe (33) torej sledi:

$$q_O \cdot X = k_L \cdot a(C_{AL}^* - \bar{C}_{AL}) \quad (34)$$

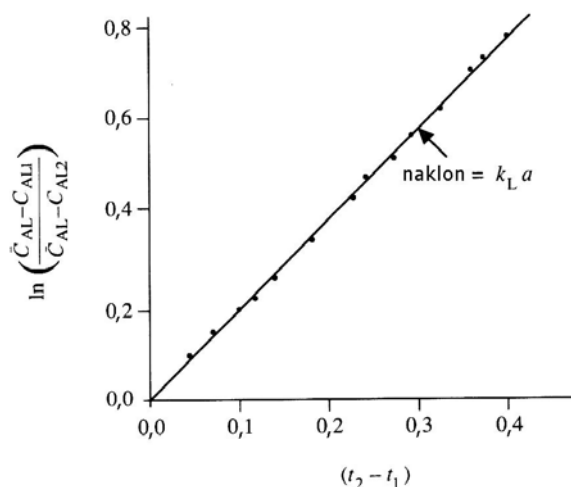
Če izraz (34) vnesemo v enačbo (33), dobimo:

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_L \cdot a(\bar{C}_{AL} - C_{AL}) \quad (35)$$

Predpostavimo, da se $k_L \cdot a$ s časom ne spreminja in zapis (35) integriramo med časoma t_1 in t_2 . Rezultat je naslednji:

$$k_L \cdot a = \frac{\ln\left(\frac{\bar{C}_{AL} - C_{AL1}}{\bar{C}_{AL} - C_{AL2}}\right)}{t_2 - t_1} \quad (36)$$

$k_L \cdot a$ lahko tako izračunamo iz dveh točk na sliki 13. Rezultat je natančnejši, če izberemo več točk, izračunamo $\ln\left(\frac{\bar{C}_{AL} - C_{AL1}}{\bar{C}_{AL} - C_{AL2}}\right)$ in vrednosti naneseemo na ordinato, $t_2 - t_1$ pa na absciso (slika 14). Naklon premice predstavlja $k_L \cdot a$.



Slika 14. Grafična določitev $k_L \cdot a$ z dinamično metodo (prirejeno po Doran, 1995)

Izraz (36) lahko uporabimo tudi za sisteme brez porabe kisika. V tem primeru je $\bar{C}_{AL} = C_{AL}^*$, metodi za določanje $k_L \cdot a$ pa pravimo razplinjevalna metoda.

3.2 Naloga

Določitev volumenskega koeficienta snovnega prestopa kisika ($k_L \cdot a$) pri različnih frekvencah mešanja in pretokih zraka v laboratorijskem bioreaktorju standardnih dimenzij z dvema dinamičnima metodama: razplinjevalno in dinamično metodo z mikroorganizmi.

3.3 Potreben material

3.3.1 Kultura

Čista kultura kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* (pekovski kvas).

3.3.2 Gojišče

Sestava gojišča za aerobno submerzno kultivacijo kvasovk v bioprocusu z enkratnim polnjenjem je podana v prilogi 2.3. Gojišče je bilo sterilizirano v avtoklavu 20 min pri 121 °C in tlaku 1,2 bar.

3.3.3 Aparature in oprema

3.3.3.1 Bioreaktorski sistem

- laboratorijski mešalni bioreaktor ($V_d = 10 \text{ dm}^3$) z opremo, pO_2 -elektroda – točka 3.4.1
- laboratorijski mešalni bioreaktor ($V_d = 2,5 \text{ dm}^3$) z opremo, pO_2 -elektroda (Slika 15) – točka 3.4.2



Slika 15. Laboratorijski bioreaktorski sistem ($V_d = 2,5 \text{ dm}^3$)

3.3.3.2 Druga oprema:

- jeklenka z N_2
- rotameter
- laboratorijski inventar za inokulacijo: gorilnik, lij

3.4 Potek vaje

3.4.1 Razplinjevalna metoda

Vodo v bioreaktorju (10 l) prepihujemo z inertnim plinom N_2 tako dolgo, da izpodrinemo ves raztopljeni kisik iz vode. Pretok dušika uravnamo z rotametrom na $10 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$. Vsebnost kisika v vodi merimo s prej umerjeno pO_2 -elektrodo in na monitorju spremljamo grafični prikaz spreminjanja pO_2 (v %) v odvisnosti od časa. Ko je vrednost pO_2 enaka nič, prekinemo dotok dušika, nastavimo 1. kombinacijo eksperimentalnih parametrov (frekvenco mešanja in pretok zraka), pri katerem bomo določali $k_L \cdot a$, ter vklopimo prezračevanje. Spremljamo ponovno raztapljanje kisika v vodi (*reoksigenacija*). Ko pO_2 doseže 100 %, ponovimo postopek izpodrinjanja kisika iz vode in nastavimo 2. kombinacijo parametrov. Eksperiment izvedemo pri štirih različnih kombinacijah parametrov, prikazanih v tabeli 1.

Tabela 1: Prikaz eksperimentalnih razmer pri razplinjevalni metodi

kombinacija parametrov	frekvenca mešanja (min^{-1})	pretok zraka ($\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$)
1.	100	5,0
2.	100	10,0
3.	200	10,0
4.	200	5,0

3.4.2 Dinamična metoda z mikroorganizmi

Inokulum pripravimo tako, da v 125 ml sterilnega gojišča (priloga 2.3) zatehtamo 2,5 g pekovskega kvasa. Inokulum aseptično (ob gorilniku, skozi sterilen lij) prenesemo v 2,375 l sterilnega prezračenega gojišča v bioreaktorju in tako zaženemo aeroben submerzen bioproces z enkratnim polnjenjem. Kultivacija kvasovk poteka pri temperaturi 28 °C, frekvenci mešanja 200 min⁻¹ in pretoku zraka 5 l·min⁻¹ (2 vvm). Tako zagotovimo, da je koncentracija kisika v brozgi čim bližje nasičenju.

Čez približno 15 minut izklopimo prezračevanje in mešanje zmanjšamo na minimum, da preprečimo površinsko aeracijo ter zagotovimo dober odzivni čas elektrode, hkrati pa dosežemo, da se mikroorganizmi ne posedajo. Spremljamo linearno padanje koncentracije raztopljenega kisika v brozgi, za katerega velja enačba (29), medtem ko je $k_L \cdot a = 0$. Ko pO_2 doseže 40 %, prezračevanje in mešanje ponovno uravnamo na želene proučevane vrednosti. Če je hitrost dovajanja kisika večja od hitrosti njegove porabe, začne pO_2 naraščati. Spreminjanje pO_2 v brozgi ponazarja slika 13.

Eksperiment izvedemo pri kombinacijah parametrov, prikazanih v tabeli 2.

Tabela 2: Prikaz eksperimentalnih razmer pri dinamični metodi z mikroorganizmi

kombinacija parametrov	frekvenca mešanja (min ⁻¹)	pretok zraka (l·min ⁻¹)
1.	100	5,0
2.	100	2,5
3.	200	2,5

3.5 Meritve, izračuni in rezultati

3.5.1 Meritve

Grafični prikazi

pO_2 (v %) v odvisnosti od časa za razplinjevalno metodo in dinamično metodo z mikroorganizmi – na grafih so označeni različne eksperimentalne razmere.

3.5.2 Izračuni

Volumenski koeficienti snovnega prestopa kisika ($k_L \cdot a$) pri različnih frekvencah mešanja in pretokih zraka, določeni z razplinjevalno metodo in dinamično metodo z mikroorganizmi (izračun $k_L \cdot a$ je predstavljen v točki 3.1.4) – izračuni vključujejo tudi grafične prikaze (sliki 13 in 14).

3.5.3 Predstavitev rezultatov

Tabelarični prikazi:

- $k_L \cdot a$ pri različnih frekvencah mešanja in pretokih zraka, določeni z razplinjevalno metodo
- $k_L \cdot a$ pri različnih frekvencah mešanja in pretokih zraka, določeni z dinamično metodo z mikroorganizmi

4 SIMULACIJA BIOPROCESA Z NEPRESTANIM POLNJENJEM IN PRAZNJENJEM (ODPRT BIOPROCES)

4.1 Teoretične osnove

V **bioprocusu z neprestanim polnjenjem in praznjenjem** (odprt, kontinuirni bioproces) bioreaktor obratuje z določenim pretokom medija v bioreaktor in bioprocen brozge iz njega. Če je vsebina bioreaktorja dobro premešana, ima izstopni tok iz bioreaktorja enako sestavo kot bioprocenska brozga v bioreaktorju. Če so torej v bioproceni brozgi suspendirane celice ali encimi, se ti kontinuirno odstranjujejo iz bioreaktorja. V primeru encimov kot katalizatorjev to pomeni težavo, saj encimi v reakcijah ne nastajajo. Rešitev je uporaba imobiliziranih encimov, ki ostanejo v bioreaktorju. Ko pa kultiviramo celice, se iz bioreaktorja izločene celice nadomestijo z novonastalimi.

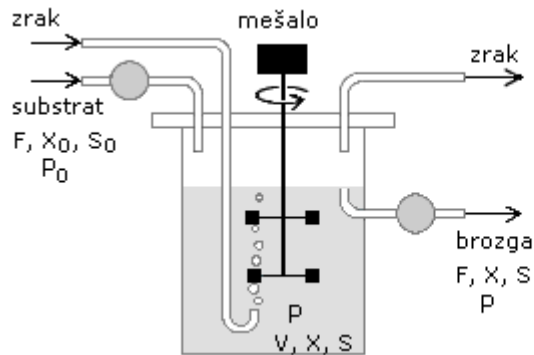
Mešalne bioreaktorje z neprestanim polnjenjem in praznjenjem (odprte, kontinuirne bioreaktorje) navadno imenujemo CSTR (»continuous stirred-tank reactor«).

Običajno bioproces z neprestanim polnjenjem in praznjenjem začnemo kot bioproces z enkratnim polnjenjem (zaprt, šaržni bioproces) in po pridobitvi ustrezne količine biomase nadaljujemo s kontinuirnim obratovanjem. Po določenem času, ki je odvisen od zadrževalnega časa ($\tau = \frac{1}{D}$; h), dosežemo stacionarno stanje (ustaljeno stanje, »steady state«), v katerem se nobena lastnost sistema s časom ne spreminja, torej ni spremembe mase v sistemu ($\frac{dm}{dt} = 0$).

Stacionarno stanje lahko dosežemo na več načinov:

- V **kemostatu** sta vstopni (F_v) in izstopni (F_{iz}) tok enaka in na tak način vzdržujemo konstanten volumen tekočine v bioreaktorju. Prav tako je konstantno razmerje $\frac{F}{V} = D$ (h^{-1}), tako imenovana hitrost razredčevanja (redčenja). Koncentracije snovi v bioreaktorju se prilagodijo nastavljeni hitrosti razredčevanja in čez čas se vzpostavi stacionarno stanje. Hitrost nadomeščanja porabljenega substrata s svežim je enaka specifični hitrosti rasti mikroorganizmov – navadno biokulturo vzdržujemo v eksponentni fazi rasti. V laboratorijskem merilu je to idealen način za študij kinetike bioprocsov, saj lahko procesne spremenljivke proučujemo v odvisnosti od hitrosti razredčevanja in s tem rasti mikroorganizma.
- Tudi v **turbidostatu** vzdržujemo konstanten volumen tekočine, tako da nastavimo enaka pretoka na vstopu in izstopu iz bioreaktorja. Vendar pa hitrost razredčevanja (D), in s tem oba pretoka (F_v in F_{iz}), ni konstantna, ampak se prilagaja (spreminja) glede na nastavljeno koncentracijo biomase. Ker je spremljanje in kontrola teh sistemov dokaj kompleksna, se turbidostati ne uporabljajo v večjem merilu.
- **Auksostat** (nutristat, nustat) je sistem, v katerem nastavimo vrednost določenega parametra, denimo pH , pO_2 , koncentracijo etanola ipd. Glede na nastavljeno vrednost se spreminjata vtok in iztok, torej hitrost razredčevanja (D) ni konstantna. Takšne bioreaktorske sisteme imenujemo pH -auksostat, pO_2 -auksostat ipd.

V nadaljevanju bomo obravnavali le kemostat, pri katerem sta vtok (F_v) in iztok (F_{iz}) enaka ($F_v = F_{iz} = F$; $m^3 \cdot h^{-1}$), v vstopnem toku je le substrat s koncentracijo S_0 , v izstopnem toku pa nastala biomasa, neporabljen substrat in nastali produkt, torej bioprocesna brozga. Takšen primer kemostata je prikazan na sliki 16.



Slika 16. Shematski prikaz bioreaktorja z neprestanim polnjenjem in praznjenjem – kemostat (prirejeno po <http://content.answers.com/main/content/img/McGrawHill/Encyclopedia/images/CE128700FG0010.gif>)

Ob predpostavki, da je brozga v bioreaktorju popolnoma pomešana, lahko zapišemo enačbe masne bilance za katero koli komponento, ki zapuša meje sistema (bioreaktorsko posodo).

Masno bilanco za biomaso (X) v stacionarnem stanju zapišemo kot:

$$F \cdot X_0 - F \cdot X + \mu \cdot X \cdot V - k_D \cdot X \cdot V = 0 \quad (37)$$

pri čemer je μ specifična hitrost rasti (h^{-1}), k_D pa konstanta odmiranja oziroma specifična hitrost odmiranja (h^{-1}).

Navadno je napajalni tok sterilen in dovajamo le limitni substrat, zato je $X_0 = 0$. Poleg tega lahko zanemarimo odmiranje celic, saj je kultura v eksponentni fazi rasti, torej je $k_D \ll \mu$. Enačba se tako glasi:

$$\mu \cdot X \cdot V = F \cdot X \quad (38)$$

Če enačbo (38) delimo z X in z V ter upoštevamo, da je $\frac{F}{V} = D$, dobimo naslednji izraz:

$$\mu = D \quad (39)$$

Specifična hitrost rasti mikroorganizmov v kemostatu je torej enaka hitrosti razredčevanja, ali drugače: celice se razmnožujejo z enako hitrostjo, kot jim dovajamo limitni substrat.

Enačbo (39) lahko vstavimo v Monodov izraz, ki opisuje odvisnost specifične hitrosti rasti mikroorganizmov (μ) od koncentracije limitnega substrata (S), in se glasi:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \quad (40)$$

K_S v enačbi (40) je konstanta zasičenja, ki pomeni tisto koncentracijo limitnega substrata ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), pri kateri je specifična hitrost rasti enaka polovici maksimalne specifične hitrosti rasti ($\mu_{\max}$).

Dobimo enačbo, ki velja za koncentracijo limitnega substrata v kemostatu v stacionarnem stanju:

$$S = \frac{D \cdot K_S}{\mu_{\max} - D} \quad (41)$$

Masno bilanco za limitni substrat (S) v stacionarnem stanju pa zapišemo kot:

$$F \cdot S_0 - F \cdot S - \frac{\mu \cdot X \cdot V}{Y_{XS}} - m_S \cdot X \cdot V - \frac{q_P \cdot X \cdot V}{Y_{PS}} = 0 \quad (42)$$

pri čemer je Y_{XS} izkoristek substrata za proizvodnjo biomase, m_S je koeficient vzdrževanja oziroma specifična hitrost porabe substrata za vzdrževanje (h^{-1}), q_P je specifična hitrost nastanka produkta P (h^{-1}), Y_{PS} pa izkoristek substrata za nastanek produkta P .

Celotno enačbo delimo z V , upoštevamo, da je $\frac{F}{V} = D$ in μ zamenjamo z D ($\mu = D$). Tako dobimo izraz za koncentracijo biomase v kemostatu v stacionarnem stanju:

$$X = \frac{D(S_0 - S)}{\frac{D}{Y_{XS}} + m_S + \frac{q_P}{Y_{PS}}} \quad (43)$$

Zapis (43) lahko še poenostavimo, če upoštevamo, da se drugi produkti ne sintetizirajo, torej nastaja le biomasa ($\frac{q_P}{Y_{PS}} = 0$).

Poleg tega zanemarimo vzdrževanje, saj je poraba substrata za rast in razmnoževanje mikroorganizmov v eksponentni fazi rasti mnogo večja od porabe substrata za vzdrževanje ($m_S = 0$).

Ob upoštevanju obeh predpostavk ima enačba (43) tako naslednjo obliko:

$$X = Y_{XS}(S_0 - S) \quad (44)$$

Nazadnje lahko v enačbo (44) vstavimo še izraz (41) in dobimo končni zapis za koncentracijo biomase v stacionarnem stanju:

$$X = Y_{XS} \left(S_0 - \frac{D \cdot K_S}{\mu_{\max} - D} \right) \quad (45)$$

Za kateri koli produkt bioprocesa (P) predstavimo masno bilanco kot:

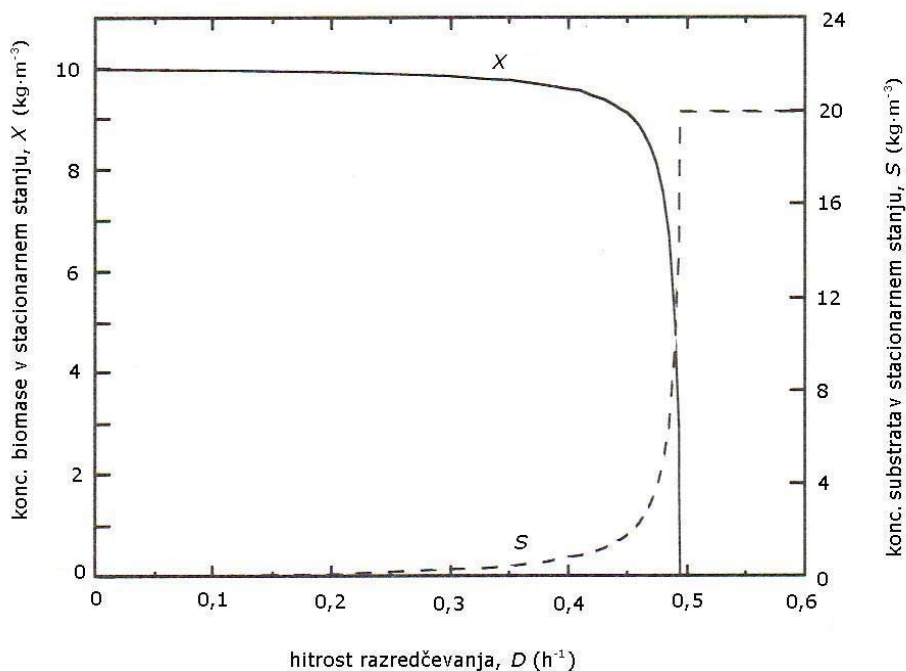
$$F \cdot P_0 - F \cdot P + q_P \cdot X \cdot V = 0 \quad (46)$$

pri čemer je P_0 koncentracija produkta v vstopnem toku v bioreaktor.

Če enačbo delimo z V , upoštevamo, da je $\frac{F}{V} = D$, delimo še z D in jo preuredimo, dobimo izraz za koncentracijo produkta v kemostatu v stacionarnem stanju:

$$P = P_0 + \frac{q_P \cdot X}{D} \quad (47)$$

V najenostavnejšem bioprocesu z neprestanim polnjenjem in praznjenjem nastaja le mikrobn biomasa, drugi produkti se ne sintetizirajo, prav tako zanemarimo vzdrževanje. V tem primeru veljata enačbi (41) in (45), ki ju grafično predstavimo tako, kot prikazuje slika 17.



Slika 17. Koncentraciji biomase in substrata v odvisnosti od hitrosti razredčevanja v stacionarnem stanju v kemostatu. Pri izračunu podatkov za izris krivulj so bili upoštevani naslednji parametri: $\mu_{\max} = 0,5 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 0,2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $Y_{XS} = 0,5 \text{ kg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $S_0 = 20 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (prirejeno po Doran, 1995)

Pri majhnih hitrostih razredčevanja ($D \rightarrow 0$) se v stacionarnem stanju porabi skoraj ves substrat, zato iz enačbe (44) sledi, da je $X \approx Y_{XS} \cdot S_0$.

Z naraščanjem D počasi narašča tudi S , ko se D bliža $\mu_{\max}$, pa S hitreje narašča. Skladno s tem X pada ($X \rightarrow 0$), ko gre $D \rightarrow \mu_{\max}$. Stanje pri zelo velikih hitrostih razredčevanja ($D \approx \mu_{\max}$), ko je $X = 0$, imenujemo **izpiranje**. Do izpiranja celic iz bioreaktorja pride torej takrat, ko je hitrost odstranitve celic z izstopnim tokom iz bioreaktorja večja od hitrosti nastajanja celic (hitrosti rasti). Hitrost razredčevanja, pri kateri pride do izpiranja,

imenujemo **kritična hitrost razredčevanja** (D_{kr} ; h^{-1}). Izračunamo jo tako, da v enačbo (45) vstavimo $X = 0$ in dobimo naslednji izraz:

$$D_{kr} = \frac{\mu_{\max} \cdot S_0}{K_S + S_0} \quad (48)$$

V večini primerov je $K_S \ll S_0$, tako sledi, da je $D_{kr} \approx \mu_{\max}$.

Hitrost razredčevanja, pri kateri obratuje kemostat, mora biti torej manjša od kritične hitrosti razredčevanja, da se izognemo izpiranju celic iz bioreaktorja. Okoli D_{kr} je sistem zelo občutljiv, saj že najmanjše spremembe D povzročijo relativno velike spremembe X in S .

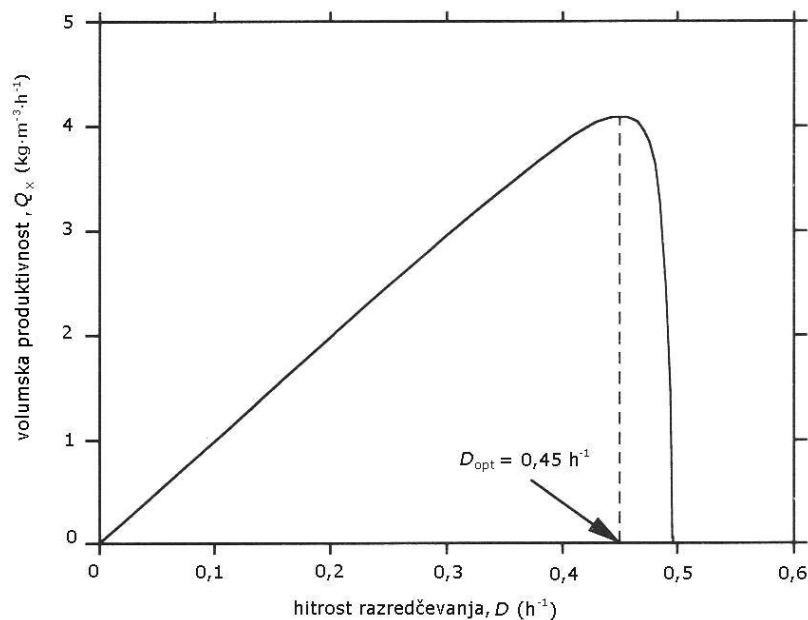
Hitrost proizvodnje biomase v CSTR je enaka hitrosti, s katero celice zapuščajo bioreaktor, tj. $F \cdot X$. **Volumenska produktivnost** oziroma volumenska hitrost proizvodnje biomase (Q_X ; $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) je torej enaka:

$$Q_X = \frac{F \cdot X}{V} = D \cdot X \quad (49)$$

V izraz (49) vnesemo enačbo (45) in dobimo naslednji zapis:

$$Q_X = D \cdot Y_{XS} \left(S_0 - \frac{D \cdot K_S}{\mu_{\max} - D} \right) \quad (50)$$

Povezavo med Q_X in D iz enačbe (50) lahko predstavimo grafično, kot je prikazano na sliki 18.



Slika 18. Volumenska produktivnost kot funkcija hitrosti razredčevanja v stacionarnem stanju v kemostatu. Pri izračunu podatkov za izris krivulje so bili upoštevani naslednji parametri: $\mu_{\max} = 0,5 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 0,2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $Y_{XS} = 0,5 \text{ kg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $S_0 = 20 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (prirejeno po Doran, 1995)

Iz slike 18 je razvidno, da je hitrost nastanka biomase maksimalna pri **optimalni hitrosti razredčevanja** (D_{opt} ; h^{-1}). Pri D_{opt} je torej naklon krivulje $\frac{dQ_x}{dD} = 0$. Tako izpeljemo iz enačbe (50) izraz za D_{opt} :

$$D_{\text{opt}} = \mu_{\max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + S_0}} \right) \quad (51)$$

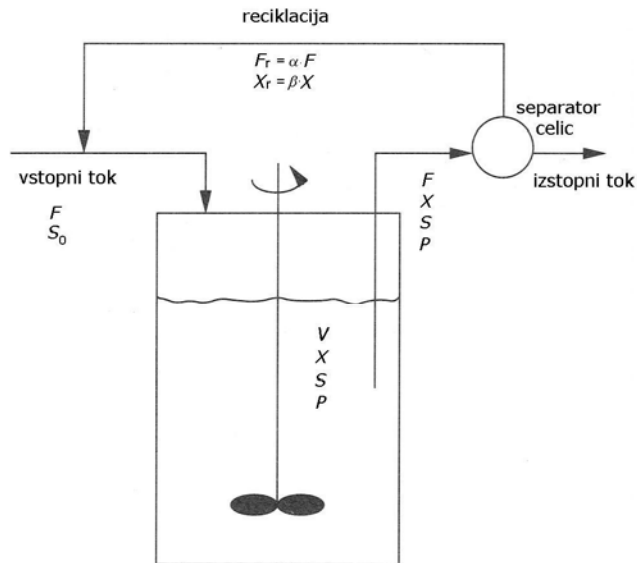
Ker je D_{opt} zelo blizu D_{kr} , kemostat navadno obratuje pri hitrosti razredčevanja, ki je še nekoliko manjša od D_{opt} .

Koncentracijo celic v kemostatu lahko povečamo tudi z recikliranjem biomase iz nastale bioprocesne brozge. Takšen bioreaktorski sistem imenujemo **kemostat s povratnim tokom (z reciklacijo)**.

Biomaso lahko recikliramo na več načinov, najpogostejša sta:

- Z usedalnikom ali centrifugo zunaj bioreaktorja skoncentriramo biomaso oziroma ločimo celice od tekočega dela bioprocesne brozge, nato pa del biomase kontinuirno vračamo nazaj v bioreaktor (slika 19). Takšni sistemi lahko obratujejo v stacionarnem stanju. Najpogosteje se uporabljajo za biološko čiščenje odpadnih vod.
- Celice zadržimo v bioreaktorju, tako da iz bioreaktorja teče brozga z manjšo koncentracijo celic. To naredimo z uporabo posebnih mehanskih naprav, denimo

filtrirani. Takšni sistemi (perfuzijski bioreaktorji) se pogosto uporabljajo pri gojenju sesalskih celic.



Slika 19. Shema mešalnega bioreaktorja z neprestanim polnjenjem in praznjenjem z zunanjo zanko za reciklacijo (prirejeno po Doran, 1995)

Z reciklacijo biomase dosežemo večje hitrosti porabe substrata ter večje količine nastalega produkta. Poleg tega lahko uporabimo večje hitrosti razredčevanja ($D > \mu_{\max}$), saj je D_{kr} , pri kateri pride do izpiranja, večja kot v običajnem kemostatu. Kolikšen delež biomase recikliramo, nam pove **reciklacijsko razmerje (reciklacijski faktor, koeficient reciklacije, separacijska konstanta) α** :

$$\alpha = \frac{F_r}{F} \quad (52)$$

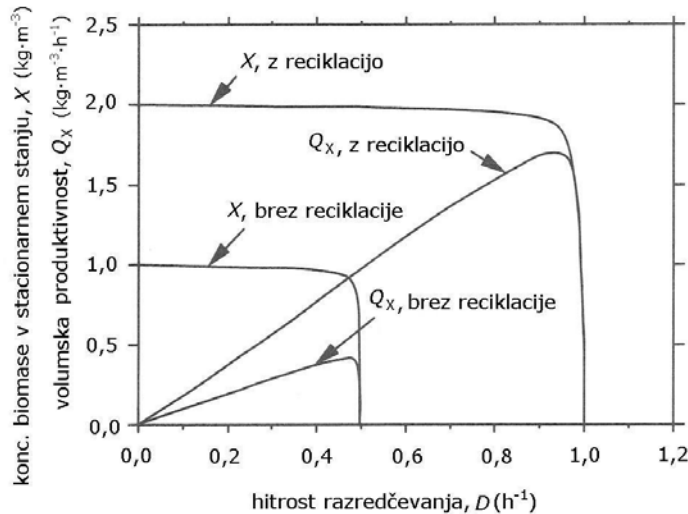
β pa je **koncentracijski faktor za biomaso**:

$$\beta = \frac{X_r}{X} \quad (53)$$

F_r je pretok reciklacijskega toka v bioreaktor, X_r pa koncentracija biomase v reciklacijskem toku.

Z upoštevanjem enačb (52) in (53) lahko zaključimo, da se kritična hitrost razredčevanja v kemostatu z zunanjo zanko za reciklacijo v primerjavi z običajnim kemostatom poveča za faktor $\frac{1}{1 + \alpha - \alpha \cdot \beta}$.

Tipične razlike med kemostatoma brez reciklacije in z njim v poteku značilnih parametrov bioprocesa (X , S , Q_X) prikazuje slika 20.



Slika 20. Koncentraciji biomase in substrata v odvisnosti od hitrosti razredčevanja v stacionarnem stanju v kemostatu brez reciklacije in z njo. Pri izračunu podatkov za izris krivulj so bili upoštevani naslednji parametri: $\mu_{\max} = 0,5 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 0,01 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $Y_{XS} = 0,5 \text{ kg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $S_0 = 2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $\alpha = 0,5$, $\beta = 2,0$. (prirejeno po Doran, 1995)

4.2 Naloga

Simulacija bioprocesa z neprestanim polnjenjem in praznjenjem z uporabo računalniškega programa SIMKE. Od 5 vhodnih parametrov ($\mu_{\max}$, K_S , Y_{XS} , S_0 , M oziroma m_S) spreminjamo enega in spremljamo potek značilnih parametrov bioprocesa z neprestanim polnjenjem in praznjenjem – X , S , Q_X . V bioprocesu z reciklacijo spreminjamo reciklacijsko razmerje α .

4.3 Potreben material

4.3.1 Aparature in oprema

Računalnik z računalniškim programom SIMKE.

4.4 Potek vaje

4.4.1 Kemostat brez reciklacije

- Po zagonu programa SIMKE izberemo simulacijo kemostata brez reciklacije biomase in možnost »trije grafi«.

- Vhodne parametre bioprocesa določimo na naslednjih območjih:
 $\mu_{\max} = 0,1-1,4 \text{ h}^{-1}$
 $K_S = 0,2-5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$
 $Y_{XS} = 0,2-0,8 \text{ kg}\cdot\text{kg}^{-1}$
 $S_0 = 1-500 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$
 $M(m_S) = 0,001-0,2$.
 Spreminjamo enega od parametrov, tako da izberemo 3 različne vrednosti. Drugi pogoji (parametri) ostanejo nespremenjeni.
- Na osnovi primerjave grafičnih izpisov določimo vpliv spreminjanja posameznih vhodnih parametrov na koncentraciji biomase in limitnega substrata v stacionarnem stanju, volumensko produktivnost in stabilnost sistema (točka izpiranja).

4.4.2 Kemostat z reciklacijo

- Izberemo simulacijo kemostata z reciklacijo biomase in možnost »trije grafi«.
- Vhodne parametre bioprocesa določimo na naslednjih območjih:
 $\mu_{\max} = 0,1-1,4 \text{ h}^{-1}$
 $K_S = 0,2-5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$
 $Y_{XS} = 0,2-0,8 \text{ kg}\cdot\text{kg}^{-1}$
 $S_0 = 1-500 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$
 $M(m_S) = 0,001-0,2$
 $r(\alpha) = 0-1$.
 Spreminjamo le reciklacijski faktor r , tako da izberemo 3 različne vrednosti.
- Na osnovi primerjave grafičnih izpisov določimo vpliv spreminjanja reciklacijskega faktorja r na koncentraciji biomase in limitnega substrata v stacionarnem stanju, volumensko produktivnost in stabilnost sistema (točka izpiranja).

4.5 Meritve, izračuni in rezultati

4.5.1 Predstavitev rezultatov

Grafični prikazi

Odvisnost osnovnih kinetičnih parametrov bioprocesa z neprestanim polnjenjem in praznjenjem (X , S , Q_X) od hitrosti razredčevanja (D) za:

- bioprocese brez reciklacije (spreminjanje $\mu_{\max}$, K_S , Y_{XS} , S_0 , M oziroma m_S)
- bioprocese z reciklacijo (spreminjanje r)

4.5.2 Komentar

Rezultate (grafične prikaze pod točko 4.5.1) komentiramo: kako in predvsem zakaj se potek osnovnih parametrov bioprocesa z neprestanim polnjenjem in praznjenjem spremeni, če spreminjamo posamezne vhodne parametre.

5 RAČUNSKE NALOGE

1. V aerobnem submerznem bioprocesu z enkratnim polnjenjem poteka kultura kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Med bioprocesom spremljamo koncentracijo kvasnih celic s štetjem pod mikroskopom in dobimo naslednje rezultate:

Čas (h)	0	4	8	12	16	20
N (celic·ml ⁻¹)	$3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$

- a) Izračunajte maksimalno specifično hitrost rasti in generacijski čas kvasovk.
 b) Kolikšni sta produktivnost bioprocesa in produktivnost sistema, če bioproces teče 20 ur, čas, potreben za pripravljalne postopke in pobiranje pridelka, pa je 1,5 ure?
2. S stiskanjem grozdja ste pridobili mošt, ki vsebuje $5 \cdot 10^3$ celic·ml⁻¹ avtohtonih kvasovk, katerih povprečni generacijski čas v danih razmerah je 10 ur. Ker je njihova vrelna sposobnost slaba, izvedemo inokulacijo s selekcioniranimi kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae*, ki imajo generacijski čas 8 ur, namnožili pa smo jih do koncentracije $1 \cdot 10^5$ celic·ml⁻¹.
- Določite volumen inokuluma selekcioniranih kvasovk, če bo fermentacija potekala v bioreaktorju z volumnom 20 m³. Upoštevajte, da želimo po 4 dneh fermentacije 90 % dominacijo selekcioniranih kvasovk.
3. S kultivacijo kvasovke *Candida utilis* v aerobnem submerznem bioprocesu želimo pridobiti kvasno biomaso, uporabno kot proteinski dodatek krmi. Kot gojišče uporabljamo odpadno brozgo, ki vsebuje 120 g·l⁻¹ snovi, ki jih kvasovka lahko izkorišča kot vir ogljika. Bioproces poteka v bioreaktorju z delovnim volumnom 10 m³. Inokulum pripravimo v pilotnem bioreaktorju z delovnim volumnom 500 l, kjer dosežemo koncentracijo kvasne biomase 50 g·l⁻¹.
- a) Izračunajte končno koncentracijo in skupni pridelek kvasne biomase v velikem bioreaktorju, če bioproces poteka 12 ur, čas podvojevanja biokulture v danih razmerah pa je 3 ure.
 b) Kolikšna je koncentracija neizkoriščenih organskih snovi v brozgi, če je izkoristek pretvorbe substrata v biomaso 0,45?
 c) Ali je oskrba s kisikom zadovoljiva, če je dosežena koncentracija raztopljenega kisika v brozgi 0,02 mmol·l⁻¹, c_L^* v danih razmerah je 0,2 mmol·l⁻¹, $k_L a$ je 180 h⁻¹, specifična hitrost respiracije pa 0,8 mmol·g⁻¹·h⁻¹?
4. Melaso, ki je stranski produkt pri proizvodnji sladkorja, želimo uporabiti kot surovino (vir C in energije) za biotehnoško proizvodnjo tehničnega etanola s kvasovkami.

Izračunajte potrebno količino melase, ki vsebuje 40 % saharoze, za dnevno proizvodnjo 10 m³ 96 vol % etanola, če je dejanski izkoristek bioprocesa 90 %.

5. Za biotehnološko proizvodnjo etanola s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* smo izbrali anaerobni bioproces z neprestanim polnjenjem in praznjenjem (kemostat).
- a) Produktivnost bioprocesa glede na biomaso je $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pri hitrosti razredčevanja $0,10 \text{ h}^{-1}$. Izračunajte porabljeno količino substrata za tvorbo biomase, če znaša izkoristek pretvorbe substrata v biomaso 0,20. Koncentracija limitnega substrata v napajalnem toku je $90 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.
 - b) Izračunajte koncentracijo etanola v izhodni brozgi, če se preostali sladkor porabi za tvorbo etanola in je izkoristek pretvorbe substrata v etanol 0,45.

Priloga 1: SEZNAM SIMBOLOV

simbol	pomen	enota
r_x	hitrost rasti mikroorganizmov	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$
X	koncentracija biomase	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
μ	specifična hitrost rasti	h^{-1}
$\mu_{\max}$	maksimalna specifična hitrost rasti	h^{-1}
t	čas	h
X_0	začetna koncentracija biomase	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
t_d	čas podvojevanja, delitveni čas, generacijski čas	h
S	koncentracija limitnega substrata	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
K_S	konstanta nasičenja (zasičenja)	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
β	specifična hitrost odmiranja	h^{-1}
r_S	hitrost porabe substrata	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$
m_S	koeficient vzdrževanja vzdrževanja (specifična hitrost porabe substrata za vzdrževanje)	$\text{kg}_{\text{substrata}} \cdot \text{kg}_{\text{biomase}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Y_{XS}	izkoristek substrata za nastanek biomase	$\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$
P	produktivnost	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$
P_X	produktivnost bioprocasa za biomaso kot produkt	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$
t_1	čas potreben za pripravljalne postopke	h
t_2	čas potreben za zaključne postopke	h
$P_{X\text{sistema}}$	produktivnost sistema za biomaso kot produkt	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$
T	temperatura	$^{\circ}\text{C}$
T_{650}	transmitanca (propustnost) pri valovni dolžini 650 nm	$\%$
N	koncentracija celic	$\text{celic} \cdot \text{ml}^{-1}$
$\log N$	desetiški logaritem koncentracije celic	-
pH		-
C_{glukoze}	koncentracija glukoze	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
A_{540}	absorbanca pri valovni dolžini 540 nm	-
Y_{EtOHs}	izkoristek substrata za nastanek etanola	$\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$
P_{EtOH}	produktivnost bioprocasa za etanol kot produkt	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$
AA	amilolitična aktivnost	-
A_{600}	absorbanca pri valovni dolžini 600 nm	-
$C_{\text{Vz.}}$	koncentracija škroba v vzorcu (nerazgrajen škrob)	$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
$C_{\text{sl. vz.}}$	koncentracija škroba v slepem vzorcu (celokupni škrob)	$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
ΔC	koncentracija razgrajenega škroba	$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
$C_{\text{škroba}}$	koncentracija škroba	$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
R	redčitev	-
C_{AL}	koncentracija komponente A v tekočini	$\text{g ali mol} \cdot \text{m}^{-3}$

C_{ALI}	koncentracija komponente A na fazni meji	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
C_{AG}	koncentracija komponente A v plinu	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
C_{AGi}	koncentracija komponente A na fazni meji	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
N_A	snovni tok (fluks) komponente A	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
N_{AG}	snovni tok (fluks) komponente A skozi plast plina	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
N_{AL}	snovni tok (fluks) komponente A skozi plast tekočine	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
k_G	koeficient snovnega prestopa (snovna prestopnost) v plinski fazi	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
k_L	snovna prestopnost v tekočini	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
a	medfazna površina	$\text{m}^2\cdot\text{m}^{-3}$
m	porazdelitveni (distribucijski) faktor	-
$K_G\cdot a$	snovna prehodnost v plinski fazi	s^{-1}
$K_L\cdot a$	snovna prehodnost v tekočini	s^{-1}
$k_L\cdot a$	volumenski koeficient snovnega prestopa	s^{-1}
C_{AG}^*	ravnotežna koncentracija (topnost) komponente A v plinu	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
C_{AL}^*	ravnotežna koncentracija (topnost) komponente A v tekočini	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
p_{AG}	parcialni tlak komponente A v plinu	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
He	Henryjeva konstanta	-
q_O	specifična hitrost porabe kisika	$\text{mol O}_2\cdot\text{g}_{\text{biomase}}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
C_{kr}	kritična koncentracija raztopljenega kisika	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
Q_O	hitrost porabe kisika na volumsko enoto brozge	$\text{mol O}_2\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
$X_{\max}$	maksimalna koncentracija biomase	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
$(k_L\cdot a)_{kr}$	minimalni oz. kritični $k_L\cdot a$	s^{-1}
p_{O_2}	parcialni tlak kisika	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
$\bar{C}_{AL}$	ravnotežne koncentracije raztopljenega kisika	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
V_d	delovni volumen bioreaktorja	m^3, dm^3
τ	zadrževalni čas	h
D	hitrost razredčevanja (redčenja)	h^{-1}
m	masa	kg
m	porazdelitveni (distribucijski) faktor	-
F	pretok	$\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$
F_v	vstopni (pre)tok	$\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$
F_{iz}	izstopni (pre)tok	$\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$
V	volumen	m^3
k_D	konstanta odmiranja oz. specifična hitrost odmiranja	h^{-1}
S	koncentracija limitnega substrata	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
q_P	specifična hitrost nastanka produkta P	h^{-1}
Y_{PS}	izkoristek substrata za nastanek produkta P	$\text{kg}\cdot\text{kg}^{-1}$
P_0	koncentracija produkta v vstopnem toku v bioreaktor	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$

P	koncentracija produkta	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
D_{kr}	kritična hitrost razredčevanja (redčenja)	h^{-1}
Q_x	volumenska produktivnost	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$
D_{opt}	optimalna hitrost razredčevanja (redčenja)	h^{-1}
α	reciklacijsko razmerje, reciklacijski faktor, koeficient reciklacije, separacijska konstanta	-
r	reciklacijsko razmerje, reciklacijski faktor, koeficient reciklacije, separacijska konstanta	-
β	koncentracijski faktor za biomaso	-
F_r	pretok reciklacijskega toka (?)	$\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$
X_r	koncentracija biomase v reciklacijskem toku (?)	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$

Priloga 2: GOJIŠČA

Priloga 2.1. Sintetično kompleksno gojišče za kvasovke (Vaja 1)

kvasni ekstrakt	4 g
baktopepton	4 g
glukoza	A-20, B-50, C-100, D-150, E-200 g
destilirana voda	do 1000 ml

Priloga 2.2. Sladni agar z dodatkom škroba (SAŠ) (Vaja 2)

kvasni ekstrakt	4 g
glukoza	4 g
sladni ekstrakt	30 g
škrob	5 g
agar	20 g
destilirana voda	do 1000 ml

Priloga 2.3. Sestava gojišča za aerobno submerzno kultivacijo kvasovk v bioprocesu z enkratnim polnjenjem (Vaja 3)

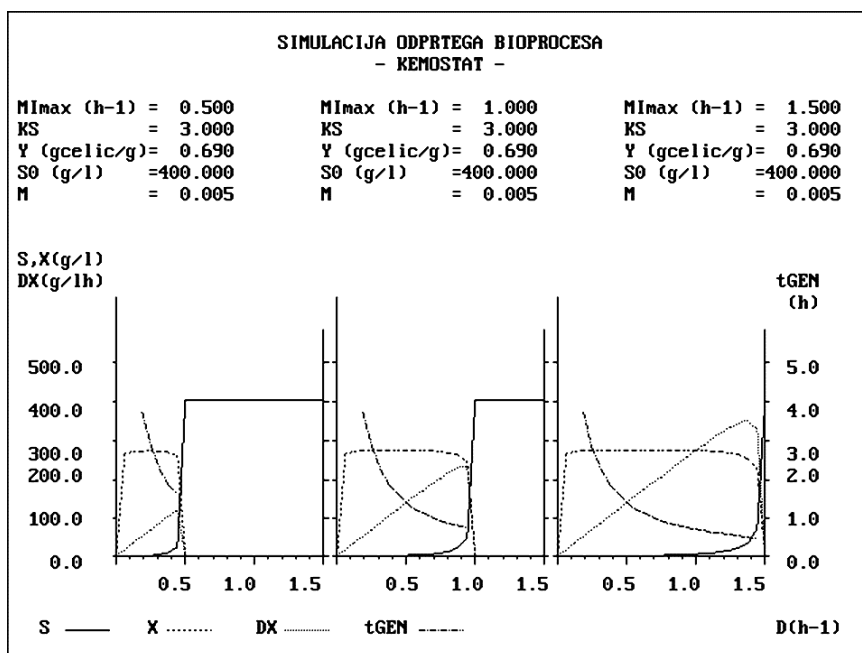
kvasni ekstrakt	5 g
saharoza	10 g
destilirana voda	do 1000 ml

Priloga 3: RAZNO

Priloga 3.1: Topnost kisika v vodi pri različnih temperaturah in parcialnem tlaku kisika

T (°C)	topnost kisika v vodi (kg·m ⁻³)	
	tlak kisika je 1 atm	tlak zraka je 1 atm
0	$7,03 \cdot 10^{-2}$	$1,48 \cdot 10^{-2}$
10	$5,49 \cdot 10^{-2}$	$1,15 \cdot 10^{-2}$
15	$4,95 \cdot 10^{-2}$	$1,04 \cdot 10^{-2}$
20	$4,50 \cdot 10^{-2}$	$9,45 \cdot 10^{-3}$
25	$4,14 \cdot 10^{-2}$	$8,69 \cdot 10^{-3}$
26	$4,07 \cdot 10^{-2}$	$8,55 \cdot 10^{-3}$
27	$4,01 \cdot 10^{-2}$	$8,42 \cdot 10^{-3}$
28	$3,95 \cdot 10^{-2}$	$8,29 \cdot 10^{-3}$
29	$3,89 \cdot 10^{-2}$	$8,17 \cdot 10^{-3}$
30	$3,84 \cdot 10^{-2}$	$8,05 \cdot 10^{-3}$
35	$3,58 \cdot 10^{-2}$	$7,52 \cdot 10^{-3}$
40	$3,37 \cdot 10^{-2}$	$7,07 \cdot 10^{-3}$

Priloga 3.2: Prikaz poteka značilnih parametrov bioprocesa z neprestanim polnjenjem in praznjenjem (X , S , Q_x) v odvisnosti od hitrosti razredčevanja (D) pri različnih $\mu_{\max}$ v računalniškem programu SIMKE



Priloga 4: POROČILO O OPRAVLJENI VAJI

Poročilo o opravljeni vaji pišemo na bele liste formata A4.

Poročilo vsebuje naslednje podatke:

1. Ime in priimek študenta
2. Skupina
3. Datum opravljanja vaje

in je zgrajeno iz naslednjih osnovnih poglavij:

1. Naslov vaje
2. Namen vaje
3. Meritve, izračuni in rezultati
4. Diskusija
5. Literatura

LITERATURA

Proizvodnja kvasne biomase:

- Brand on line catalogue, 2008
http://catalog.brand.de/index.php?encrypt=0&ID_O_TREE_GROUP=88&chapter=88&ID_O_PRODUCT=588&begin=0&sLanguage=English&start_infoblock=1 (julij, 2008).
- Caron, C. Commercial production of baker's yeast and wine yeast. V: Biotechnology, second edition, vol. 9: Enzymes, Biomass, Food and Feed. Reed, G. (ur.), Nagodawithana, T.W. (ur.). Weinheim, VCH:322-351.
- Cimerman, A., Raspor, P. 1992. Mikrobna biomasa. V: Biotehnologija. Raspor, P. (ur.). Ljubljana, BIA: 475-483.
- Connecticut Valley Biological Supply Company, 2009
http://berkeley.edu/news/media/releases/2008/06/02_genomes.shtml
<http://www.connecticutvalleybiological.com/saccharomyces-cerevisiae-plate-p-11262.html?zenid=ccfe82acb820757486f6bbce8bcb6c9f>
<http://www.vulpelab.net/research.html>
- Nagodawithana, T.W. Products and uses of yeast and yeastlike fungi. V: Handbook of applied mycology, vol. 3: Foods and feeds. Arora, D.K. (ur.), Mukerji, K.G. (ur.), Marth, E.H. (ur.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 553-603.
- PAŠ, M. 2000. Vključevanje Cr(III) in Cr(VI) zvrsti v celično zgradbo kvasovke: doktorska disertacija, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, 106.
- Paš, M., Piškur, B., Šuštarčič, M., Raspor, P. 2007. Iron enriched yeast biomass - a promising mineral feed supplement. Bioresource Technology, 98, 8: 1622-1628.
- Plummer, D.T. 1987. An introduction to practical biochemistry. London, McGraw-Hill Book Company.
- Raspor, P. (ur.) 1996. Biotehnologija, osnovna znanja. Ljubljana, BIA: 459-473.
- Raspor, P., Smole-Možina, S. 1993. Praktikum iz biotehnologije. Ljubljana, BIA: 109-115.
- The Vulpe Lab, 2009
- UC Berkeley News, 2008
- Žnidaršič, P., Pavko, A. 2002. Praktikum iz biokemijskega inženirstva. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani: 14-29.

Proizvodnja amilaz s plesnijo *Aspergillus oryzae*:

- Mitchell, D. A., Berovič, M., Krieger, N. 2000. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing, V: New products and new areas of bioprocess engineering, vol. 68: Advances in biochemical engineering biotechnology, Scheper, T. (ur.). Berlin/Heidelberg, Springer: 61-138.
- Prosser, J. I. 1995. Kinetics of filamentous growth and branching. V: The growing fungus. Gow, N. A. R., Gadd, G. M. (ur.). London, Chapman & Hall: 301-318.
- Raspor, P., Smole-Možina, S. 1993. Praktikum iz biotehnologije. Ljubljana, BIA: 109-115.
- Raspor, P., Kovač, B. 1996. Bioreaktorji s trdnimi gojišči. V: Biotehnologija, osnovna znanja. Raspor, P. (ur.). Ljubljana, BIA: 459-473.
- Ravi-Kumar, K., Umesh-Kumar, S. 2006. Bioprocessing of starch using enzyme technology. V: Food biotechnology. Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R. E. (ur.). Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group: 709-722.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., Filtenborg, O. 2000. Introduction of food- and airborne fungi, Sixth edition. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 81.

Prenos kisika – določitev $k_L a$:

Doran, P. M. 1995. Bioprocess engineering principles. London, Academic Press Limited: 196-213.

Raspor, P., Smole-Možina, S. 1993. Praktikum iz biotehnologije. Ljubljana, BIA: 109-115.

Žnidaršič, P., Pavko, A. 2002. Praktikum iz biokemijskega inženirstva. Ljubljana, fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani: 14-29.

Simulacija bioprocesa z neprestanim polnjenjem in praznjenjem:

Doran, P. M. 1995. Bioprocess engineering principles. London, Academic Press Limited: 196-213.

<http://content.answers.com/main/content/img/McGrawHill/Encyclopedia/images/CE128700FG0010.gif>

Raspor, P., Smole-Možina, S. 1993. Praktikum iz biotehnologije. Ljubljana, BIA: 109-115.

Žnidaršič, P., Pavko, A. 2002. Praktikum iz biokemijskega inženirstva. Ljubljana, fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani: 14-29.