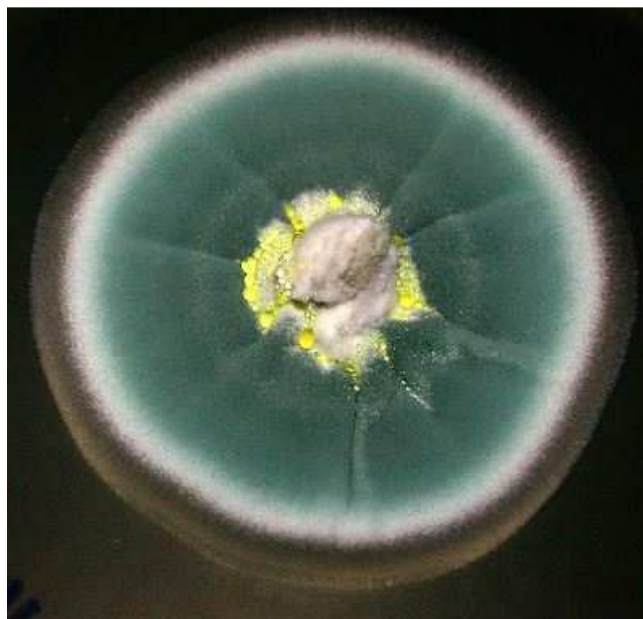
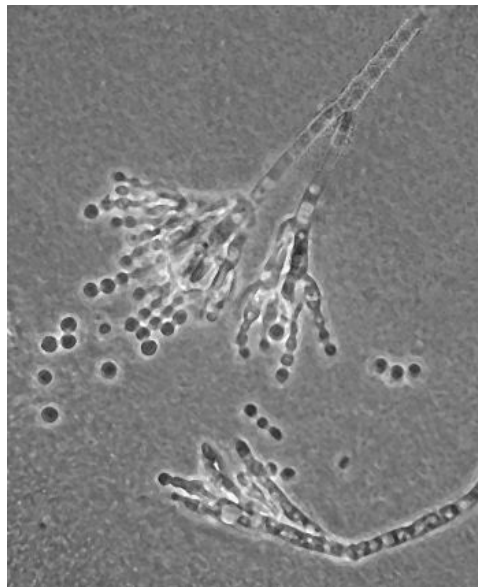


Biomérnöki műveletek és folyamatok II. gyakorlat

Biomérnök BSc 3. évf. hallgatók számára

A gyakorlat során *Penicillium chrysogenum* gombát tenyésztünk 8 l térfogatú Zentai típusú fermentorban. A penicillin ipari előállítása *Penicillium chrysogenummal* történik. A gyakorlaton az NRLL-1951 jelű vad típusú *Penicillium* törzset használjuk.

„*Penicillium chrysogenum*, the source for penicillin-- making it possible to have more veterans for Veteran's Day.”



A gyakorlat célja, hogy a hallgatók megismerjék az alapvető fermentációs technikákat, mint pl. az inokulum készítés, sterilizálás, fermentor leoltása inokulummal, mintavétel stb. Cél továbbá a mikroorganizmusok szaporodásának nyomonkövetése szárazanyag meghatározással. A kapott eredményekből növekedési görbét kell készíteni.

Feladatok, napokra lebontva:

1. nap: táptalaj készítés, sterilizálás, inokulum leoltása
2. nap: a fermentor leoltása inokulummal, mintavétel
3. nap: mintavétel
4. nap: mintavétel
5. nap: mintavétel, fermentáció leállítása, fermentor kimosása.

Táptalaj készítés: Az inokulum táptalaj és a fermentáció táptalaja különbözik egymástól.

Komplex táptalaj: Össz. 450 ml komplex táptalajt kell készíteni, a pH-t 7-re állítani. Ezt 3 db 500 ml-s erlenmeyer lombikba öntjük (150 ml/lombik).

Az inokulum táptalaj (komplex táptalaj) összetétele:

Anyag	g / 100 ml táptalaj
pepton	0,4
élesztő kivonat	0,4
KH_2PO_4	0,2
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	0,8
$\text{MgSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025

Inokulum sterilizálása: Az inokulum táptalajt certoklávban sterilizzük. Sterilizálás után cukoroldatot (50 %-s glükóz oldat) és nyomelemoldatot adunk hozzá. (Ezek az oldatokat szűrővel sterilizáljuk – előre el vannak készítve - nem lehet 120 °C-n sterilizálni, mert károsodnak). A glükóz koncentrációja az inokulum táptalajban 1 %, a nyomelemoldat koncentrációja 1 %.

A certoklávban az inokulummal egyidőben sterilizálni kell a szükséges eszközöket is.

- leoltólombik, ami 500 ml minimál táptalajt tartalmaz
- 2 zsugorított üvegszűrő
- 2 kanál
- 2 üveg desztillált víz

A nyomelem oldat összetétele:

Anyag	g / 100 ml
CaCl ₂	1
CoCl ₂	0,01
ZnSO ₄	0,088
CuSO ₄	0,0039
NiSO ₄	0,001
Na-tetraborát	0,0008
MnCl ₂	0,00072
Na ₂ MO ₄ × 2 H ₂ O	0,00037
FeSO ₄	0,001

Inokulum leoltása: 1,5 ml spóraoldattal oltunk le 150 ml táptalajt. Rázógépbe tesszük, ahol 28 °C-n, 200 rpm-l 24 órán át rázatjuk.

Minimál táptalaj: a fermentorban minimál táptalajon növekszik a gomba. Ennek a pontos összetétele ismert, különböző sókat, cukrot és nyomelemet tartalmaz.

A minimál táptalaj összetétele:

Anyag	g / 100 ml táptalaj
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
KH ₂ PO ₄	0,2
Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O	0,8
MgSO ₄ × 6 H ₂ O	0,025

Mivel a gyakorlaton használt fermentor 5 l térfogatú, a fermentorba 5 l minimál táptalajt kell készíteni, pH-t 7-re állítani. A fermentorba 4,5 l táptalajt öntünk, a maradék 500 ml táptalaj a leoltólombikba kerül, amit így sterilizünk.

Fermentor sterilizálása: a fermentorba beleöntjük az 4,5 l minimál táptalajt, majd összeszerelés után autoklávban sterilizáljuk.

Az első nap feladata még szűrőpapírkorongok kivágása, beszámozása, s a tömegük lemérése.

Fermentor leoltása inokulummal: A fermentorokat kivesszük az autoklávból, a szükséges szereléseket, beállításokat elvégezzük.

Az inokulum a rázó gépben 24 h alatt kellő sejtsűrűséget ér el ahhoz, hogy le lehessen oltani vele a fermentort. Az inokulum átöntését a leoltólombikokba steril körülmények között végezzük, lamináris box alatt. Első lépésként a leoltólombikokban levő minimál táptalajhoz hozzáadjuk a steril nyomelem oldatot és cukoroldatot. Az egyik fermentorba glükóz, a másikba laktóz kerül C-forrásként. Ezután az inokulumot leszűrjük zsugorított üvegszűrőn, mossuk desztillált vízzel, majd a gombafonalakat átkaparjuk a leoltólombikba. A leoltólombik tartalmát a leoltó csonkon át a fermentorba juttatjuk (közben a levegőt el kell zárni!).

A fermentáció elindult. Meg kell győződni a paraméterek beállításának helyességéről (pH 7.0, hőmérséklet 28 °C, kevertetés 350 rpm, beáramló levegő mennyisége 350 l/h).

A 0 h-s mintavételt most kell elvégezni, a mintavevő csonkon át. Az első 20 ml holt térfogatnak számít, a második 20 ml a tényleges minta. A szárazanyag meghatározás lényege, hogy a mikrobaszuszpenzió ismert térfogatú mintáját szűrőpapír korongon leszűrjük, a sejtömeget pedig súlyállandóságig szárítjuk, majd lemérjük. Éppen ezért vigyázni kell, hogy a 20 ml minta pontosan 20 ml legyen. A szárítás előbb szobahőmérsékleten, majd szárítószekrényben 100 °C-n történik. Naponta 2 mintavétel szükséges.

A pénteki napon leállítjuk a fermentációt, ekkor történik meg az utolsó mintavétel. A fermentort szét kell szerelni és elmosni.

A jegyzőkönyv tartalmazzon rövid elméleti bevezetőt, a gyakorlat leírását s a növekedési görbét. A növekedési görbén a szárazanyagtartalmat kell feltüntetni g/l-ben az idő függvényében. A jegyzőkönyv elkészítésére egy hét áll rendelkezésre. (Leadni: D 110 szoba v D 207 labor).