Практическое занятие № 3

Изучение кинетики роста дрожжей при глубинной ферментации

Цель работы: изучить кинетику роста дрожжей при глубинном культивировании.

Задачи:

1. Провести периодический процесс культивирования дрожжей рода *Saccharomyces* на синтетической среде с использованием глюкозы или сахарозы в качестве источника углерода и энергии.

2. По результатам эксперимента вычислить основные технологические характеристики периодического процесса глубинной ферментации дрожжей.

Методические указания

Ферментация является определяющей стадией в биотехнологических производствах, в течение которой микроорганизмы растут и размножаются, обеспечивая накопление биомассы продуцента и биологически ценных метаболитов в культуральной жидкости.

1. Основные этапы выращивания микроорганизмов

1. Приготовление питательной среды, посуды, оборудования и инструментов.

2. Стерилизация питательной среды.

3. Выращивание микроорганизмов (получение инокулята) на жидкой питательной среде.

4. Выращивание посевного материала на плотной питательной среде (внесение инокулята на питательную среду).

5. Выращивание микроорганизмов в ферментаторе.

6. Получение готового продукта – белково-витаминного концентрата.

К наиболее важным технологическим факторам биотехнологического производства относятся конверсия сырья, производительность производства и концентрация получаемого продукта. В любом микробиологическом

процессе ключевую роль играет культура используемых микроорганизмов. В биотехнологии широко применяются плесневые грибы, дрожжи, актиномицеты, бактерии и водоросли в виде чистых или смешанных культур. В традиционных процессах ферментации предпочтение обычно отдается смешанным культурам, а в большинстве современных ферментационных процессов – монокультурам, выращиваемым в асептических условиях.

При *подборе* культуры микроорганизмов для промышленного производства наиболее важными являются следующие микробиологические факторы:

- способность синтезировать целевой продукт (экономический коэффициенты выхода продукта или продуктов);
- высокая скорость роста и/или скорости получения конечного продукта;
- сродство культуры-продуцента к углеродным и энергетическим субстратам;
- стабильность и неприхотливость культуры продуцента (устойчивость к заражению посторонней микрофлорой).

Для *выращивания* любой культуры необходимы: жизнеспособный посевной материал, источники энергии и углерода, питательные вещества для синтеза биомассы, отсутствие ингибиторов роста и соответствующие физико-химические условия.

При получении жизнеспособного посевного материала, прежде всего, необходим подбор питательной среды. *Питательная среда* предназначена для накопления, выделения и сохранения микроорганизмов, а так же для получения биомассы и/или ценных продуктов метаболизма. В состав питательной среды должны входить *органогенные элементы* (углерод, водород, кислород, азот), *зольные макроэлементы* (фосфор, сера, железо, калий, кальций, магний) и *микроэлементы* (марганец, хлор, натрий, медь, бор и т.п.), все перечисленные элементы должны входить в среду *в легкоусвояемом для микроорганизмов виде*.

Источниками углерода для гетеротрофных микроорганизмов могут быть углеводы (моносахариды и полисахариды), спирты, органические кислоты, углеводороды и другие соединения природного происхождения. Источниками азота в питательной среде могут быть белки, аминокислоты, соли аммония, нитраты и нитриты, а так же атмосферный азот. В качестве источника кислорода могут выступать различные соединения, но многие микроорганизмы нуждаются в атмосферном кислороде, и могут расти только в его присутствии. Остальные элементы вносятся в среду в виде водорастворимых солей. При выборе сырья для промышленного применения необходимо учитывать не только содержание основных элементов в нем, но и его себестоимость.

Обязательным условием осуществления многих биотехнологических процессов является *работа в асептических условиях*, поэтому решающее значение имеет стерилизация среды, а в случае аэробных процессов – и воздуха. Стерилизация (обеспложивание) – полное уничтожение в стерилизуемом материале как вегетативных, так и покоящихся форм микроорганизмов. Стерильность обеспечивают, обрабатывая стерилизуемый объект *физическими* (температура, облучение, фильтрация) или *химическими средствами*.

В качестве физических средств на практике чаще всего используют влажную и сухую стерилизацию жаром, а так же стерилизацию фильтрованием. Влажной стерилизации подвергают среды и посуду, сухой – посуду и инструменты, стерилизации фильтрованием – воздух и лабильные (не стабильные) среды. Сухая стерилизация менее эффективна, чем влажная. Стерилизацию облучением (УФ-свет) используют для стерилизации воздуха помещений и поверхностей.

Асептические условия можно поддерживать с помощью химических средств, которые используют при стерилизации основного и вспомогательного оборудования. Гибель микроорганизмов способны вызвать химические вещества, которые специфически или неспецифически

связываются с белками, инактивируя определенные группы активных ферментов. К таким неспецифическим веществам относятся хлор, йод, формалин, фенол, а к специфическим – антибиотики, сульфамидные препараты и т.д.

При внесении в стерильную подходящую среду небольшого количества культуры микроорганизмов, они начинают интенсивно расти и размножаться. В результате роста и размножения клеток микроорганизмов в питательной среде увеличивается биомасса. Ее количество можно охарактеризовать по сухой массе клеток на единицу объема (мг/л, г/л), в том случае если клетки имеют примерно одинаковые размеры, то и по числу клеток в единице объема (млн./мл, млрд./мл).

2. Методы контроля микробиологического процесса

Рост и размножение культуры можно определить различными методами:

- центрифугируя или фильтруя культуральную, жидкость через мембранный фильтр и высушивая полученную пасту до постоянной массы;

- нефелометрически, измеряя светопоглощение клеточной суспензии;

- определяя содержание азота в биомассе, полученной из определенного объема питательной среды;

- по интенсивности выделения какого-либо вещества (газа, кислоты и т.п.).

Число клеток в культуральной жидкости определяют:

- микроскопически, прямым подсчетом клеток, используя специальные камеры Горяева, Тома и др.;

- по подсчету выросших колоний в чашках Петри.

3. Рост микроорганизмов и его математическое описание

Существует два способа культивирования популяции микроорганизмов в глубине жидкой среды: периодический и непрерывный.

При периодическом способе культивирования популяции микроорганизмов проходит шесть фаз размножения: лаг-фазу I, переходную фазу II, фазу экспоненциального или ускоренного роста III, фазу замедленного роста IV, стационарную фазу V, фазу отмирания VI (рисунок 3).

Вид кривой роста дрожжей меняется в зависимости от условий культивирования, но последовательность фаз остается той же.

Для характеристики динамики биотехнологического процесса используют кинетические и стехиометрические параметры.

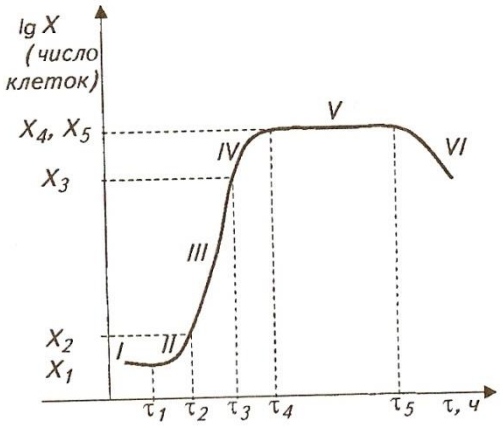


Рисунок 3 - График накопления числа бактериальных клеток при культивировании на питательных средах

Кинетические параметры характеризуют изменение процесса во времени. К ним относятся такие параметры как удельная скорость роста (μ) и метаболитический коэффициент (q). Для характеристики развития культуры микроорганизмов используют скорость роста культуры V (изменение количества биомассы в единицу времени):

$$V = \frac{dX}{dt}.$$

Чтобы определить, с какой скоростью идет прирост биомассы от исходного её количества за определенный промежуток времени используют среднюю скорость роста:

$$V = \frac{x - x_0}{\tau - \tau_0},$$

где x_0, x – количество биомассы в начале и конце культивирования, кг/м^3;

τ_0, τ – начальное и конечное время отсчета, ч.

Если прирост биомассы в единицу времени отнести к одной единице активной биомассы, то удельную скорость роста можно вычислить по формуле:

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{d\tau}.$$

Среднюю удельную скорость роста за период $t_2 - t_1$ при увеличении биомассы на X_2 и X_1 определяют по формуле:

$$\mu_{ср} = \frac{1}{X_{ср}} \cdot \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1}.$$

Скорость потребления определенного субстрата растущими культурами часто описывается метаболитическим коэффициентом:

$$q_s = \frac{1}{S_{ср}} \cdot \frac{S_0 - S_1}{(t_1 - t_0)},$$

где S_0, S_1 – концентрация субстрата в среде в начале и в конце культивирования.

В общем случае метаболитический коэффициент характеризует долю субстрата, используемого для роста определенного количества биомассы за определенный промежуток времени.

Кинетические параметры не дают целостной картины без учета стехиометрических коэффициентов.

Стехиометрические коэффициенты характеризуют соотношение между исходными и конечными продуктами. При любой количественной оценке роста микроорганизмов и/или синтеза конечного продукта необходимо связать *образование микробной биомассы* и продуктов

(конечного продукта) *с расходованием субстра*тов (начального продукта) и питательных веществ. Если количество полученной биомассы обозначить X, а внесенного посевного материала S, то экономический коэффициент (урожай), определяют по формуле:

$$Y_{x/s} = \frac{X_2 - X_1}{S_1 - S_2},$$

где S_2 и S_1 - концентрация субстрата в среде в начале и в конце культивирования.

Экономический коэффициент ($Y_{X/S}$), который иногда называют выходом биомассы, имеет большое значение, как для характеристики физиологических свойств культуры, так и в практическом при получении биомассы или синтезе какого-либо продукта. Он позволяет связать стехиометрические коэффициенты с кинетическими коэффициентами.

$$q = \frac{\mu}{Y_{x/s}}$$

Такой показатель, как выход по массе имеет существенный недостаток, так как не характеризует энергосодержание субстрата. Так процессы роста микроорганизмов на глюкозе и этаноле могут иметь одинаковые экономические коэффициенты, но разные энергетические.

Энергетический выход (η) характеризует долю энергии субстрата, перешедшую к биомассе. Органические вещества, используемые микроорганизмами в качестве субстрата, различны по своему энергосодержанию. Чем выше степень восстановленности субстрата, тем больше количество энергии может быть получено микроорганизмами при его ассимиляции. Количественно степень восстановленности органических веществ есть число электрон-эквивалентов, передаваемых окислителю при полном окислении веществ $CH_pO_nN_q$, в расчете на один грамм-атом углерода.

$$\gamma = 4+p-2n-3q$$

Связь между энергетическим выходом и выходом по массе находят по уравнению:

$$\eta = (\sigma_x \gamma_x / \sigma_s \gamma_s) \cdot Y_{x/s},$$

где σ_x, σ_s – весовая доля углерода в биомассе и субстрате, соответственно;

γ_x, γ_s – степень восстановленности биомассы и субстрата, соответственно;

$Y_{x/s}$ – выход по массе.

Ход работы

1. Построение калибровочной прямой для определения абсолютно сухой биомассы и количества клеток микроорганизмов.

Для построения калибровочного графика готовят 6 суспензий дрожжей разной концентрации. Светорассеяние суспензий измеряют на спектрофотометре в кювете с длиной светового пути 0,5 см при длине волны 490 нм. В каждой из 6 суспензий определяют количество клеток дрожжей в счетной камере Горяева-Тома и абсолютно сухую биомассу (АСБ), используя метод высушивания до постоянной массы. Результаты измерений приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Количество клеток дрожжей в суспензиях, АСБ и соответствующие показания спектрофотометра

Показатели	Суспензия дрожжей					
	1	2	3	4	5	6
Количество клеток, млн/мл	0	43	81	121	163	212
АСБ (г/л)	0	1,25	2,43	3,58	4,86	5,97
Показания спектрофотометра	0	0,21	0,4	0,59	0,8	1,02

2. Подготовка посевного материала и питательной среды

Дрожжи пересеиваются с музейной культуры на свежий скошенный сусло-агар. Полученные косяки выдерживают в термостате при температуре 30°С в течение суток. Через сутки производят смыв выросшей на косяках культуры в стерильных условиях стерильным физиологическим раствором. Полученную таким образом суспензию дрожжей (инокулят), используют для засева в ферментер на синтетическую питательную среду заданного состава.

Состав питательной среды: глюкоза – 9 %; диаммоний фосфат – 0,3 %; аммоний сернокислый – 0,16 %; хлористый калий – 0,06 %; магний сернокислый – 0,02 %. Замерить величину pH раствора на ионометре и довести при необходимости до 4,5 70 % ортофосфорной кислотой или аммиачной водой.

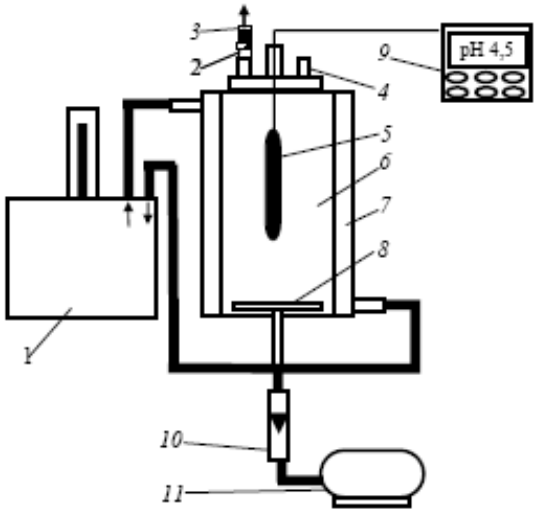
3. Культивирование дрожжей

Экспериментальные данные для определения технологических показателей процесса культивирования получают на лабораторной установке (рисунок 4).

Установка состоит из емкости объемом 1 л для выращивания дрожжей *6*, снабженной барботером *8* для равномерного распределения воздуха, нагнетаемого компрессором *11*. Отработанный воздух очищается, проходя систему фильтров *2*. Емкость культиватора снабжена рубашкой *7*, в которую подается вода от ультратермостата *1* для поддержания температуры процесса выращивания. Уровень pH и температура среды измеряется электродом *5* ионометра *9*. Расход воздуха, устанавливается ротаметром *10*.

Перед началом процесса ферментации произвести асептическую обработку емкости культиватора этанолом. После чего заполнить его питательной средой, отобрав в пробирку 15 мл исходной смеси для определения в ней содержания сахара. Включить ультратермостат и нагреть питательный раствор до температуры 30-31 °С. После чего через штуцер *8* ввести через воронку суспензию засевных: дрожжей (посевного материала) в

количестве 12 % к объему питательной среды. Температура среды в течение процесса, также как и pH среда контролируется с помощью ионометра, электрод которого постоянно находится в жидкости. Включить компрессор *3* и установить расход воздуха равный из расчета 5- 0 $м^3/м^3ч$ с помощью ротаметра *10*. Отработанный воздух удаляется через штуцер *3*, снабженный фильтром *2* из активированного угля и стекловаты для задержки капель среды и клеток дрожжей.



1 – ультротермостат; *2* – фильтр очистки воздуха; *3* – штуцер выхода воздуха; *4* – штуцер ввода среды и отбора проб; *5* – электрод pH – метра; *6* – емкость культиватора; *7* – рубашка; *8* – барботер; *9* – ионометр; *10* – ротаметр; *11* – компрессор

Рисунок 4 - Схема лабораторной установки для выращивания дрожжей

Отсчет времени культивирования следует начинать с момента внесения в питательную среду засевных дрожжей. Первую пробу для определения начальной концентрации дрожжевых клеток x_0 отбирают в количестве 1 мл стерильной пипеткой через штуцер *4* через 1-3 мин после начала процесса. Длительность ферментации составляет 24 часа, отбор проб производят через каждые 3 часа для определения x_n – количества выросшей биомассы.

4. Анализ проб, отобранных в ходе культивирования дрожжей

В каждой пробе определяют содержание АСБ, количество клеток, концентрацию сахара.

4.1 Определение АСБ и количества клеток

При тех же условиях, в которых измеряли светорассеяние в суспензиях дрожжевых клеток при построении калибровочной кривой (длина волны света, толщина кюветы), измеряют светорассеяние проб, отобранных в динамике развития исследуемой культуры дрожжей (каждые 3 часа в течение 24 часов), на спектрофотометре. По калибровочному графику определяют абсолютно сухую биомассу и количество клеток.

4.2 Определение концентрации сахара

В каждой пробе, начиная с исходного момента культивирования, определить содержание сахара в среде, как основного углеродосодержащего субстрата, для этого рекомендуется использовать йодометрический метод определения сахара в биологических объектах.

Основой **йодометрического метода** является **способность редуцирующих сахаров** (глюкозы и мальтозы) окисляться йодом до соответствующих кислот. Определению предшествует холостой опыт, в котором определяется соотношение между приготовленными 0,1 н растворами йода (25 мл) и тиосульфата натрия. Его проводят, как указано ниже, только вместо 10 мл разбавленного основного раствора в коническую колбу отмеривают 10 мл дистиллированной воды.

Основной раствор, содержащий сахарозу, разбавляют в 10 раз. Для этого в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ отмеривают пипеткой 10 мл основного раствора, объем раствора доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

10 мл полученного раствора пипеткой переносят в коническую колбу вместимостью 250 - 400 $см^3$, туда же отмеривают пипеткой 25 мл 0,1 н раствора йода и медленно приливают из бюретки 30 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия. Содержимое колбы тщательно перемешивают,

накрывают колбу часовым стеклом или закрывают пробкой и ставят в темное место на 15-20 мин. Затем вносят 4,5-5 мл 1 н раствора серной кислоты и титруют 0,1 н раствором тиосульфата натрия до светло-желтого окрашивания, в конце добавляют 1 мл раствора крахмала и продолжают титрование до обесцвечивания.

Массовая доля редуцирующих веществ в пересчете на сухое вещество (%) определяют по формуле:

$$P_в = \frac{(V_0 - V)9K \cdot 100 \cdot 100}{200c},$$

где V_0 – объем 0,1н раствора тиосульфата натрия, израсходанного на титрование 25 мл 0,1 н раствора йода в холостом опыте, мл;

V – объем 0,1н раствора тиосульфата натрия, израсходанного на титрование при анализе, мл;

9 – масса глюкозы, соответствующая 1 мл 0,1н раствора тиосульфата натрия, мг;

K – поправочный коэффициент к нормальности раствора тиосульфата натрия;

200 – масса сахарозы, содержащаяся в 10 мл разбавленного основного раствора, мг;

c – массовая доля сухих веществ сахарозы, %.

Полученные результаты вносят в таблицу 3.

5) Обработка полученных результатов

Пользуясь калибровочной кривой (табл.2), определяют количество клеток дрожжей (млн/мл) и АСБ в отобранных пробах. Данные вносят в таблицу 3.

Таблица 3 – Результаты культивирования дрожжей

Время культивирования, час	Показания спектрофотометра	Количество клеток, млн/мл	Количество АСБ, мг/мл	Содержание сахара, мг/мл
0				
3				
6				
9				
12				
15				
18				
21				
24				

На основе данных таблицы 3 строят кривую роста культуры микроорганизмов. Рассчитывают удельную скорость роста μ, метаболитический коэффициент q, выход по массе $Y_{X/S}$ дрожжей. Временную зависимость представляют в виде графика удельной скорости роста дрожжей, метаболитического коэффициента и урожая.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные отличия периодического и непрерывного культивирования.
2. Какие фазы размножения проходит биомасса клеток в условиях периодического культивирования?
3. Какие показатели используют для характеристики процессов роста популяции микроорганизмов?
4. В каких единицах измеряется удельная скорость роста, общая скорость роста?
5. С помощью какого устройства регулируется температура процесса?

6. Какова доза посевного материала?

7. В чем сущность метода определения углеродосодержащего субстрата в работе?

8. Какой метод используется для определения концентрации биомассы?