

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Borut POHAR

**PRIMERJAVA SPREMLJANJA RASTI KVASOVK Z  
METODO MERJENJA OPTIČNE GOSTOTE IN Z  
METODO DOLOČANJA SUHE BIOMASE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Borut POHAR

**PRIMERJAVA SPREMLJANJA RASTI KVASOVK Z METODO  
MERJENJA OPTIČNE GOSTOTE IN Z METODO DOLOČANJA SUHE  
BIOMASE**

DIPLOMSKA NALOGA  
Univerzitetni študij

**FOLLOWING THE YEAST GROWTH BY OPTICAL DENSITY AND  
DRY WEIGHT MEASUREMENTS – COMPARISON OF TWO  
METHODS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za biotehnologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Milico Kač, za somentorja asist. dr. Polono Jamnik in za recenzenta prof. dr. Petra Rasporja.

Mentor: doc. dr. Milica Kač

Somentor: asist. dr. Polona Jamnik

Recenzent: prof. dr. Peter Raspor

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Milica Kač

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Polona Jamnik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Peter Raspor

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Borut Pohar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 579.24 : 582.282.23 : 543.4 (043) = 863  
KG kvasovke/*Saccharomyces cerevisiae*/biomasa/suha biomasa/merjenje optične gostote/  
rast kvasovk/algoritem rastne krivulje  
AV POHAR, Borut  
SA KAČ, Milica (mentor)/JAMNIK, Polona (somentor)/RASPOR, Peter (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija  
mikrobiologije  
LI 2006  
IN PRIMERJAVA SPREMLJANJA RASTI KVASOVK Z METODO MERJENJA  
OPTIČNE GOSTOTE IN Z METODO DOLOČANJA SUHE BIOMASE  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 54 str., 13 pregl., 12 sl., 6 pril., 38 vir.  
IJ sl  
JI sl/en

AI Kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* smo v diplomskem delu uporabili kot modelni mikroorganizem za kritično primerjanje metode merjenja optične gostote (*OD*) in metode določanja suhe biomase (*s.s.*) pri spremljanju rasti mikroorganizma. Pri tem smo določili algoritem, ki nam za določen mikroorganizem in za dane razmere omogoči direkten preračun rezultatov, ki jih dobimo z merjenjem *OD* v vrednosti za suho biomaso in obratno. Izbrani sev smo z omenjenima metodama spremljali od inokulacije do stacionarne faze rasti. Pri tem smo vsaki 2 uri izmerili optično gostoto kvasne suspenzije v 5 ponovitvah in sočasno določili vsebnost suhe biomase kvasne suspenzije v 4 ponovitvah. Iz povprečnih vrednosti meritev za posamezne vzorce smo določili algoritem za opis odvisnosti optične gostote od vsebnosti suhe biomase (polinom 4. stopnje). Iz tega smo z zamenjavo odvisne in neodvisne spremenljivke dobili odvisnost vsebnosti suhe biomase od *OD*. Z dobljenim polinomom 4. stopnje smo za testing set izračunali vrednosti za vsebnost suhe kvasne biomase in tako dobljeno rastno krivuljo primerjali s krivuljama, ki smo jih za dani ponovitvi dobili z merjenjem *OD* in merjenjem *s.s.* Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je merjenje *OD* ustrežna metoda za določanje faze rasti mikroorganizmov. Meritve *OD* pa lahko uporabimo tudi za direktno določevanje vsebnosti suhe biomase, vendar le v primerih, ko so razmere za testing set in tiste za testing set povsem enake.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dn

DC UDC 579.24 : 582.282.23 : 543.4 (043) = 863

CX yeasts/*Saccharomyces cerevisiae*/biomass/dry weight/measurement of optical density/  
yeast growth/algorithm of growth curve

AU POHAR, Borut

AA KAČ, Milica (supervisor)/JAMNIK, Polona (co-advisor)/RASPOR, Peter (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology

PY 2006

TI FOLLOWING THE YEAST GROWTH BY OPTICAL DENSITY AND DRY  
WEIGHT MEASUREMENTS – COMPARISON OF TWO METHODS

DT Graduation thesis

NO X, 54 p., 13 tab., 12 fig., 6 ann., 38 ref.

AL sl

LA sl/en

AB *Saccharomyces cerevisiae* was used as a model microorganism for critical evaluation of two standard methods used for determination of microorganism growth. Measurement of optical density (*OD*) and dry weight determination were compared and evaluated. Algorithms for direct conversion of *OD* measurements to dry weight values and *vice versa* for a given microorganism under defined conditions were obtained. The culture of the strain under investigation was followed from inoculation to stationary phase using both methods. Every 2 hours *OD* was measured in 5 repetitions and at the same cultivation time the dry weight was determined in 4 repetitions. The average values were used to determine the algorithm describing the dependence between *OD* and dry weight, the latter being the independent variable (the result was a polynomial of the 4<sup>th</sup> grade). The same data were used again, this time with *OD* as the independent variable. The polynomial of the 4<sup>th</sup> grade so obtained was used to calculate the values for dry weight from *OD* values, this time for a testing set. The growth curve resulting from this calculation was compared with those obtained for the same experiment by actually measuring both values, namely *OD* and dry weight.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 TAKSONOMSKA UVRSTITEV KVASOVK	1
1.2 TEHNOLOŠKI POMEN KVASOVK	1
1.3 SPREMLJANJE RASTI MIKROORGANIZMOV (Koch, 1994)	2
<b>1.3.1 Direktno štetje</b>	<b>2</b>
1.3.1.1 Štetje mikroorganizmov s pomočjo mikroskopa	2
1.3.1.2 Elektronsko vrednotenje ("electronic enumeration")	2
1.3.1.3 Pretočna citometrija	3
<b>1.3.2 Štetje kolonij</b>	<b>4</b>
1.3.2.1 Metoda z razmazovanjem ("spread plate method", metoda štetja na razliti plošči)	4
1.3.2.2 Metoda tanke plošče ("thin-layer plate method")	5
1.3.2.3 Metoda kolonij pod površino ("layered plate method")	5
1.3.2.4 Metoda z vmešavanjem ("pour plate method", metoda štetja v razliti plošči)	5
1.3.2.5 Membranska filtracija ("membrane filter method")	6
<b>1.3.3 Titer metoda ("most probable number (MPN) method")</b>	<b>6</b>
<b>1.3.4 Merjenje biomase</b>	<b>7</b>

1.3.4.1 Določanje mokre biomase mikroorganizmov	7
1.3.4.2 Določanje suhe biomase mikroorganizmov	8
<b>1.3.5 Spektrofotometrične meritve</b>	<b>8</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>10</b>
2.1 OPREDELITEV PROBLEMA	10
2.2 DOSEDANJA RAZISKOVANJA	10
2.3 CILJI	12
2.4 DELOVNA HIPOTEZA	13
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>14</b>
3.1 DELOVNI POSTOPEK	14
3.2 MATERIALI	15
<b>3.2.1 Delovni mikroorganizem</b>	<b>15</b>
<b>3.2.2 Gojišča</b>	<b>15</b>
3.2.2.1 Trdno YEPD gojišče (Atlas, 1993)	15
3.2.2.2 Tekoče YEPD gojišče (Atlas, 1993)	16
<b>3.2.3 Oprema</b>	<b>17</b>
3.3 METODE DELA	18
<b>3.3.1 Revitalizacija kulture kvasovk</b>	<b>18</b>
<b>3.3.2 Aerobna kultivacija na stresalniku</b>	<b>18</b>
<b>3.3.3 Določanje optimalnega števila cepilnih zank za inokulacijo gojišča</b>	<b>18</b>
<b>3.3.4 Merjenje optične gostote</b>	<b>19</b>
<b>3.3.5 Določanje mase suhe kvasne biomase</b>	<b>19</b>

<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>20</b>
4.1	REZULTATI MERITEV	20
4.2	DOLOČITEV ALGORITMA ZA OPIS ODVISNOSTI OPTIČNE GOSTOTE OD VSEBNOSTI SUHE BIOMASE	25
<b>4.2.1</b>	<b>Glajenje krivulje z algoritmi za polinome druge, tretje in četrte stopnje</b>	<b>25</b>
<b>4.2.2</b>	<b>EkspONENTNI ZVEZI:</b>	
	<b>Odvisnost <math>10^{OD}</math> od vsebnosti suhe biomase in <math>e^{OD}</math> v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase</b>	<b>31</b>
4.3	IZRAČUN VSEBNOSTI SUHE BIOMASE IZ OPTIČNE GOSTOTE	33
4.4	PRIMERJAVA RASTNIH KRIVULJ	37
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>43</b>
5.1	PONOVLJIVOST MERITEV	43
5.2	DOLOČITEV ALGORITMA ZA OPIS ODVISNOSTI OPTIČNE GOSTOTE OD VSEBNOSTI SUHE BIOMASE	44
<b>5.2.1</b>	<b>Glajenje krivulje z algoritmi za polinome druge, tretje in četrte stopnje</b>	<b>44</b>
<b>5.2.2</b>	<b>EkspONENTNI ZVEZI:</b>	
	<b>Odvisnost <math>10^{OD}</math> od vsebnosti suhe biomase in <math>e^{OD}</math> v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase</b>	<b>45</b>
5.3	IZRAČUN VSEBNOSTI SUHE BIOMASE IZ OPTIČNE GOSTOTE	45
5.4	PRIMERJAVA RASTNIH KRIVULJ	46
5.5	SKLEPI	47
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>50</b>



## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993).	15
Preglednica 2: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993).	16
Preglednica 3: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od števila cepilnih zank kvasne biomase, ki smo jih dodali v gojišče.	20
Preglednica 4: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (prvi poskus).	21
Preglednica 5: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (drugi poskus).	22
Preglednica 6: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (tretji poskus).	23
Preglednica 7: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (četrti poskus).	24
Preglednica 8: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (peti poskus).	25
Preglednica 9: Optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase: polinom druge stopnje $OD = a_0 + a_1 \cdot (s. s.) + a_2 \cdot (s. s.)^2$ .	26
Preglednica 10: Optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase: polinom tretje stopnje $OD = a_0 + a_1 \cdot (s. s.) + a_2 \cdot (s. s.)^2 + a_3 \cdot (s. s.)^3$ .	27
Preglednica 11: Optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase: polinom četrte stopnje $OD = a_0 + a_1 \cdot (s. s.) + a_2 \cdot (s. s.)^2 + a_3 \cdot (s. s.)^3 + a_4 \cdot (s. s.)^4$ .	28
Preglednica 12: Odvisnost optične gostote kvasne suspenzije od vsebnosti suhe biomase za $OD < 1$ (podatki iz preglednic 4, 5, 6, in 7).	30
Preglednica 13: Suha biomasa izračunana iz dane optične gostote po enačbi (3).	35

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Hodogram poteka eksperimentalnega dela.	14
Slika 2: Optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase (meritve iz preglednic 3 do 8).	29
Slika 3: Vrednosti $10^{OD}$ v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase.	31
Slika 4: Vrednosti $e^{OD}$ v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase.	32
Slika 5: Vsebnosti suhe biomase v odvisnosti od optične gostote (meritve iz preglednic 4 do 8).	33
Slika 6: Povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L) in izračunana vsebnost suhe biomase (g/L) v odvisnosti od povprečne optične gostote (meritve vzete iz preglednic 3 ter iz preglednic 4 do 8).	37
Slika 7: Povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L) v odvisnosti od časa.	38
Slika 8: Povprečna optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa.	39
Slika 9: Izračunana vsebnost suhe biomase (g/L) v odvisnosti od časa.	39
Slika 10: Povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L) in izračunana vsebnost suhe biomase (g/L) v odvisnosti od časa.	40
Slika 11: Povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L) in izračunana vsebnost suhe biomase v odvisnosti od časa (meritve vzete iz preglednic 6 in 8).	41
Slika 12: Optična gostota, povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L) in izračunana vsebnost suhe biomase (g/L) v odvisnosti od časa.	42

## KAZALO PRILOG

Priloga A1: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od števila cepilnih zank kvasne biomase, ki smo jih dodali v gojišče (z dne 10.10.2005).

Priloga B1: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 17.10.2005).

Priloga B2: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 18.10.2005).

Priloga B3: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 12. in 13.12.2005).

Priloga B4: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 12. in 13.12.2005).

Priloga B5: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 12. in 13.12.2005).

## 1 UVOD

### 1.1 TAKSONOMSKA UVRSTITEV KVASOVK

Kvasovke so netaksonomska kategorija gliv, definirana z ozirom na morfološke in fiziološke značilnosti. So filogenetsko raznorodna skupina organizmov in pripadajo dvema glavnima taksonoma, in sicer *Ascomycotina* in *Basidiomycotina* (Raspor, 1996).

Tehnološko najbolj pomembna in preučena kvasna vrsta je *Saccharomyces cerevisiae*, ki jo pogosto imenujemo tudi pekovska kvasovka (Walker, 2000).

### 1.2 TEHNOLOŠKI POMEN KVASOVK

Tehnološki pomen kvasovk lahko razdelimo na tradicionalne biotehnologije in na moderne biotehnologije, ki so plod biotehnoloških prizadevanj zadnjih desetletij. Kvasovka je vsekakor nenadomestljiva v tehnologiji proizvodnje piv, vin, sakejev, pekovskega kvasa in kruhov, sirov, kisov, destilatov, alternativnih virov energije, krmnega kvasa, nekaterih kemikalij in aditivov. Po drugi strani pa so kvasovke nekaterih rodov (*Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*) nepogrešljive v proizvodnji heterolognih proteinov, protiteles, hormonov, encimov, barvil, arom (Raspor, 1996).

Zaradi tako široke uporabe kvasovk v razne namene se tudi velikokrat pojavi potreba po njihovem kvantitativnem ovrednotenju.

## 1.3 SPREMLJANJE RASTI MIKROORGANIZMOV (Koch, 1994)

### 1.3.1 Direktno štetje

#### 1.3.1.1 Štetje mikroorganizmov s pomočjo mikroskopa

Večje celice, kot so npr. kvasovke, štejemo s pomočjo števni komor. To so posebno oblikovana predmetna stekelca, ki imajo na poglobljenem delu vgravirano mrežo kvadratov. Vsaki površini kvadrata ustreza določen volumen v števni komori (Stopar in sod., 2005). Števno komoro napolnimo z ustreznim razredčenim vzorcem in pod fazno kontrastnim mikroskopom preštujemo mikroorganizme. Iz števila prešteti celic, razredčitvenega faktorja, števila prešteti kvadratov in volumna kvadrata nato določimo skupno število živih in mrtvih celic na mL nerazredčenega vzorca. Mikroskopsko štetje mikroorganizmov v števni komori je pogosta tehnika, ki je hitra in poceni, poleg tega pa je oprema za njeno izvajanje običajno že del opreme vsakega laboratorija. Z uporabo te metode lahko dobimo tudi dodatno informacijo o velikosti in morfologiji celic. Točnost metode pa zmanjšuje adsorpcija celic na steklene površine (Koch, 1994).

#### 1.3.1.2 Elektronsko vrednotenje ("electronic enumeration")

Pri tej metodi štejemo celice z merjenjem električne upornosti dvodelnega sistema, pri katerem sta oba dela povezana z majhno odprtino. Čeprav medij v sistemu dobro prevaja električni tok, je upornost sistema zaradi majhnosti odprtine velika. Ta se še dodatno poveča takrat, ko skozi odprtino prehajajo delci, saj je prevodnost le-teh manjša od prevodnosti medija. Naprava spremembo v upornosti, ki nastane ob prehodu delca skozi odprtino, prevede v napetostni ali tokovni pulz. Z elektronskim štetjem pulzov, ki nastanejo pri prehodu znanega volumna mikrobne suspenzije skozi odprtino, ocenimo koncentracijo celic v vzorcu. Pri štetju avtomatično izločimo premajhne pulze, ki nastanejo zaradi turbulenc, in prevelike, katerih nastanek povzročijo necelični delci. Prav zaradi metode izločanja manjših pulzov nastaja

težava pri štetju majhnih celic. Pulzi, ki jih le-te povzročajo, so namreč podobni tistim, ki nastanejo zaradi turbulenc pri prehajanju tekočine skozi odprtino. Zato celice pri tej metodi praviloma niso manjše od  $0,4 \mu\text{m}^3$ . Napake v meritvah se pojavijo tudi v primeru, ko celice po delitvi ostanejo medsebojno povezane. Podobna težava nastane tudi pri štetju celic, ki imajo težnjo po tvorjenju filamentov in agregatov in v primeru, ko skozi odprtino preide več celic v tako kratkem času, da jih naprava zazna kot eno samo veliko celico. Tretji velik problem te tehnike je izbira odprtine s pravšnjim premerom. Če je le-ta premajhen, lahko pride do zamašitve odprtine z mikroorganizmi, če pa je prevelik, je sprememba upornosti majhna v primerjavi s celotno upornostjo čez odprtino, tako da je signal, ki nastane pri prehodu mikroorganizma skozi odprtino, premajhen (Koch, 1994).

### 1.3.1.3 Pretočna citometrija

Pri tej metodi celice vzorca ena za drugo prehajajo merilno mesto pretočnega citometra, kjer poteka njihova analiza z laserskimi žarki. Le ti se razlikujejo med seboj po valovni dolžini in po kotu namestitve. Ker med celicami in svetlobo obstajata vsaj dva tipa interakcij, namreč sipanje in fluorescenca svetlobe, lahko izvajamo dva sklopa meritev. Pretočni citometer ima tako lahko detektorje za sipano kot tudi detektorje za emitirano svetlobo (Koch, 1994). Celice lahko oddajajo svetlobo, če jih predhodno obarvamo s fluorescirajočimi barvili, vendar je oddana svetloba lahko tudi posledica autofluorescence celičnih pigmentov. Število celic v vzorcu se določi z merjenjem intenzitete sipane svetlobe ali z merjenjem fluorescence pri določeni valovni dolžini svetlobe, medtem ko celice prehajajo skozi merilno mesto pretočnega citometra. Štetje celic v primerjavi z ostalimi metodami poteka zelo hitro. Poleg števila celic v vzorcu pa lahko s pretočno citometrijo merimo tudi številne parametre celic. Tako lahko npr. spremljamo velikost celic, vsebnost proteinov, lipidov ali DNA, antigenske lastnosti, encimsko aktivnost, itd. Ker detektorji zbirajo podatke za vsako celico posebej, lahko na podlagi rezultatov sklepamo na heterogenost vzorca (Davey, 2002). Z metodo lahko tudi

spremljamo rast kulture s periodičnim štetjem celic v določenem volumnu vzorca (Koch, 1994).

### 1.3.2 Štetje kolonij

#### 1.3.2.1 Metoda z razmazovanjem ("spread plate method", metoda štetja na razliti plošči)

Število mikroorganizmov v osnovnem vzorcu je običajno preveliko, da bi ga lahko po metodi z razmazovanjem direktno določili, zato iz vzorca pripravimo serijo razredčitev. Določen volumen posamezne razredčitve nato naneseemo na površino trdnega gojišča in ga razmažemo po celotni površini. Po inkubaciji preštujemo kolonije na tistih ploščah, kjer je od 30 do 300 kolonij. Spodnja meja je postavljena zaradi velikega vpliva tehnike razredčevanja in prisotnih kontaminantnih mikroorganizmov na število zraslih kolonij pri tako majhnih koncentracijah vzorca. Zgornja meja pa je postavljena zato, ker je zaradi velike gostote kolonij na ploščah povečana verjetnost medsebojnega zlivanja kolonij. S pomočjo prešteti kolonij in razredčitvenega faktorja lahko nato izračunamo koncentracijo živih, oz. natančneje, koncentracijo kultivabilnih celic v osnovnem vzorcu. Število kolonij je namreč merilo za število kultivabilnih celic v vzorcu. Ker pa imajo nastale kolonije lahko izvor v več kot eni celici, rezultat izražamo kot število CFU ("Colony-Forming Units", število kolonijskih enot) na mL vzorca (Kaiser, 2005). Pri tej metodi so vse kolonije površinske kolonije. To je pomembno zato, ker so za pravilen barvni odziv z mnogimi indikatorskimi agarji potrebne prav površinske kolonije. V mnogih primerih se kolonije pod površino obarvajo drugače, ker je oksigenacija različna (Koch, 1994). S to metodo lahko štejemo le tiste mikroorganizme, ki jih lahko pri danih pogojih gojimo na trdnem gojišču (Posten in Cooney, 2004).

### 1.3.2.2 Metoda tanke plošče ("thin-layer plate method")

Razredčen vzorec odpipetiramo v epruveto, ki vsebuje primerno količino (od 2,5 do 3,5 mL) tekočega hladnega gojišča z agarjem. Mešanico nato razlijemo po trdnem gojišču in pustimo, da se strdi. Po inkubaciji preštejemo kolonije in izračunamo število CFU na mL osnovnega vzorca (Koch, 1994).

### 1.3.2.3 Metoda kolonij pod površino ("layered plate method")

Metoda je podobna metodi tanke plošče. Razlika je v tem, da na strjeno gojišče, ki vsebuje celice, nanese dodatno plast agarja, tako da so vse kolonije pod površino. Po inkubaciji preštejemo kolonije in izračunamo število CFU na mL osnovnega vzorca. Metoda je zelo uporabna, saj so nastale kolonije mnogo manjše in mnogo bolj kompaktne. Lahko se tudi intenzivno obarvajo. Ta pristop je še posebno priporočljiv, saj je na števnikih ploščah, ki jih dobimo s to metodo, lahko prisotnih od 30 do 2000 kolonij. Prednost metode je tudi v tem, da imamo lahko na zalogi plošče napolnjene z minimalnim agarjem kot bazalno plastjo. Prav tako imamo lahko vedno pripravljeno zalogo minimalnega mehkega agarja. V alikvote, ki jih nato porabimo za gornji agar, pa dodamo 10- do 50-kratni presežek potrebnih specialnih hranil (Koch, 1994).

### 1.3.2.4 Metoda z vmešavanjem ("pour plate method", metoda štetja v razliti plošči)

Tudi pri tej metodi najprej naredimo serijo razredčitev osnovnega vzorca (Kaiser, 2005). Znan volumen vsake razredčitve nato prenesemo v prazno petrijevko, nato pa nanj nanese raztaljen, na 45 °C ohlajen agar. Vsebino nato premešamo in pustimo, da se strdi (Koch, 1994). Po inkubaciji preštejemo kolonije na števnikih ploščah in izračunamo število CFU na mL



osnovnega vzorca (Kaiser, 2005). Čeprav je metoda pogosto uporabljena, jo je potrebno uporabljati previdno, saj nekateri mikroorganizmi ne preživijo, če jih izpostavimo temperaturi 45 °C, vzrok za propad celic pa je lahko tudi nenadna sprememba v temperaturi. Metoda tudi nima prednosti, ki jih imata metoda z razmazovanjem in metoda kolonij pod površino. Kolonije niso značilno površinske (kot pri metodi z razmazovanjem), niti niso izrazito kompaktne (kot pri metodi kolonij pod površino) (Koch, 1994).

#### 1.3.2.5 Membranska filtracija ("membrane filter method")

Pri tej metodi znan volumen po potrebi razredčenega vzorca prefiltriramo čez membranski filter z določeno velikostjo por, pri čemer celice ostanejo na površini filtra. Filter nato s stranjo, na kateri so celice, položimo na trdno gojišče. Po inkubaciji preštujemo kolonije in izračunamo število CFU na mL osnovnega vzorca (Posten in Cooney, 2004).

### 1.3.3 Titer metoda ("most probable number (MPN) method")

Z metodo ugotavljamo najbolj verjetno število živih mikroorganizmov v tekočem gojišču. Najprej naredimo razredčitveno vrsto osnovnega vzorca. Določen volumen vsake razredčitve nato v treh ali več ponovitvah nacepimo v epruvete s tekočim gojiščem. Poleg nacepljenih vzorcev inkubiramo tudi kontrolo, ki jo predstavlja nenacepljeno gojišče. Znaki rasti mikroorganizmov v epruveti so motnost, usedlina, mrenica, sprememba barve, sprememba pH vrednosti gojišča (pokaže jo dodani pH indikator). Spremembe, ki se pojavijo v nacepljenih gojiščih ugotavljamo na osnovi primerjave s kontrolnim nenacepljenim gojiščem. Primere, kjer opazimo znake rasti, označimo kot (+), tiste, kjer je rast izostala pa označimo kot (-). Iz razporeda + in - znakov določimo karakteristično število, ki je tri-, pet- ali večmestno, odvisno od števila ponovitev. V tabeli poiščemo faktor, ki ustreza določenemu

karakterističnemu številu in pomnožimo še z razredčitvijo, ki ustreza prvi številki v karakterističnem številu. Tako dobimo najbolj verjetno število živih mikroorganizmov v vzorcu (Stopar in sod., 2005).

Titer metoda je v primerjavi s štejetem kolonij zelo neučinkovita, saj vsaka epruveta ustreza le majhnemu delu površine plošče, ki jo uporabljamo pri štejetju mikroorganizmov z gojitvenimi metodami. Nasprotno pa je metoda uporabna v primerih, če mikroorganizma ne moremo gojiti na trdnem gojišču, če je kinetika rasti mikroorganizmov zelo različna ali če so v vzorcu prisotni nezaželeni mikroorganizmi, za katere nimamo na voljo nobene selektivne metode. V zadnjem primeru je metoda uporabna le takrat, ko opazovani mikroorganizem proizvaja merljiv metabolit (npr.: antibiotik). Tako lahko ocenimo število mikroorganizmov tudi v primeru, ko kontaminantni mikroorganizem preraste kulturo (Koch, 1994).

### **1.3.4 Merjenje biomase**

#### **1.3.4.1 Določanje mokre biomase mikroorganizmov**

Mokro biomaso mikroorganizmov v suspenziji izmerimo s tehtanjem biomase, ki jo dobimo s filtracijo ali centrifugiranjem znanega volumna celične suspenzije. Metoda ni točna, saj se v medcelični prostor ujame tekoča faza (gojišče), ki prispeva k celotni masi. Ta problem deloma odpravimo tako, da dobljeno biomaso pred tehtanjem spiramo z destilirano vodo (Koch, 1994).

#### 1.3.4.2 Določanje suhe biomase mikroorganizmov

Celično biomaso, ki jo dobimo s filtracijo ali centrifugiranjem znanega volumna celične suspenzije, sušimo pri temperaturi 105 °C do konstantne mase. S pomočjo dobljene suhe biomase in volumna, iz katerega smo biomaso izločili, nato izračunamo vsebnost suhe snovi v določenem volumnu vzorca. Točnost metode zmanjšujejo delci gojišča, ki se ujamejo v medcelični prostor. Napako deloma zmanjšamo tako, da celice pred sušenjem spiramo z destilirano vodo. Napaka pri meritvi lahko nastane tudi zaradi ponovne navlažitve vzorca med prenosom in tehtanjem (Koch, 1994).

#### 1.3.5 Spektrofotometrične meritve

Posredno lahko stanje kulture ocenimo tudi z merjenjem optične gostote (*OD*).

V kompleksnih suspenzijah, kot je npr. suspenzija kvasa, obstaja mnogo interakcij med svetlobo in snovjo (Reckhow, 1999). Zato je intenziteta svetlobnega žarka po prehodu skozi suspenzijo (*I*) manjša od njegove intenzitete pred vstopom suspenzijo (*I*<sub>0</sub>).

Optično gostoto merimo s spektrofotometrom. Pri procesu merjenja v svetlobni žarek določene valovne dolžine zaporedno vstavimo raztopino slepega vzorca in raztopino vzorca ter tako določimo delež prepuščene svetlobe (Marczenko, 1986). Prvič izmerimo *I*<sub>0</sub>, drugič pa *I*.

Pri slepem vzorcu torej, ki je v našem primeru gojišče, intenziteto prepuščene svetlobe označimo z *I*<sub>0</sub>, intenziteto svetlobe, ki prehaja raztopino pravega vzorca (suspenzija mikroorganizma) pa označimo z *I*. Dekadični logaritem razmerja teh dveh vrednosti je optična gostota (*OD*), ki je merilo za zmanjšanje intenzitete svetlobnega žarka. Optično gostoto vzorca (*OD*) podaja enačba (1):

$$OD = \log \frac{I_0}{I} \quad \dots(1)$$

kjer pomeni:

$I_0$  = intenziteta izstopnega žarka za slepi vzorec

$I$  = intenziteta izstopnega žarka za vzorec (Denney in Sinclair, 1987).

Spektrofotometrija ima nekaj prednosti pred ostalimi metodami. Je enostavna, dokaj hitra, ponovljiva in poceni metoda.

Težava pri uporabi metode se pojavi v primeru, ko je  $OD$  raztopine velika. V tem primeru pride do odstopanja od linearne zveze med optično gostoto in vsebnostjo analita v raztopini, saj je le-ta linearna le pri relativno majhnih optičnih gostotah (Koch, 1994).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Za spremljanje rasti mikroorganizmov, kot so tudi kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*, je na voljo več preizkušenih metod. Vsaka ima prednosti in slabosti, zato so temu primerno različno pogosto uporabljane.

Za določanje mikrobne oz. kvasne biomase sta splošno najbolj v uporabi spektrometrija ter metoda določanja suhe biomase. Določanje suhe biomase ima pred merjenjem optične gostote prednost večje zanesljivosti meritve, vendar pa splošno uporabnost metode zmanjšuje zamudnost postopka. Temu problemu se izognemo z uporabo spektroskopske metode merjenja optične gostote, ki jo odlikuje hitro in enostavno merjenje. Podatki pridobljeni s tema dvema metodama niso direktno primerljivi.

### 2.2 DOSEDANJA RAZISKOVANJA

Metoda merjenja optične gostote je zaradi svojih številnih prednosti široko v uporabi. Veliko se uporablja tudi v biotehnologiji in sicer na številnih področjih. V nadaljevanju kratko predstavljamo le nekatera izmed njih.

Merjenje optične gostote je bilo nepogrešljivo v primerih, ko so za raziskave potrebovali celice v eksponentni fazi rasti. S spremljanjem optične gostote kulture od inokulacije dalje so namreč lahko ocenili, kdaj so celice prešle v eksponentno fazo rasti. Nadaljevanje poskusa je bilo za vsako raziskavo različno (Jamnik in Raspor, 2003; Jamnik in Raspor, 2005; Paš in sod., 2004; Poljšak in sod., 2005; Povhe Jemec in Raspor, 2005). Metodo so uporabili tudi za pripravo suspenzije mikroorganizmov s primerno gostoto, ki so jo nato uporabili za

inokulacijo gojišča (Raspor in sod., 2005; Poljšak in sod., 2005; Plaper in sod., 2002). Določevali so tudi optično gostoto kulture levcinskih avksotrofnih sevov *Saccharomyces cerevisiae* v odvisnosti od začetne koncentracije levcina v gojišču (Çakar in sod., 1999). Metoda je bila uporabna tudi za določitev optimalne rastne temperature hibridov termotolerantnih sevov *Saccharomyces cerevisiae*, kjer je postopek temeljil na spektrofotometričnem spremljanju rasti posameznih hibridov pri različnih temperaturah z merjenjem optične gostote suspenzij posameznih hibridov (Rainieri in sod., 1998). Metodo določanja *OD* so uporabili pri študijah tolerance mikroorganizmov na različne stresne dejavnike v okolju (Bisconti in sod., 1997; Fujs in sod., 2005; Jamnik in Raspor, 2003; Raspor in sod., 2003). Podobno se je metoda izkazala za priročno in uporabno tudi pri ocenjevanju rasti različnih mikroorganizmov v odvisnosti od vsebnosti različnih fiziološko aktivnih snovi v gojišču. Študij vpliva valproata in fenitoina (Esiobu in Hoosein, 2003) ali rast kvasovke *Schizosaccharomyces pombe* ob prisotnosti androstenediona (Długoński in Wilmańska, 1998).

Bolj direktno (tj. pravilnejšo) a tudi bolj zamudno in manj natančno (tj. manj ponovljivo) določanje suhe biomase so uporabili praktično v večini raziskav, kjer je bilo potrebno kvantitativno ovrednotiti vsebnost mikroorganizmov v vzorcu. Najprej in predvsem v smislu direktnega merjenja vsebnosti mikroorganizmov glede na stanje suspenzije mikroorganizmov oz. preiskovanega vzorca. Tako npr. pri spremljanju rasti kulture (Rajoka in sod., 2004; Serra in sod., 2003), določanju biomasnega donosa (Gardner in sod., 2005; Møller in sod., 2004; Londesborough, 2001) ali določanju biomasnega deleža celičnih komponent (Rajoka in sod., 2004; Shang in sod., 2006; Bednarski in sod., 2004). Pogosto se metoda uporablja tudi pri okoljevarstvenih oz. potencialno okoljevarstvenih raziskavah, npr. pri študiju možnosti odstranjevanja škodljivih snovi - predvsem težkih kovin (uranovih in svinčevih spojin) iz okolja (Riordan in sod., 1997; Riordan in McHale, 1998) ali pa pri študiju mikroorganizmov na osiromašenih gojiščih (Pitkänen in sod., 2005; Shang in sod., 2006).

Refleksijo svetlobe so uporabljali tudi pri ocenjevanje koncentracije biomase. V tem primeru so določili povezavo med odbojem svetlobe in koncentracijo biomase za *Saccharomyces cerevisiae*, ki so jo gojili v kemostatu. On-line merjenje refleksije svetlobe in off-line določanje vsebnosti suhe kvasne biomase je potekalo pri različnih hitrostih razredčevanja. Vsebnost suhe kvasne biomase so določili tako, da so določen volumen kulture prefiltrirali skozi stehtan poliamidni membranski filter, ki so ga nato sprali s destilirano vodo, posušili in stehtali. Povezavo med refleksijo svetlobe in vsebnostjo suhe kvasne biomase so opisali s polinomom drugega reda, ki so ga izračunali po metodi najmanjših kvadratov (Poilpre in sod., 2002).

### 2.3 CILJI

Pri naši diplomski nalogi smo preučevali povezavo med optično gostoto kvasne suspenzije in vsebnostjo suhe kvasne biomase v tej suspenziji. Upoštevali smo, da je merjenje vsebnosti suhe biomase časovno zahtevno, čeprav lahko postopek pospešimo, če namesto centrifugiranja uporabimo filtracijo suspenzije. Optično gostoto pa nasprotno lahko določamo hitro in enostavno, lahko jo spremljamo tudi on-line. Zasledili pa smo tudi objave, kjer so sistematično obravnavali skupaj obe metodi (Batič in Raspor, 2000; Poilpre in sod., 2002; Serra in sod., 2003; Serra in sod., 2005). Prikazana zveza med spremenljivkama je bila polinom druge stopnje (Poilpre in sod., 2002; Batič in Raspor, 2000), praviloma uporabljena le za tisti del rastne krivulje, ki je bil za raziskavo relevanten.

Cilj diplomske naloge je kritično primerjati omenjeni metodi in po možnosti določiti faktor oz. algoritem, ki bo v določenih razmerah in za določeno kulturo omogočal direkten preračun rezultatov, ki so bili pridobljeni z metodo merjenja optične gostote v vrednosti za suho biomaso in obratno.

## 2.4 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavljamo, da za alikvote istih vzorcev obstaja linearna povezava med vrednostmi za oceno rasti kvasovk, dobljenimi z metodo merjenja suhe biomase in vrednostmi, dobljenimi z merjenjem optične gostote.

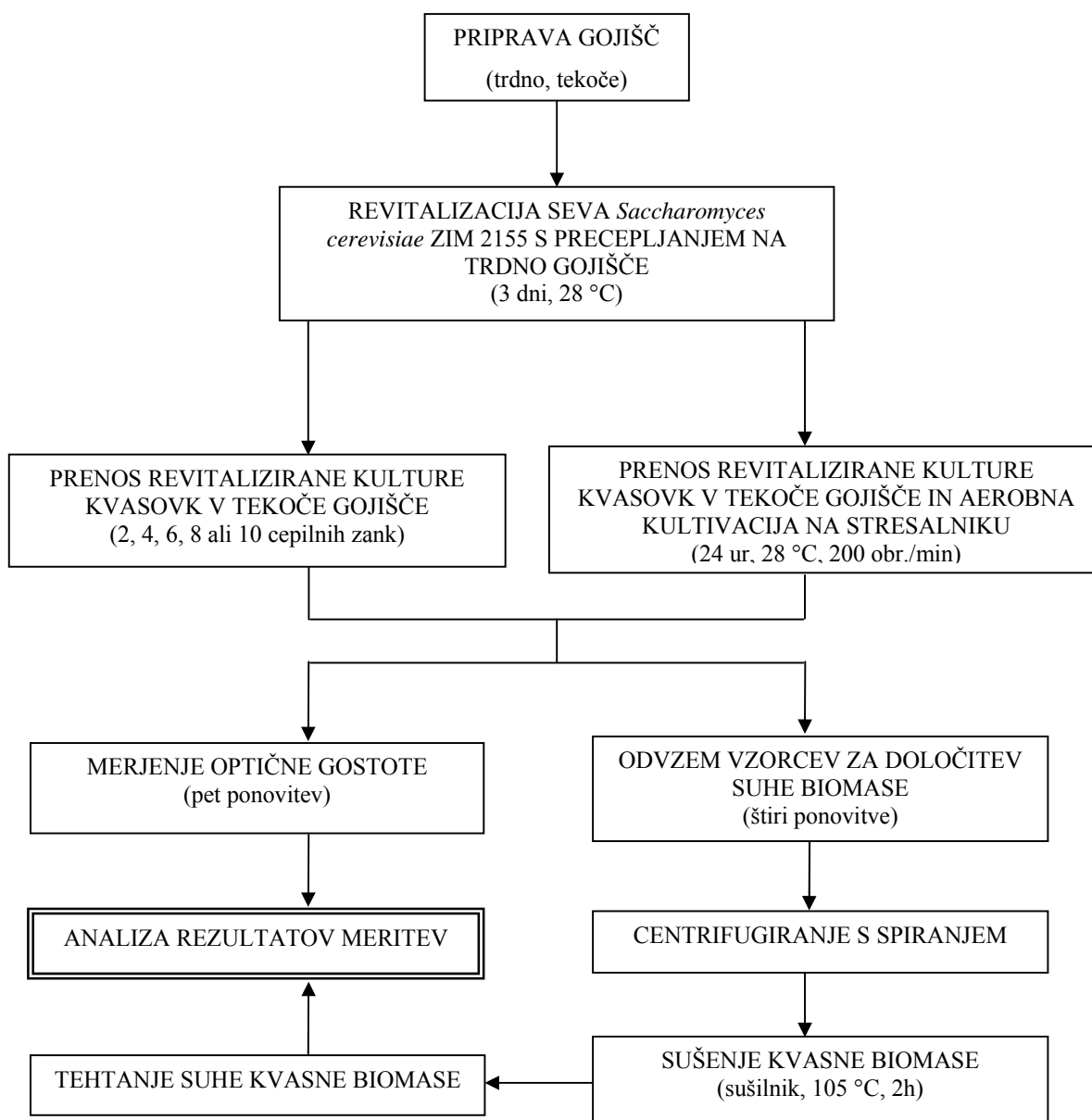
Z grafično primerjavo optične gostote in vsebnosti suhe biomase dobimo umeritveno krivuljo. Predpostavljamo, da pri gojenju različnih vrst kvasovk in uporabi različnih gojišč dobimo tudi različne umeritvene krivulje. Zatorej trdimo, da je potrebno za vsako vrsto kvasovke in vsako vrsto uporabljenega rastnega medija narediti novo umeritveno krivuljo. Pri tem diplomskem delu smo se osredotočili le na kvasovko vrste *Saccharomyces cerevisiae* in gojišče YEPD.



### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 DELOVNI POSTOPEK

Potek eksperimentalnega dela prikazuje slika 1.



Slika 1: Hodogram poteka eksperimentalnega dela

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Delovni mikroorganizem

Kvasni sev *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 smo dobili iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Biotehniške fakultete (Katedra za Biotehnologijo).

### 3.2.2 Gojišča

#### 3.2.2.1 Trdno YEPD gojišče (Atlas, 1993)

Sev *S. cerevisiae* ZIM 2155 smo revitalizirali na trdnem YEPD gojišču.

Preglednica 1: Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993):

Sestavina	Proizvajalec	Masa (g)
kvasni ekstrakt	Biolife	10
glukoza (brezvodna)	Kemika	20
pepton	Oxoid	20
agar	Biolife	20
destilirana voda	–	do 1000 mL

Sestavine za trdno gojišče (preglednica 1) smo zatehtali direktno v infuzijsko steklenico, dodali ustrezno količino vode in mešanico premešali z magnetnim mešalom. Gojišče smo nato segrevali v mikrovalovni pečici do zavretja, tako da se je agar raztopil. Med segrevanjem smo ročno mešali gojišče v steklenici, ker se je agar posedal na dno. Zamašek na steklenici smo imeli med segrevanjem rahlo odvit, ker sicer pride v steklenici do nadtlaka, kar je posledica segrevanja vsebine steklenice. Sledilo je avtoklaviranje ( $t = 20$  min,  $T = 120$  °C,  $p = 1.1$  bar). Preden smo po avtoklaviranju vzeli steklenico iz avtoklava, smo do konca zavili zamašek na steklenici, saj podtlak v steklenici povzroči, da kontaminiran zrak vdre v notranjost steklenice,

kar lahko povzroči kontaminacijo gojišča. Po sterilizaciji smo gojišče v vodni kopeli ohladili na 50 °C in ga v brezprašni komori ob gorilniku razlili v petrijeve plošče ter pustili, da se je strdilo.

### 3.2.2.2 Tekoče YEPD gojišče (Atlas, 1993)

Tri dni staro kulturo seva *S. cerevisiae* ZIM 2155 smo nacepili iz trdnega YEPD gojišča v tekoče YEPD gojišče.

Preglednica 2: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993):

Sestavina	Proizvajalec	Masa (g)
kvasni ekstrakt	Biolife	10
glukoza (brezvodna)	Kemika	20
pepton	Oxoid	20
destilirana voda	–	do 1000 mL

Tekoče gojišče YEPD smo pripravili tako, da smo vse sestavine (preglednica 2) zatehtali v čašo in dodali vodo. Mešanico smo dobro premešali z magnetnim mešalom in jo nato po 300 mL razdelili v 1000 mL erlenmajerice s stransko kiveto, pri čemer smo si pomagali z merilnim valjem. Iz vate in aluminijaste folije smo naredili zamaške in z njimi zamašili erlenmajerice. Tako pripravljeno gojišče smo nato sterilizirali v avtoklavu ( $t = 20$  min,  $T = 120$  °C,  $p = 1,1$  bar).

### 3.2.3 Oprema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednjo opremo:

- Aparature
  - avtoklav (Sutjeska)
  - avtomatska pipeta (Gilson, 10 mL)
  - brezprašna komora (Iskra PIO LFVP122)
  - centrifuga (Tehtnica Železniki LC-321)
  - eksikator
  - hladilnik (LTH, Škofja Loka)
  - magnetno mešalo (Tehtnica Železniki)
  - mešalo za epruvete (Tehtnica Železniki)
  - mikrovalovna pečica (Sanyo)
  - rotacijski stresalnik (Mrzel)
  - spektrofotometer (Iskra MA 9510)
  - sušilnik (Sutjeska)
  - tehtnici Mettler Toledo AT201 in Sartorius
  - vodna kopel (Heto)
  
- Steklovina in potrošni material
  - aluminijasta folija
  - čaše (2000 mL, 1000 mL)
  - erlenmajerice s stransko kiveto (1000 mL)
  - merilni valj (500 mL)
  - nastavki za pipeto (10 mL)
  - petrijeve plošče (Golias)

- steklene centrifugirke (10 mL)
- infuzijske steklenice (1000 mL)
- stojala za steklene centrifugirke
- vata

### 3.3 METODE DELA

#### 3.3.1 Revitalizacija kulture kvasovk

Sev *S. cerevisiae* ZIM 2155 smo revitalizirali z večkratnim precepljanjem na trdno gojišče. Po vsaki nacepiti smo kulturo aerobno inkubirali tri dni.

#### 3.3.2 Aerobna kultivacija na stresalniku

Tri dni staro revitalizirano kulturo smo inokulirali v tekoče gojišče YEPD in jo nato aerobno kultivirali na stresalniku pri temperaturi 28 °C in 200 obr./min. Med kultivacijo smo suspenziji določali optično gostoto in vsebnost suhe kvasne biomase.

#### 3.3.3 Določanje optimalnega števila cepilnih zank za inokulacijo gojišča

Pet erlenmajeric s stransko kiveto smo paralelno inokulirali z dvema, štirimi, šestimi, osmimi ali desetimi zankami tri dni stare kulture seva *S. cerevisiae* ZIM 2155. Po mešanju brozge do popolne resuspenzije kvasa smo vsaki raztopini določili optično gostoto v petih ponovitvah (točka 3.3.4) in vsebnost suhe biomase v štirih ponovitvah (točka 3.3.5).

### **3.3.4 Merjenje optične gostote**

S suspenzijo celic smo napolnili stransko kiveto in izmerili *OD* pri valovni dolžini 650 nm. Meritev smo naredili v petih ponovitvah vsaki dve uri. Pred vsakim merjenjem smo kvasno suspenzijo v erlenmajerici premešali. Spektrofotometer smo predhodno umerili na tekoče gojišče YEED.

### **3.3.5 Določanje mase suhe kvasne biomase**

Med aerobno kultivacijo kvasovke smo vsaki dve uri iz brozge v vsako od štirih centrifugirk odmerili po 6 mL suspenzije celic. Pred vsakim odvzemom smo suspenzijo dobro premešali, da je ohranila homogenost. Suspenzije smo centrifugirali 5 min pri 4000 obr./min, odlili supernatant, usedlino celic 1-krat spirali z destilirano vodo, ponovno centrifugirali in zadnjič odlili supernatant. Mokro kvasno biomaso, ki je ostala na dnu centrifugirke smo bodisi pred sušenjem shranili v hladilniku, pri čemer smo predhodno centrifugirke prekrili z aluminijasto folijo, bodisi direktno posušili tako, da smo jih dve uri sušili v pečici pri temperaturi 105 °C. Sledil je prenos centrifugirk v eksikator, kjer so se ohladile. Centrifugirke smo nato prekrili z zamaški in jih stekali. Od zatehtane količine smo nato odšteli težo čistih centrifugirk skupaj z zamaški, rezultat je bila masa suhe kvasne biomase.

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI MERITEV

Preglednice 3 do 8 podajajo rezultate določanja vsebnosti suhe kvasne biomase in optične gostote za vse obravnavane vzorce. Ob povprečju štirih (v enem primeru dveh) ponovitev za določanje suhe kvasne biomase in petih ponovitev za določanje optične gostote je pri vsakem vzorcu podana tudi pripadajoča standardna deviacija, medtem ko so posamezne meritve pregledno navedene v prilogi (Poglavje PRILOGA) kot Priloga A1 in Priloge od B1 do B5.

Preglednica 3: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od števila cepilnih zank kvasne biomase, ki smo jih dodali v gojišče

<b>Število cepilnih zank</b>	<b>Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem številu cepilnih zank (g/L) (n = 4)</b>	<b>Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem številu cepilnih zank (g/L)</b>	<b>Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem številu cepilnih zank (n = 5)</b>	<b>Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem številu cepilnih zank</b>
2	0,0567	0,0126	0,1838	0,0042
4	0,0975	0,0399	0,3936	0,0005
6	0,1550	0,0136	0,5148	0,0013
8	0,3183	0,0342	0,7616	0,0015
10	0,4138	0,0660	0,8540	0,0012

Preglednica 4: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (prvi poskus)

<b>Čas (h)</b>	<b>Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L) (n = 4)</b>	<b>Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)</b>	<b>Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času (n = 5)</b>	<b>Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času</b>
0	0,1412	0,0257	0,2050	0,0058
2	0,1000	0,0412	0,2006	0,0009
4	0,2033	0,0178	0,3370	0,0025
6	0,4037	0,0257	0,6156	0,0019
8	0,9112	0,0093	1,0116	0,0101
10	1,6283	0,0965	1,4080	0,0010
12	2,6645	0,2756	1,7076	0,0037
24	4,7838	0,0382	1,9522	0,0026



Preglednica 5: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (drugi poskus)

<b>Čas (h)</b>	<b>Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L) (n = 4)</b>	<b>Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)</b>	<b>Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času (n = 5)</b>	<b>Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času</b>
0	0,1379	0,0067	0,2030	0,0032
2	0,1462	0,0085	0,2016	0,0026
4,25	0,2517	0,0282	0,3622	0,0032
6	0,5483	0,0127	0,6472	0,0041
8	1,0746	0,0125	1,0276	0,0092
10	2,0079	0,0290	1,3974	0,0075
12,67	3,6038	0,4296	1,6852	0,0066
24	4,9133	0,0549	1,9048	0,0018

Preglednica 6: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (tretji poskus)

<b>Čas (h)</b>	<b>Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L) (n = 4)</b>	<b>Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)</b>	<b>Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času (n = 5)</b>	<b>Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času</b>
0	0,1221	0,0357	0,1960	0,0035
2	0,1458	0,0321	0,2174	0,0042
4,125	0,3196	0,0385	0,5054	0,0077
6,125	0,7067	0,0323	0,9318	0,0090
8,125	1,6908	0,0274	1,4445	0,0066
10,125	3,0963	0,0747	1,8085	0,0043
12,125	3,3171	0,0657	1,8554	0,0026

Preglednica 7: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (četrti poskus)

<b>Čas (h)</b>	<b>Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L) (n = 4)</b>	<b>Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)</b>	<b>Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času (n = 5)</b>	<b>Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času</b>
0	0,1000	0,0222	0,2154	0,0048
2	0,2029	0,0338	0,2536	0,0060
4,083	0,3525	0,0389	0,5506	0,0064
6,125	0,7938	0,0395	0,9984	0,0144
8,125	1,9663	0,0409	1,5128	0,0113
10,125	3,3392*	0,0601	1,8260	0,0020
12,125	3,0692	0,0731	1,8498	0,0023

\* n = 2

Preglednica 8: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (peti poskus)

Čas (h)	Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L) (n = 4)	Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času (n = 5)	Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času
14	3,7304	0,0852	1,8309	0,0040
16	3,9704	0,0615	1,8831	0,0010
18	4,5704	0,0152	1,9120	0,0025
20	4,7854	0,0923	1,9350	0,0031
22	5,0025	0,0189	1,9466	0,0032
24	4,8188	0,0516	1,9545	0,0032

## 4.2 DOLOČITEV ALGORITMA ZA OPIS ODVISNOSTI OPTIČNE GOSTOTE OD VSEBNOSTI SUHE BIOMASE

### 4.2.1 Glajenje krivulje z algoritmi za polinome druge, tretje in četrte stopnje

V preglednicah 9, 10 in 11 so pregledno podani koeficienti polinomov druge (preglednica 9), tretje (preglednica 10) in četrte (preglednica 11) stopnje kot smo jih dobili z glajenjem krivulj s programom Origin 6.1. Podani so za vsak poskus posebej in na koncu še sumarno za vse meritve. Iz oznake upoštevanih preglednic v prvem stolpcu je enoznačno razviden poskus, za katerega veljajo koeficienti v posamezni vrstici.

Preglednica 9: Optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase: polinom druge stopnje

$$OD = a_0 + a_1 \cdot (s. s.) + a_2 \cdot (s. s.)^2$$

Iz preglednice	N	$a_0 \pm \Delta a_0$	$a_1 \pm \Delta a_1$ (L/g)	$a_2 \pm \Delta a_2$ (L <sup>2</sup> /g <sup>2</sup> )	R <sup>2</sup>	SD
3**	5	0,01097 ± 0,07568	3,93438 ± 0,86835	- 4,66846 ± 1,81614	0,98586	0,04579
4	8	0,16015 ± 0,05385	0,93748 ± 0,07583	- 0,11876 ± 0,01577	0,98763	0,09162
5	8	0,16238 ± 0,06460	0,79340 ± 0,08954	- 0,09207 ± 0,01830	0,98296	0,10460
6	7	0,10413 ± 0,05785	1,15903 ± 0,11773	- 0,19359 ± 0,03387	0,99192	0,07904
7	7	0,12667 ± 0,06736	1,09891 ± 0,13335	- 0,17731 ± 0,03850	0,98931	0,09007
8***	6	0,72488 ± 0,85479	0,45671 ± 0,39730	- 0,04242 ± 0,04565	0,94058	0,01471
4-8	36	0,17654 ± 0,02930	0,86899 ± 0,03724	- 0,10652 ± 0,00766	0,98236	0,09600
3-8	41	0,22585 ± 0,03177	0,84040 ± 0,04429	- 0,10268 ± 0,00928	0,97153	0,11940

\*\* Drugačno gojitveno okolje kot za ostale poskuse.

\*\*\* Serija vzorcev zajema samo take z velikimi optičnimi gostotami.

N - število vzorčenj

Preglednica 10: Optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase: polinom tretje stopnje

$$OD = a_0 + a_1 \cdot (s. s.) + a_2 \cdot (s. s.)^2 + a_3 \cdot (s. s.)^3$$

Iz preglednice	N	$a_0 \pm \Delta a_0$	$a_1 \pm \Delta a_1$ (L/g)	$a_2 \pm \Delta a_2$ (L <sup>2</sup> /g <sup>2</sup> )	$a_3 \pm \Delta a_3$ (L <sup>3</sup> /g <sup>3</sup> )	R <sup>2</sup>	SD
3**	5	-0,12121 ± 0,11144	6,55515 ± 1,97277	-17,91743 ± 9,42866	18,80417 ± 13,21684	0,99532	0,03724
4	8	0,06789 ± 0,03110	1,35866 ± 0,09699	-0,38027 ± 0,05692	0,03734 ± 0,00807	0,99805	0,04062
5	8	0,05546 ± 0,02082	1,20908 ± 0,05412	-0,32644 ± 0,02803	0,03198 ± 0,00377	0,99910	0,02684
6	7	-0,00726 ± 0,02925	1,75956 ± 0,11971	-0,70126 ± 0,09558	0,10313 ± 0,01926	0,99923	0,02809
7	7	0,03126 ± 0,07539	1,57115 ± 0,28219	-0,54858 ± 0,20773	0,07268 ± 0,04022	0,99488	0,07196
8***	6	-6,98172 ± 10,39114	5,77214 ± 7,15146	-1,25714 ± 1,63210	0,09202 ± 0,12358	0,95348	0,01594
4-8	36	0,07372 ± 0,02374	1,27106 ± 0,06205	-0,32175 ± 0,03107	0,02866 ± 0,00409	0,99305	0,06120
3-8	41	0,13773 ± 0,03334	1,21616 ± 0,09481	-0,30734 ± 0,04824	0,02747 ± 0,00639	0,98101	0,09883

\*\* Drugačno gojitveno okolje kot za ostale poskuse.

\*\*\* Serija vzorcev zajema samo take z velikimi optičnimi gostotami.

N – število vzorčenj

Preglednica 11: Optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase: polinom četrte stopnje

$$OD = a_0 + a_1 \cdot (s. s.) + a_2 \cdot (s. s.)^2 + a_3 \cdot (s. s.)^3 + a_4 \cdot (s. s.)^4$$

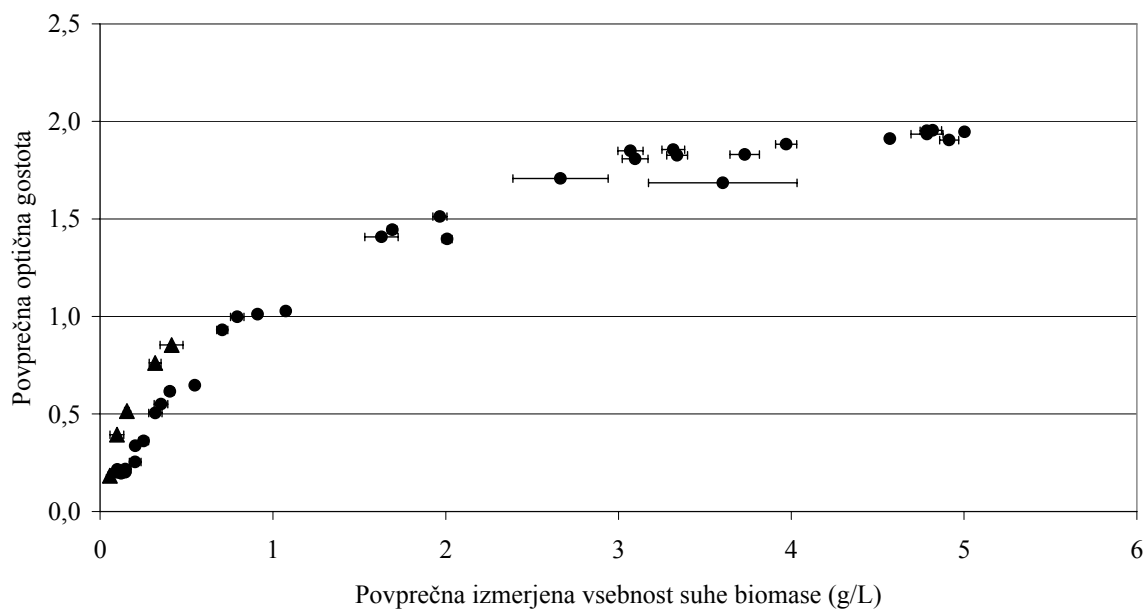
Iz preglednice	N	$a_0 \pm \Delta a_0$	$a_1 \pm \Delta a_1$ (L/g)	$a_2 \pm \Delta a_2$ (L <sup>2</sup> /g <sup>2</sup> )	$a_3 \pm \Delta a_3$ (L <sup>3</sup> /g <sup>3</sup> )	$a_4 \pm \Delta a_4$ (L <sup>4</sup> /g <sup>4</sup> )	R <sup>2</sup>	SD
3**	5 <sup>#</sup>	-0,45145 ± 0	16,09906 ± 0	-102,02790 ± 0	293,53443 ± 0	-296,19790 ± 0	1 <sup>#</sup>	0 <sup>#</sup>
4	8	0,02343 ± 0,03919	1,66618 ± 0,21500	-0,76489 ± 0,25263	0,18781 ± 0,09720	-0,01737 ± 0,01119	0,99892	0,03493
5	8	0,01969 ± 0,01527	1,41242 ± 0,06673	-0,53766 ± 0,06437	0,10143 ± 0,02069	-0,00704 ± 0,00209	0,99981	0,01416
6	7	-0,04177 ± 0,01425	2,01057 ± 0,07687	-1,08521 ± 0,10005	0,29733 ± 0,04747	-0,03043 ± 0,00734	0,99992	0,01111
7	7	-0,02650 ± 0,09046	1,98868 ± 0,47183	-1,19366 ± 0,62678	0,39329 ± 0,29751	-0,04919 ± 0,04525	0,99678	0,06988
8***	6	-207,84537 ± 114,23117	192,44243 ± 106,06272	-66,02775 ± 36,77837	10,03680 ± 5,64484	-0,57012 ± 0,32357	0,98867	0,01113
4-8	36	0,03257 ± 0,02908	1,50781 ± 0,12164	-0,56361 ± 0,11279	0,10786 ± 0,03587	-0,00806 ± 0,00363	0,99400	0,05776
3-8	41	0,09518 ± 0,04200	1,47656 ± 0,18648	-0,58076 ± 0,17626	0,11825 ± 0,05673	-0,00931 ± 0,00578	0,98229	0,09676

\*\* Drugačno gojitveno okolje kot za ostale poskuse.

\*\*\* Serija vzorcev zajema samo take z velikimi optičnimi gostotami.

# Glajenje krivulje z algoritmom za polinom četrte stopnje je pri N = 5 nesmiselno

N – število vzorčenj



Slika 2: Optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase (meritve iz preglednic 3 do 8)

- kultivacija na stresalniku
- ▲ priprava kvasne suspenzije v YEPD gojišču

V preglednici 12 so pregledno podani koeficienti polinomov prve, druge, tretje in četrte stopnje, kot smo jih dobili z glajenjem krivulje  $OD$  v odvisnosti od  $s. s.$  za  $OD < 1$  pri vseh tistih vzorcih, kjer je kultivacija potekala v okviru kultivacije za rasto krivuljo.



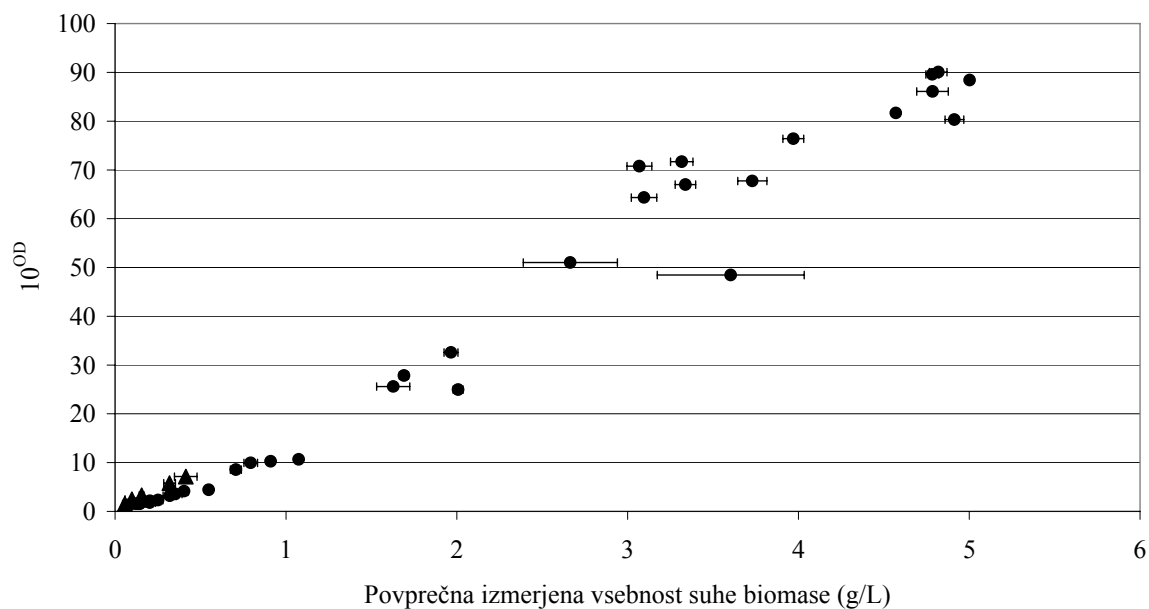
Preglednica 12: Odvisnost optične gostote kvasne suspenzije od vsebnosti suhe biomase za  $OD < 1$  (podatki iz preglednic 4, 5, 6, in 7)

Polinom	N	$a_0 \pm \Delta a_0$	$a_1 \pm \Delta a_1$ (L/g)	$a_2 \pm \Delta a_2$ (L <sup>2</sup> /g <sup>2</sup> )	$a_3 \pm \Delta a_3$ (L <sup>3</sup> /g <sup>3</sup> )	$a_4 \pm \Delta a_4$ (L <sup>4</sup> /g <sup>4</sup> )	R <sup>2</sup>	SD
1. stopnje	16	0,06211 ± 0,01866	1,20774 ± 0,05173	-	-	-	0,97496	0,04376
2. stopnje	16	0,02480 ± 0,03648	1,47996 ± 0,23546	- 0,32464 ± 0,27412	-	-	0,97739	0,04314
3. stopnje	16	-0,00033 ± 0,07847	1,76060 ± 0,80573	- 1,12800 ± 2,2167	0,63100 ± 1,72679	-	0,97764	0,04466
4. stopnje	16	0,20834 ± 0,15009	- 1,27945 ± 2,04911	12,62235 ± 8,85948	- 23,11324 ± 14,95705	13,69687 ± 8,57691	0,98185	0,04203

#### 4.2.2 Eksponentni zvezi:

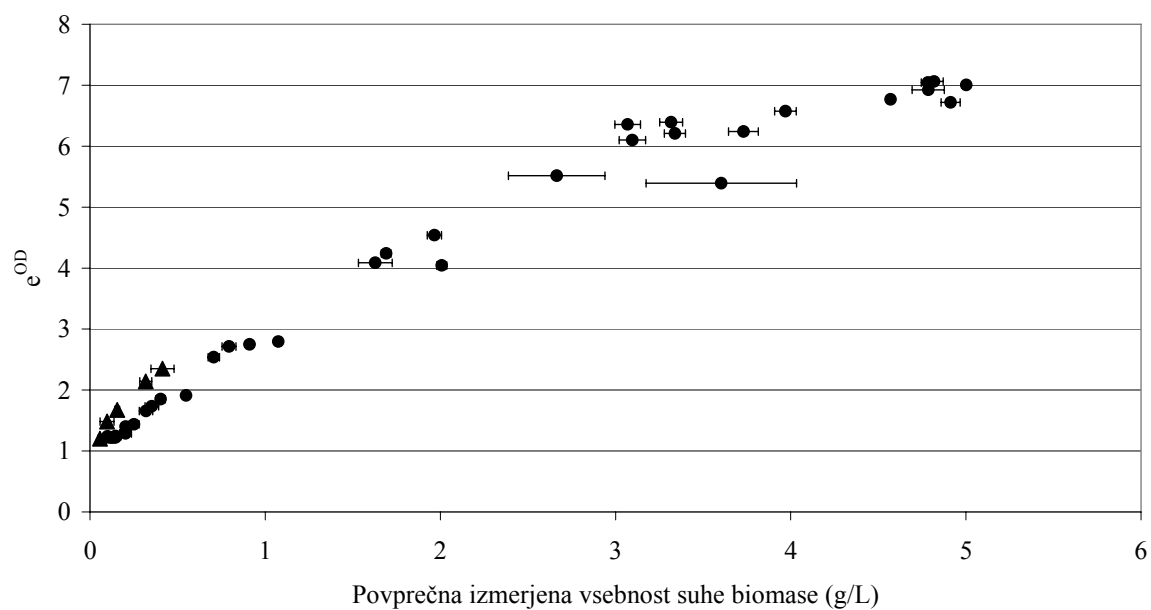
##### Odvisnost $10^{OD}$ od vsebnosti suhe biomase in $e^{OD}$ v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase

Sliki 3 in 4 prikazujeta vrednosti  $10^{OD}$  v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase (slika 3) in vrednosti  $e^{OD}$  v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase (slika 4). Upoštevane so meritve iz preglednic 3 do 8.



Slika 3: Vrednosti  $10^{OD}$  v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase

- kultivacija na stresalniku
- ▲ priprava kvasne suspenzije v YEPD gojišču

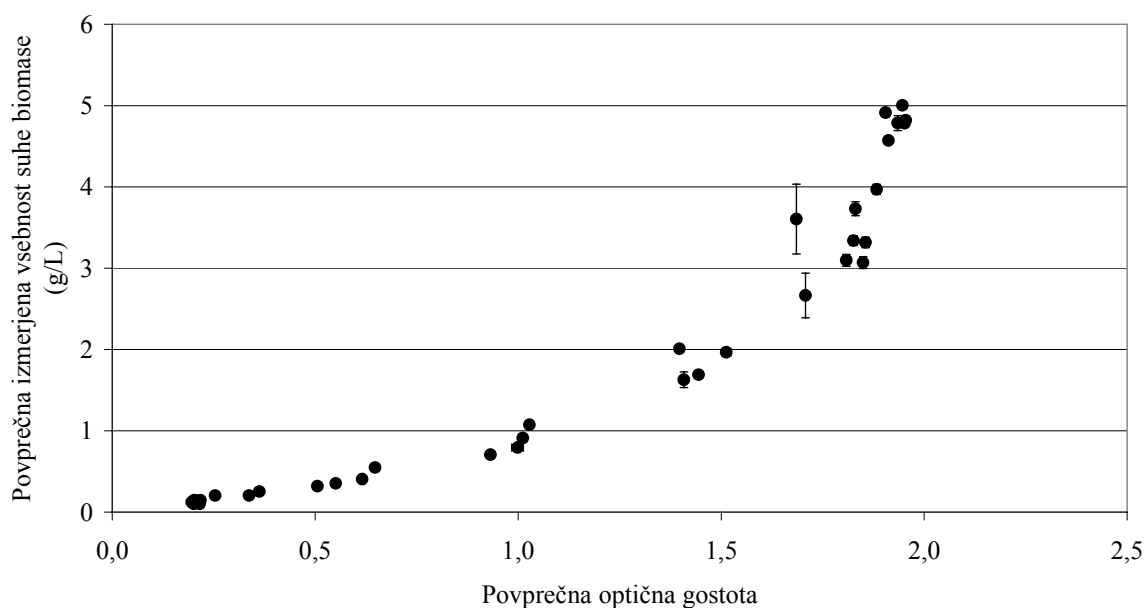


Slika 4: Vrednosti  $e^{OD}$  v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase

- kultivacija na stresalniku
- ▲ priprava kvasne suspenzije v YEPD gojišču

### 4.3 IZRAČUN VSEBNOSTI SUHE BIOMASE IZ OPTIČNE GOSTOTE

Slika 5 prikazuje vsebnosti suhe biomase v odvisnosti od optične gostote (meritve iz preglednic 4 do 8). Krivulja je, glede na rezultate prikazane v poglavju 4.2.1, zglajena s polinomom četrte stopnje, kot je razvidno iz nadaljevanja.



Slika 5: Vsebnosti suhe biomase v odvisnosti od optične gostote (meritve iz preglednic 4 do 8)

Na podlagi analize rezultatov meritev iz poglavja 4.2.1 (dodatne utemeljitve v poglavju 5.2.1) smo izbrali naslednji algoritem za opis odvisnosti optične gostote od vsebnosti suhe biomase:

$$OD = 0,03257 + 1,50781 \cdot (s. s.) - 0,56361 \cdot (s. s.)^2 + 0,10786 \cdot (s. s.)^3 - 0,00806 \cdot (s. s.)^4 \dots (2)$$

(s.s. v g/L in koeficienti v enotah, kot so razvidni iz preglednice 11).

Gre za polinom četrte stopnje, oblike:

$$OD = a_0 + a_1 \cdot (s. s.) + a_2 \cdot (s. s.)^2 + a_3 \cdot (s. s.)^3 + a_4 \cdot (s. s.)^4,$$

kjer v konkretnem primeru pomeni:

$$a_0 = 0,03257 \pm 0,02908$$

$$a_1 = (1,50781 \pm 0,12164) \text{ L/g}$$

$$a_2 = - (0,56361 \pm 0,11279) \text{ L}^2/\text{g}^2$$

$$a_3 = (0,10786 \pm 0,03587) \text{ L}^3/\text{g}^3$$

$$a_4 = - (0,00806 \pm 0,00363) \text{ L}^4/\text{g}^4$$

Iz istih podatkov, iz katerih smo dobili algoritem za opis odvisnosti optične gostote od vsebnosti suhe snovi (2), smo z zamenjavo odvisne in neodvisne spremenljivke izrazili suho snov kot funkcijo optične gostote:

$$(s. s.) = 0,55048 - 3,47694 \cdot (OD) + 8,82229 \cdot (OD)^2 - 6,89557 \cdot (OD)^3 + 1,97717 \cdot (OD)^4 \dots(3)$$

(zaradi preglednosti so enote le v nadaljevanju; s.s. v g/L)

Tudi v tem primeru gre za polinom četrte stopnje, oblike:

$$(s. s.) = a_0 + a_1 \cdot (OD) + a_2 \cdot (OD)^2 + a_3 \cdot (OD)^3 + a_4 \cdot (OD)^4,$$

kjer v konkretnem primeru pomeni:

$$a_0 = (0,55048 \pm 0,52319) \text{ g/L}$$

$$a_1 = - (3,47694 \pm 3,33453) \text{ g/L}$$

$$a_2 = (8,82229 \pm 6,09228) \text{ g/L}$$

$$a_3 = - (6,89557 \pm 4,20339) \text{ g/L}$$

$$a_4 = (1,97717 \pm 0,97382) \text{ g/L}$$

Enačba (3) nam omogoča izračun suhe snovi pri dani optični gostoti. Primer izračuna podaja preglednica 13.

Preglednica 13: Suha biomasa izračunana iz dane optične gostote po enačbi (3)

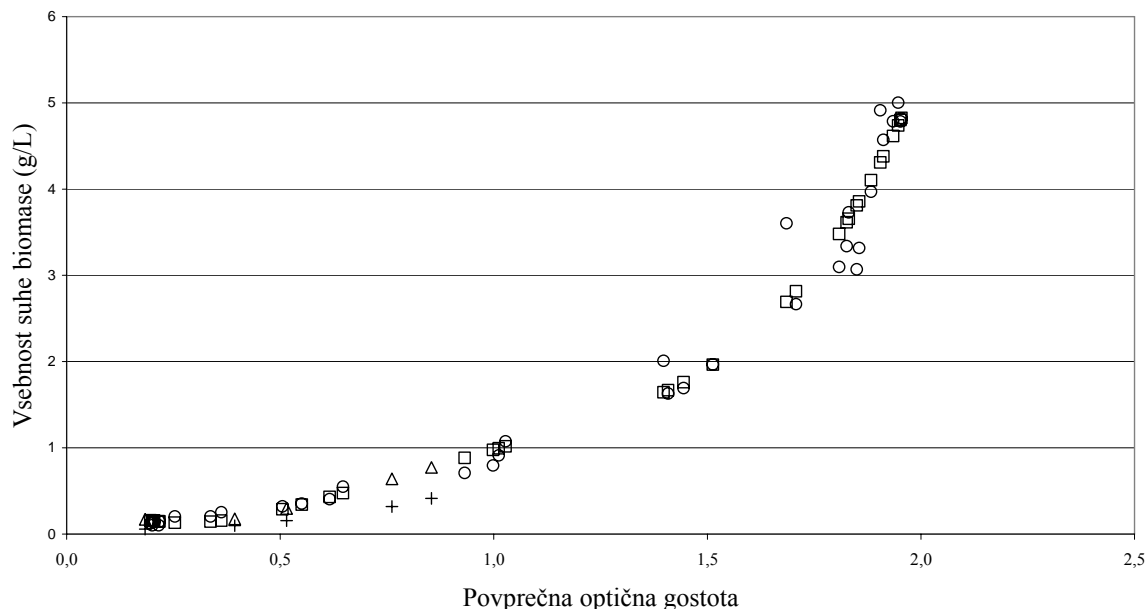
<b>Preglednica</b>	<b>Povprečna optična gostota</b>	<b>Povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L)</b>	<b>Izračunana vsebnost suhe biomase (g/L)</b>
3	0,1838	0,0567	0,1689
	0,3936	0,0975	0,1757
	0,5148	0,1550	0,2967
	0,7616	0,3183	0,6387
	0,8540	0,4138	0,7723
4	0,2050	0,1412	0,1525
	0,2006	0,1000	0,1556
	0,3370	0,2033	0,1423
	0,6156	0,4037	0,4287
	1,0116	0,9112	0,9936
	1,4080	1,6283	1,6678
	1,7076	2,6645	2,8146
	1,9522	4,7838	4,7994
5	0,2030	0,1379	0,1539
	0,2016	0,1462	0,1549
	0,3622	0,2517	0,1549
	0,6472	0,5483	0,4731
	1,0276	1,0746	1,0158
	1,3974	2,0079	1,6423
	1,6852	3,6038	2,6907
	1,9048	4,9133	4,3092
6	0,1960	0,1221	0,1589
	0,2174	0,1458	0,1451
	0,5054	0,3196	0,2855
	0,9318	0,7067	0,8824
	1,4445	1,6908	1,7610
	1,8085	3,0963	3,4803
	1,8554	3,3171	3,8578

(se nadaljuje)

Nadaljevanje preglednice 13: Suha biomasa izračunana iz dane optične gostote po enačbi (3)

<b>Preglednica</b>	<b>Povprečna optična gostota</b>	<b>Povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L)</b>	<b>Izračunana vsebnost suhe biomase (g/L)</b>
7	0,2154	0,1000	0,1462
	0,2536	0,2029	0,1318
	0,5506	0,3525	0,3414
	0,9984	0,7938	0,9752
	1,5128	1,9663	1,9630
	1,8260	3,3392	3,6156
	1,8498	3,0692	3,8102
8	1,8309	3,7304	3,6547
	1,8831	3,9704	4,1037
	1,9120	4,5704	4,3799
	1,9350	4,7854	4,6147
	1,9466	5,0025	4,7384
	1,9545	4,8188	4,8247

Slika 6 prikazuje razlike med izmerjenimi in izračunanimi vsebnostmi za suho biomaso.



Slika 6: Povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L) in izračunana vsebnost suhe biomase (g/L) v odvisnosti od povprečne optične gostote (meritve vzete iz preglednice 3 ter iz preglednic 4 do 8)

- izmerjena vsebnost suhe biomase (preglednice 4 do 8)
- izračunana vsebnost suhe biomase (preglednice 4 do 8)
- + izmerjena vsebnost suhe biomase (preglednica 3)
- △ izračunana vsebnost suhe biomase (preglednica 3)

#### 4.4 PRIMERJAVA RASTNIH KRIVULJ

Slika 7 prikazuje časovno odvisnost izmerjene vsebnosti suhe biomase (*s. s.*) za vse v tem delu vključene poskuse (osnovni podatki v preglednicah 4 do 8).



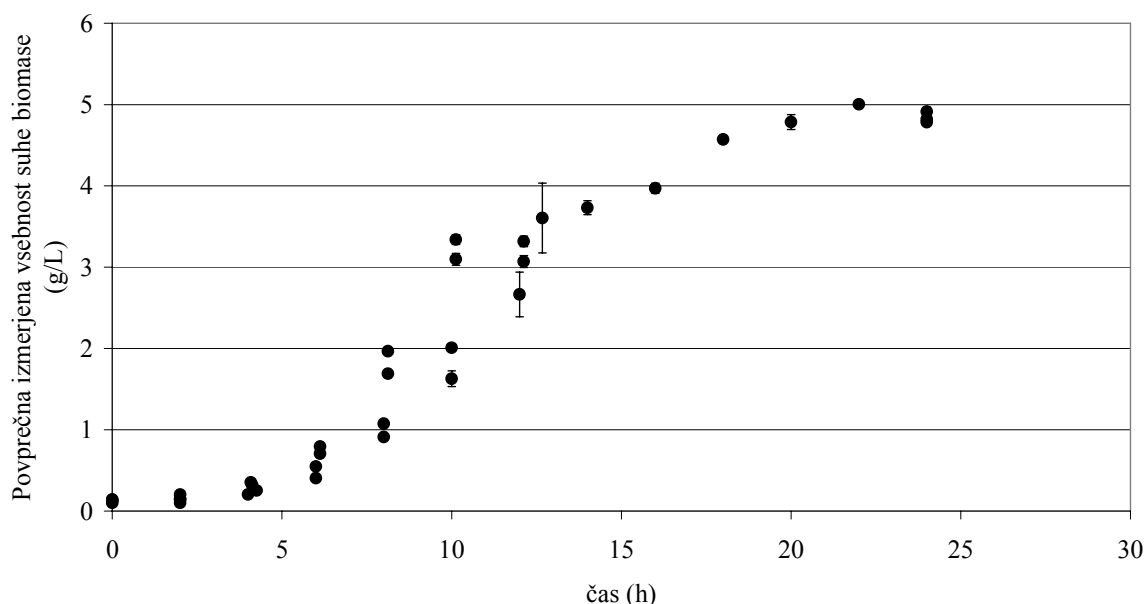
Slika 8 prikazuje časovno odvisnost optične gostote (*OD*) kvasne suspenzije. Zajema meritve *OD* za vse v tem delu vključene poskuse (osnovni podatki v preglednicah 4 do 8).

Slika 9 prikazuje časovno odvisnost izračunane vsebnosti suhe biomase (*s. s.*) kvasne suspenzije. Zajema meritve *OD* za vse v tem delu vključene poskuse (osnovni podatki v preglednicah 4 do 8). Za izračun smo uporabili enačbo (3), pogl. 4.3.

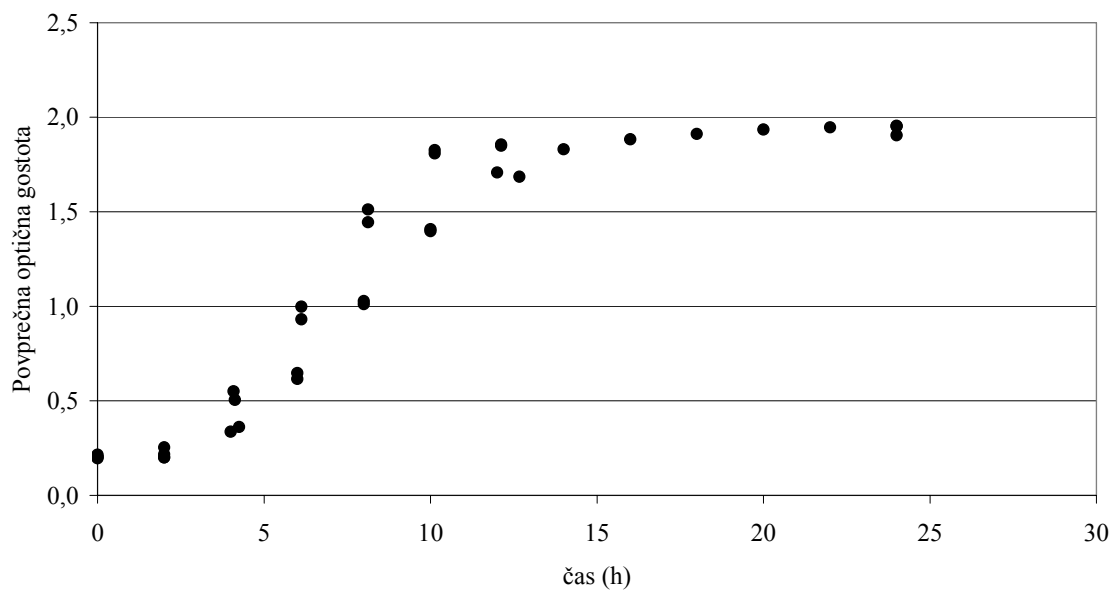
Slika 10 primerjalno združuje sliko 7 in sliko 9.

Slika 11 primerjalno prikazuje rastni krivulji, ki smo ju določili direktno z merjenjem vsebnosti suhe biomase (preglednici 6 in 8) in z merjenjem optične gostote (preglednici 6 in 8), iz katere smo po dobljenem algoritmu (enačba (3)) izračunali vsebnost suhe biomase.

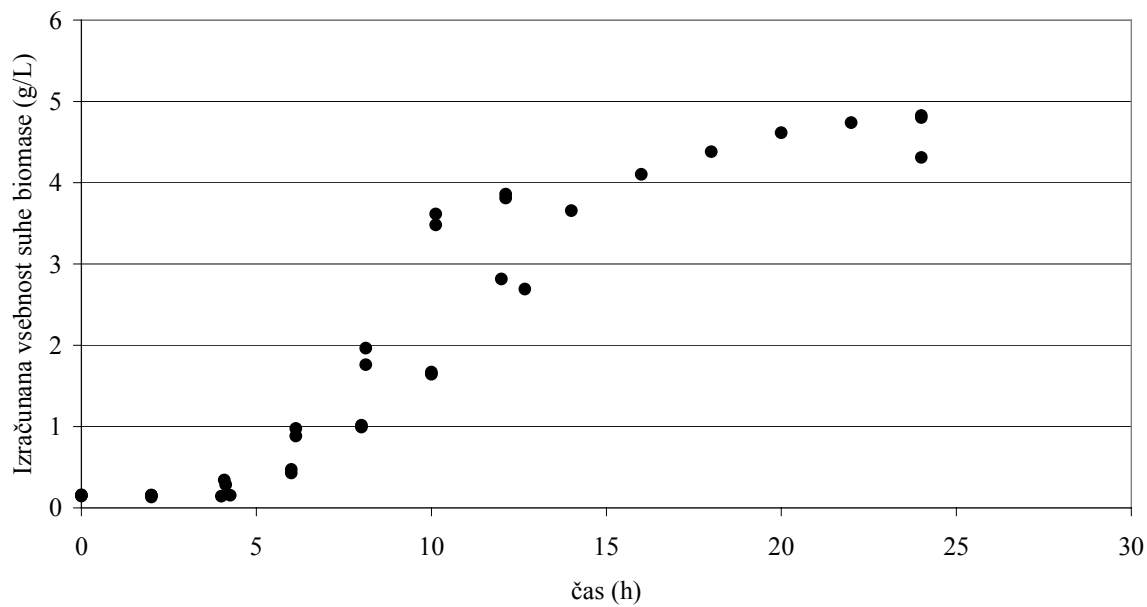
Slika 12 primerjalno prikazuje rastni krivulji s slike 11 ter rastno krivuljo, ki smo jo določili z merjenjem optične gostote (preglednici 6 in 8).



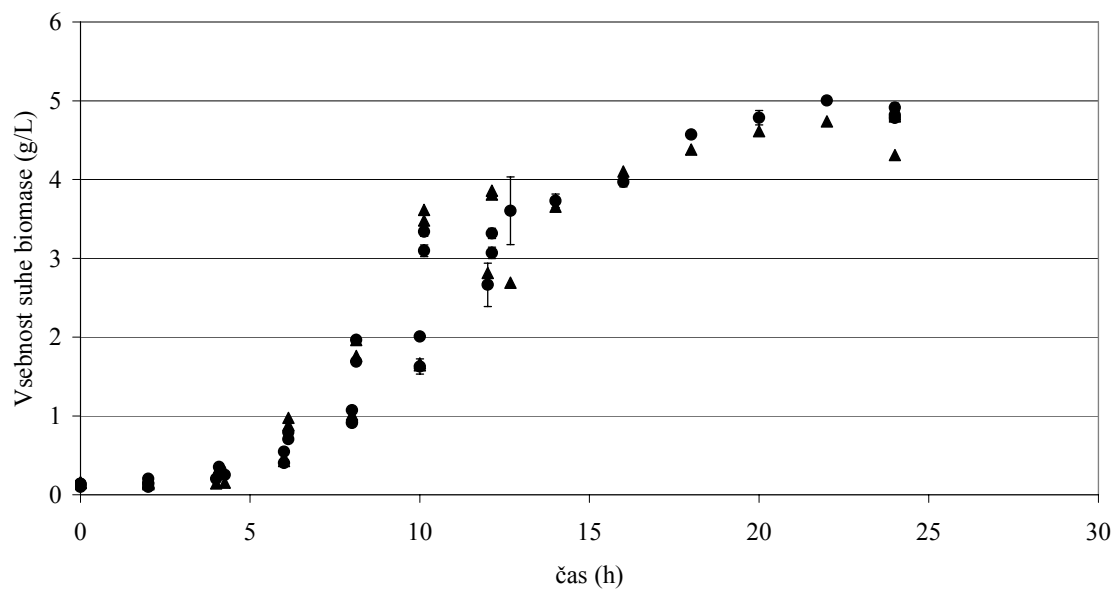
Slika 7: Povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L) v odvisnosti od časa



Slika 8: Povprečna optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa

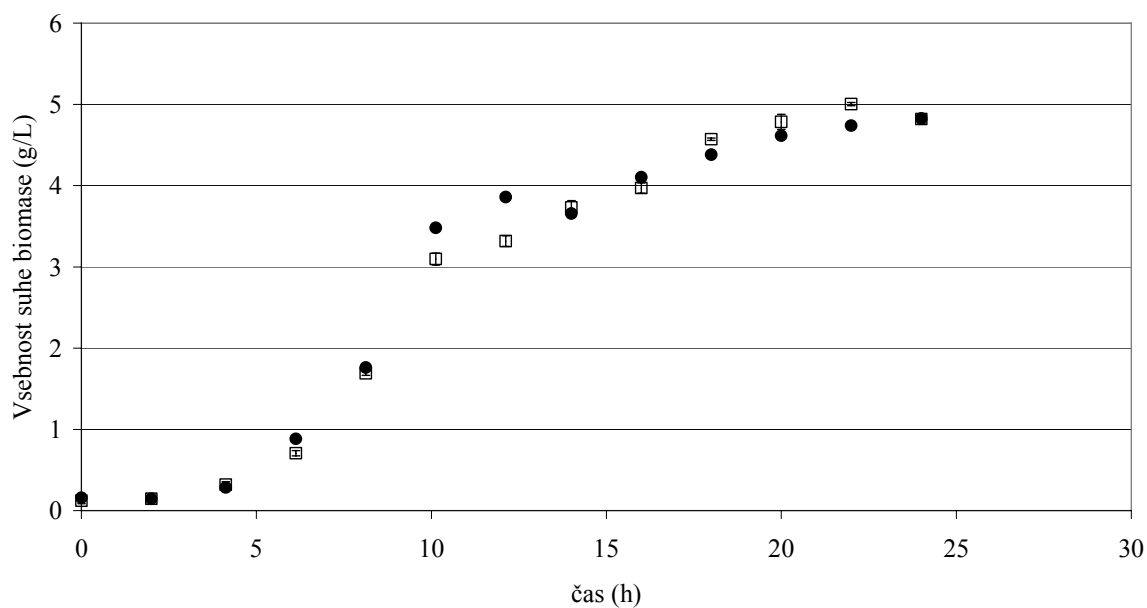


Slika 9: Izračunana vsebnost suhe biomase (g/L) v odvisnosti od časa



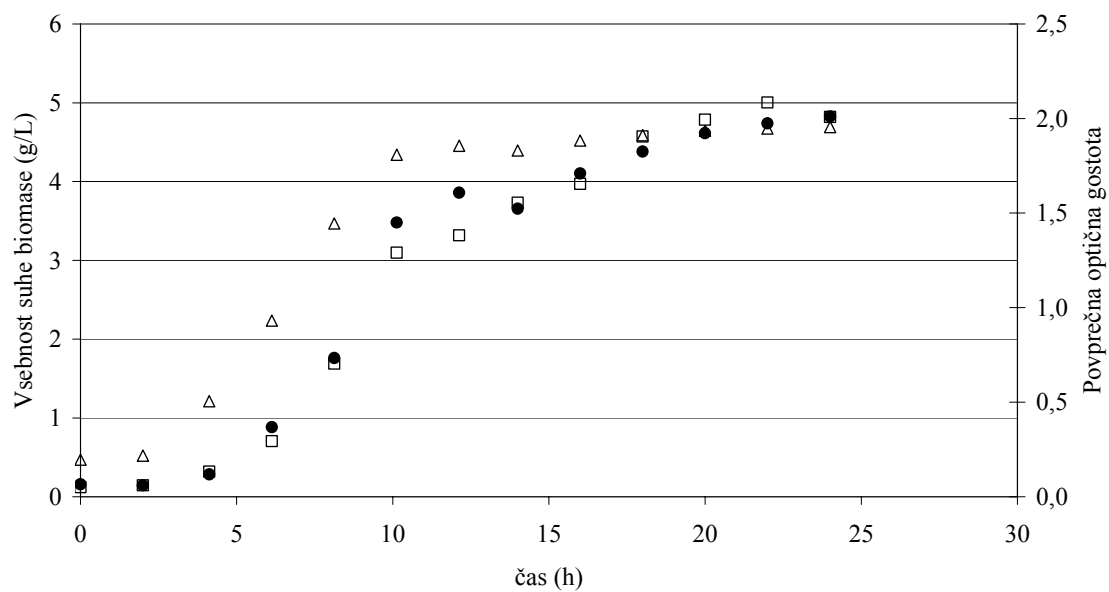
Slika 10: Povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L) in izračunana vsebnost suhe biomase (g/L) v odvisnosti od časa

- izmerjena vsebnost suhe biomase
- ▲ izračunana vsebnost suhe biomase



Slika 11: Povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L) in izračunana vsebnost suhe biomase v odvisnosti od časa (meritve vzete iz preglednic 6 in 8)

- izmerjena vsebnost suhe biomase
- izračunana vsebnost suhe biomase



Slika 12: Optična gostota, povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase (g/L) in izračunana vsebnost suhe biomase (g/L) v odvisnosti od časa

- povprečna izmerjena vsebnost suhe biomase
- izračunana vsebnost suhe biomase
- △ povprečna optična gostota

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Izhajajoč iz delovne hipoteze, da za alikvotne vzorce obstaja linearna povezava med vrednostmi za oceno rasti kvasovk, dobljenimi z metodo merjenja suhe biomase in vrednostmi, dobljenimi z merjenjem optične gostote, smo kvasovko *S. cerevisiae* aerobno gojili na stresalniku in z obema metodama sočasno spremljali rast kulture. Iz meritev smo dobili algoritem za izračun vsebnosti suhe biomase iz izmerjene *OD*.

V relevantnih publikacijah so konkretni koeficienti in algoritmi navajani le izjemoma (Batič in Raspor, 2000; Poilpre in sod., 2002; Serra in sod., 2003; Serra in sod., 2005), saj sami po sebi niso predmet obravnave.

### 5.1 PONOVLJIVOST MERITEV

Pri obravnavanju meritev, ki jih pridobimo z opazovanjem in vrednotenjem živih organizmov, se moramo najprej in predvsem zavedati, da gre za zelo variabilne vzorce. Za vsebnost suhe biomase so bile vrednosti med 0,0567 g/L in 5,0025 g/L, standardne deviacije pa od 0,0067 g/l do 0,4296 g/L, kar pomeni koeficient variabilnosti med 0,33 % in 41 %. Za vrednosti optične gostote so vrednosti za posamezne vzorce bolj ponovljive. Vrednosti med 0,1838 in 1,9545, standardne deviacije med 0,0005 in 0,0144, kar pomeni koeficient variabilnosti med 0,053 % in 2,8 %.

Poleg priročnosti in enostavnosti meritve *OD* je njena večja ponovljivost dodaten razlog za uporabo tega parametra za posredno določanje vsebnosti suhe biomase. Zavedati se moramo, da gre za posredno meritev in je tako nujno poznavanje relevantnih dejavnikov, ki vplivajo na veljavnost algoritma za opis odvisnosti optične gostote od vsebnosti suhe biomase.

## 5.2 DOLOČITEV ALGORITMA ZA OPIS ODVISNOSTI OPTIČNE GOSTOTE OD VSEBNOSTI SUHE BIOMASE

### 5.2.1 Glajenje krivulje z algoritmi za polinome druge, tretje in četrte stopnje

Velike razlike za koeficiente krivulj pri vzorcih neposredno po pripravi suspenzije in pri tistih, kjer poteka kultivacija na stresalniku (prve vrstice v preglednicah 9, 10 in 11 v primerjavi z ostalimi) je možno pojasniti s tem, da gre za različno rastno okolje. Da ne gre le za zmanjšano območje meritev (definijsko območje, tj. *s. s.* le med 0,06 in 0,4 g/L in zaloga vrednosti, tj. *OD* le med 0,18 in 0,85) smo dokazali z glajenjem krivulje *OD* v odvisnosti od *s. s.* za  $OD < 1$  pri vseh tistih vzorcih, kjer je kultivacija potekala v okviru kultivacije za rastno krivuljo. Rezultati so zbrani v preglednici 13 (poglavje 4.2.1), ki kaže, da so koeficienti polinomov, čeprav bistveno različni od koeficientov za celotno rastno območje, vseeno precej bolj podobni koeficientom pri kultivaciji za rastno krivuljo kot pa tistim za pripravo suspenzije. Meritve, ki smo jih dobili pri vzorcih s pripravo suspenzije (preglednica 3) lahko torej le pogojno in z veliko mero previdnosti vključujemo v celostne analize.

Skupina meritev, ki jo zajema preglednica 8 (samo velike vrednosti za *OD*, tj. kultivacija od 14 do 24 ur) je kot samostojna skupina nerepresentativna. Na to nas opozarja relativno majhna vrednost za  $R^2$ , kakor tudi dejstvo, da poteka zglajena krivulja precej mimo koordinatnega izhodišča. Očitno so določene vrednosti predaleč od koordinatnega izhodišča, da bi omogočale tako ekstremno ekstrapolacijo.

Za algoritem opisa odvisnosti optične gostote od vsebnosti suhe biomase upoštevamo polinom četrte stopnje, ki vključuje rezultate iz preglednic 4 do 8, ker obsega

največ meritev ( $N = 36$ ),

kaže veliko vrednost parametra  $R^2$  ( $R^2 = 0,994$ ),

kaže majhno vrednost za koeficient  $a_0$  in

kaže relativno veliko napako za ta koeficient

(zadnji dve trditvi pomenita, da gre v okviru eksperimentalne napake skozi točko (0,0)).

## 5.2.2 Eksponentni zvezi:

### Odvisnost $10^{OD}$ od vsebnosti suhe biomase in $e^{OD}$ v odvisnosti od vsebnosti suhe biomase

Obe eksponentni zvezi ( $10^{OD}$  v odvisnosti od suhe biomase in  $e^{OD}$  v odvisnosti od suhe biomase) kažeta na neprimernost takih slabo občutljivih povezav. Predstavitvi na sliki 3 in sliki 4 jasno kažeta, da bi lahko zadovoljivo predstavili celotno območje meritev le z uporabo večih algoritmov, kar pa ni niti smiselno, niti praktično enostavno izvedljivo. Če bi pri velikih  $OD$  kot smiselno uporabili eksponentno zvezo, se ta pri majhnih  $OD$  izkaže za bistveno premalo občutljivo.

## 5.3 IZRAČUN VSEBNOSTI SUHE BIOMASE IZ OPTIČNE GOSTOTE

Algoritem za izračun vsebnosti suhe biomase iz optične gostote kvasne suspenzije (enačba (3)) smo uporabili za izračun vsebnosti suhe biomase iz izmerjene optične gostote pri vseh obravnavanih vzorcih. Primerjavo izračunanih in izmerjenih vrednosti podajata preglednica 13 in slika 6. Linearizacija odvisnosti izračunane vsebnosti suhe biomase in izmerjene vsebnosti suhe biomase da po pričakovanju premico z  $n = 0$  in  $k = 1$ .

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

y      izmerjena vsebnost suhe biomase

x      izračunana vsebnost suhe biomase

k      smerni koeficient ( $1,00 \pm 0,02681$ )

n      odsek na ordinatni osi ( $-0,00000111 \pm 0,0699$ ) g/L

$$R = 0,988$$

Slika 6 nazorno kaže razlike med izmerjenimi in izračunanimi vrednostmi, posebno pa (ne)ujemanje za vrednosti iz preglednice 3 (drugo gojitveno okolje).



## 5.4 PRIMERJAVA RASTNIH KRIVULJ

Večinoma uporabljamo *OD* za hitro in preprosto določanje faze rasti mikroorganizmov in ne za določanje parametrov, kot je npr. vsebnost (suhe) biomase. Zato smo dobljeni algoritem preizkusili pri določanju rastne krivulje, ki smo jo določili prvič direktno z merjenjem vsebnosti suhe biomase in drugič z merjenjem optične gostote, iz katere smo po dobljenem algoritmu izračunali vsebnost suhe biomase. Primerjava obeh rastnih krivulj je razvidna s slike 11, ki kaže rastni krivulji, kot ju na oba načina dobimo iz meritev v preglednici 6 in preglednici 8.

Prikaz ima »lepotno napako«. Metodološko je nepravilno, da meritve, s katerimi opravimo testiranje modela (tj. testing set) vključimo tudi v pripravo algoritma (tj. v teaching set). Za to ohlapnost v metodologiji smo se kljub temu odločili, ker pomanjšani seti (zmanjšani teaching seti) niso kazali bistvenih razlik pri konstantah polinomov (podrobnosti v preglednicah 9, 10 in 11) in ker je 36 parov meritev ( $N = 36$ ) pri tako variabilnih vzorcih še vedno relativno majhno število.

Rastni krivulji na sliki 11 se razlikujeta le v nekaterih neznčilnih podrobnostih, več kot jasno pa kažeta, da lahko fazo rastne krivulje določimo tako iz ene kot iz druge, torej je hitro in priročno merjenje optične gostote primerno nadomestilo za zamudno določanje vsebnosti suhe biomase.

Celo v primeru, da algoritma za preračun optične gostote v vsebnost suhe biomase ne poznamo, lahko odvisnost *OD* od časa (slika 12, oznaka:  $\Delta$ ) omogoči oceno faze rasti mikroorganizma. Ker je odvisnost optične gostote od vsebnosti suhe biomase vse prej kot linearna, je sicer sigmoidna krivulja (posebno v drugi polovici kultivacije) deformirana, ohranja pa značilnosti, potrebne za določitev osnovnih faz rasti.

## 5.5 SKLEPI

- Metoda merjenja optične gostote je v primerjavi z metodo merjenja vsebnosti suhe biomase bolj priročna, enostavnejša, poleg tega pa tudi natančnejša. Koefficient variabilnosti za izmerjene vsebnosti suhe biomase je bil v našem primeru do 41 %, medtem ko je koefficient variabilnosti za vrednosti optične gostote znašal le do 2,3 %.
- Relativno najboljši algoritem za opis odvisnosti optične gostote od vsebnosti suhe biomase je v našem primeru polinom četrte stopnje. Linearizacija zveze med optično gostoto in vsebnostjo suhe biomase z eksponentnima funkcijama  $10^{OD}$  in  $e^{OD}$  je zaradi slabe občutljivosti neustrezen način prikazovanja dane povezave.
- Algoritem za izračun vsebnosti suhe biomase iz optične gostote kvasne suspenzije nam omogoča izračun vsebnosti suhe biomase iz izmerjene optične gostote pri vseh obravnavanih vzorcih. Med izmerjenimi in izračunanimi vsebnostmi suhe biomase obstaja pričakovana linearna zveza ( $y = x$ ).
- Rastno krivuljo mikroorganizmov lahko namesto z metodo merjenja vsebnosti suhe biomase določamo s hitrejšo in enostavnejšo metodo merjenja optične gostote suspenzije. Obstaja namreč velika podobnost v poteku rasti krivulj, ki jih dobimo bodisi z merjenjem optične gostote suspenzije, bodisi z merjenjem vsebnosti suhe biomase suspenzije ali pa s preračunavanjem vsebnosti suhe biomase iz izmerjenih vrednosti *OD*.

## 6 POVZETEK

Pri delu z mikroorganizmi se velikokrat pojavi potreba po kvantitativnem ovrednotenju njihovih kultur. Za to imamo na voljo več različnih metod, ki se močno razlikujejo po načinu določitve vsebnosti biomase v vzorcu in so zaradi svojih prednosti in slabosti različno pogosto uporabljene. Pri diplomski nalogi smo za spremljanje rasti izbranega mikroorganizma izbrali metodo merjenja optične gostote in metodo določanja vsebnosti suhe biomase celic in ju primerjali. Metodi se med drugim razlikujeta po praktičnosti uporabe in po ponovljivosti meritev. Cilj naše naloge je bil ugotoviti, ali lahko zamudno in slabo ponovljivo direktno določanje vsebnosti suhe biomase ustrezno nadomestimo s posrednim določevanjem vsebnosti suhe biomase s spektrofotometrično metodo, ki je enostavna, dokaj hitra in dobro ponovljiva. Pri tem smo poskus zastavili tako, da smo sev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* aerobno kultivirali na stresalniku pri določenih pogojih in med gojenjem vsaki dve uri izmerili optično gostoto v petih ponovitvah in določili vsebnost suhe biomase v štirih ponovitvah. Merili smo tudi optično gostoto in vsebnost suhe biomase v odvisnosti od števila cepilnih zank. Kot smo pričakovali, so bile spektrofotometrične meritve veliko bolj ponovljive kot meritve vsebnosti suhe biomase, kar smo ugotovili po primerjanju koeficientov variabilnosti.

Iz posameznih sklopov meritev smo določili algoritme rastnih krivulj. Za opis odvisnosti optične gostote od vsebnosti suhe biomase smo izbrali polinom četrte stopnje, ki smo ga izračunali iz sklopa meritev, ki niso obsegale meritev optične gostote in vsebnosti suhe kvasne v odvisnosti od števila cepilnih zank. Ugotovili smo namreč, da je v tem primeru šlo za preveč drugačno okolje v primerjavi z ostalimi kultivacijami. Poskusili smo tudi linearizirati zvezo med optično gostoto in vsebnostjo suhe biomase z uporabo eksponentnih funkcij. Ugotovili smo, da s tem dobimo povezavo, ki je premalo občutljiva in zaradi tega neprimerna za analizo podatkov. Iz algoritma za opis odvisnosti optične gostote od vsebnosti suhe biomase smo z zamenjavo odvisne in neodvisne spremenljivke izrazili vsebnost suhe biomase kot funkcijo optične gostote. S pomočjo novega algoritma smo iz meritev za optično gostoto izračunali vsebnost suhe biomase. Izračunane vrednosti smo uporabili za prikazovanje rastle krivulje. S

primerjavo rastnih krivulj iz izračunane in izmerjene vsebnosti suhe biomase smo opazili, da se krivulji razlikujeta le v nekaterih podrobnostih. Iz tega smo povzeli, da lahko zamudno direktno določanje vsebnosti suhe biomase nadomestimo s hitrejšim in priročnejšim posrednim določevanjem vsebnosti suhe biomase, ki nam ga omogoča metoda merjenja optične gostote. To seveda velja le v primeru, ko so pogoji pri meritvah čim bolj podobni pogojem, pri katerih določimo algoritem za opis odvisnosti optične gostote od vsebnosti suhe biomase.

S primerjavo rastnih krivulj iz izračunane oz. (kar je zelo podobno) iz izmerjene vsebnosti suhe biomase s tisto, ki jo dobimo samo z merjenjem optične gostote pa smo dodatno ugotovili tudi to, da je metoda merjenja optične gostote sama po sebi prav tako ustrezen način za določanje faze rastne krivulje, vendar le v primeru, če nas ne zanima natančna vsebnost biomase, ampak le faza rastne krivulje.

## 7 VIRI

Atlas R. M. 1993. Microbiological media. Boca Raton, CRC Press: 1079-1079.

Bisconti L., Pepi M., Mangani S., Baldi F. 1997. Reduction of vanadate to vanadyl by a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals*, 10: 239-246.

Batič M., Raspor P. 2000. Effect of cultivation mode on a bioprocess for chromium yeast biomass enrichment. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 439: R73-R75.

Bednarski W., Adamczak M., Tomasik J., Płaszczyk M. 2004. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeasts. *Bioresource Technology*, 95, 1: 15-18.

Çakar Z. P., Sauer U., Bailey J. E. 1999. Metabolic engineering of yeasts: the perils of auxotrophic hosts. *Biotechnology Letters*, 21: 611-616.

Davey H. 2002. Flow cytometric methods lecture. Aberystwyth, University of Wales, Institute of Biological Sciences. (november 2002)

<http://qbab.aber.ac.uk/teaching/fcmmeth.pdf> (april 2006): 10 str.

Denney R. C., Sinclair R. 1987. Visible and ultraviolet spectroscopy. Chichester, John Wiley & Sons: 17-19.

Długoński J., Wilmańska D. 1998. Deleterious effects of androstenedione on growth and cell morphology of *Schizosaccharomyces pombe*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 189-194.

Esiobu N., Hoosein N. 2003. An assessment of the in vitro antimicrobial effects of two antiepileptic drugs – sodium valproate and phenytoin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83: 63-68.

Fujs Š., Gazdag Z., Poljšak B., Stibilj V., Milačič R., Pesti M., Raspor P., Batič M. 2005. The oxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure. *Journal of Basic Microbiology*, 45, 2: 125-135.

Gardner J. M., McBryde C., Vystavelova A., De Barros Lopes M., Jiranek V. 2005. Identification of genes affecting glucose catabolism in nitrogen-limited fermentation. *FEMS Yeast Research*, 5, 9: 791-800.

Jamnik P., Raspor P. 2003. Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 6: 316-322.

Jamnik P., Raspor P. 2005. Induction of Hsp104 by Cr(VI) in yeast *Candida intermedia*. *Acta Agriculturae Slovenica*, 85, 1: 67-72.

Kaiser G. E. 2005. Enumeration of microorganisms. Catonsville Campus, The Community College of Baltimore Country. (junij, 2005)  
<http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/labmanua/lab4/lab4.html> (april 2006): 6 str.

Koch A. L. 1994. Growth measurement. V: *Methods for general and molecular bacteriology*. Gerhardt P. (ed.). Washington, American Society for Microbiology: 248-277.

Londesborough J. 2001. Fermentation of maltotriose by brewer's and baker's yeasts. *Biotechnology Letters*, 23: 1995-2000.

Marczenko Z. 1986. Separation and spectrophotometric determination of elements. Chichester, Ellis Horwood Limited: 62-62.

Møller K., Sharif M. Z., Olsson L. 2004. Production of fungal  $\alpha$ -amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. *Journal of Biotechnology*, 111, 3: 311-318.

Paš M., Milačič R., Drašlar K., Pollak N., Raspor P. 2004. Uptake of chromium(III) and chromium(VI) compound in the yeast cell structure. *Biometals*, 17: 25-33.

Pitkänen J. P., Rintala E., Aristidou A., Ruohonen L., Penttilä M. 2005. Xylose chemostate isolates of *Saccharomyces cerevisiae* show altered metabolite and enzyme levels compared with xylose, glucose, and ethanol metabolism of the original strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 827-837.

Plaper A., Jenko - Brinovec Š., Premzl A., Kos J., Raspor P. 2002. Genotoxicity of trivalent chromium in bacterial cells. Possible effects on DNA topology. *Chemical Research in Toxicology*, 15: 943-949.

Poilpre E., Tronquit D., Goma G., Guillou V. 2002. On-line estimation of biomass concentration during transient growth on yeast chemostat culture using light reflectance. *Biotechnology Letters*, 24: 2075-2081.

Poljšak B., Gazdag Z., Jenko-Brinovec Š., Fujs Š., Pesti M., Bélagyi J., Plesničar S., Raspor P. 2005. Pro-oxidative vs antioxidative properties of ascorbic acid in chromium(VI)-induced damage: an *in vivo* and *in vitro* approach. *Journal of Applied Toxicology*, 25: 535-548.

Posten H. C., Cooney C. L. 2004. Growth of microorganisms. V: *Biotechnology: vol. 1: Biological fundamentals*. 2<sup>nd</sup> comp. rev. ed. Rehm H. J., Reed G., Pühler A., Stadler P. (eds.) <http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v01growt.pdf> (april 2006): 10 str.

Povhe Jemec K., Raspor P. 2005. Initial *Saccharomyces cerevisiae* concentration in single or composite culture dictates bioprocess kinetics. *Food Microbiology*, 22, 4: 293-300.

Rainieri S., Zambonelli C., Giudici P., Castellari L. 1998. Characterization of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* hybrids. *Biotechnology Letters*, 20, 6: 543-547.

Rajoka M. I., Kiani M. A. T., Khan S., Awan M. S., Hashmi A. S. 2004. Production of single cell protein from rice polishings using *Candida utilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 297-301.

Raspor P. 1996. Kvasovke. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 69-89.

Raspor P., Fujs Š., Banzsky L., Maraz A., Batič M. 2003. The involvement of ATP sulfurylase in Se(VI) and Cr(VI) reduction processes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63,1: 89-95.

Raspor P., Plesničar S., Gazdag Z., Pesti M., Miklavčič M., Lah B., Logar-Marinšek R., Poljšak B. 2005. Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8,-tetramethylkroman-2-carboxyl acid). *Cell Biology International*, 29, 1: 57-63.

Reckhow D. A. 1999. *Light-scattering and molecular spectrophotometry*. Amherst, University of Massachusetts, Department of Civil Engineering (september, 1999)

<http://www.ecs.umass.edu/cee/reckhow/courses/572/572bk17/572BK17.html> (maj 2005): 31 str.

Riordan C., Bustard M., Putt R., McHale A. P. 1997. Removal of uranium from solution using residual brewery yeast: combined biosorption and precipitation. *Biotechnology Letters*, 19, 4: 385-387.

Riordan C., McHale A. P. 1998. Removal of lead from solution using non-living residual brewery yeast. *Bioprocess Engineering*, 19: 277-280.



Serra A., Strehaiano P., Taillandier P. 2003. Characterization of the metabolic shift of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* by continuous aerobic culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 564-568.

Serra A., Strehaiano P., Taillandier P. 2005. Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridisation on these parameters. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 3: 257-265.

Shang F., Wen S., Wang X., Tan T. 2006. Effects of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 12, 3: 285-292.

Stopar D., Čadež P., Mahne I. 2005. Fiziologija mikrobov – laboratorijske vaje. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
<http://www.bf.uni-lj.si/zt/mikro/homepage/praktikumbiotehnologi.pdf> (april 2006): 31 str.

Walker G. M. 2000. Yeasts. V: *Encyclopedia of microbiology*. Vol. 4. 2<sup>nd</sup> ed. Lederberg J. (ed.). San Diego, Academic Press: 939-950.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Milici Kač in somentorici dr. Poloni Jamnik za vodenje, pomoč in spodbudo pri izdelavi diplomskega dela ter recenzentu prof. dr. Petru Rasporju za recenzijo diplomskega dela. Posebna zahvala gre Urški Debelak za svetovanje in pomoč pri praktičnem delu in doc. dr. Lei Gašperlin za prijazno svetovanje pri statistični obdelavi podatkov. Hkrati se zahvaljujem vsem, ki so me podpirali skozi celoten čas študija.

## PRILOGE

Priloga A1: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od števila cepilnih zank kvasne biomase, ki smo jih dodali v gojišče (z dne 10.10.2005)

Število cepilnih zank	Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L)	Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem številu cepilnih zank (g/L)	Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem številu cepilnih zank (g/L)	Optična gostota kvasne suspenzije pri določenem številu cepilnih zank	Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem številu cepilnih zank	Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem številu cepilnih zank
2	0,0550	0,0567	0,0126	0,1810	0,1838	0,0042
2	0,0483			0,1900		
2	0,0750			0,1840		
2	0,0483			0,1850		
2				0,1790		
4	0,0917	0,0975	0,0399	0,3940	0,3936	0,0005
4	0,1250			0,3940		
4	0,0433			0,3940		
4	0,1300			0,3930		
4				0,3930		
6	0,1350	0,1550	0,0136	0,5140	0,5148	0,0013
6	0,1583			0,5150		
6	0,1617			0,5160		
6	0,1650			0,5160		
6				0,5130		
8	0,3100	0,3183	0,0342	0,7640	0,7616	0,0015
8	0,3033			0,7620		
8	0,3683			0,7610		
8	0,2917			0,7610		
8				0,7600		
10	0,4317	0,4138	0,0660	0,8530	0,8540	0,0012
10	0,4633			0,8560		
10	0,4433			0,8540		
10	0,3167			0,8540		
10				0,8530		

**Priloge B1 do B5: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa**

Priloga B1: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 17.10.2005)

Čas (h)	Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L)	Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času
0	0,1067	0,1412	0,0257	0,2070	0,2050	0,0058
0	0,1367			0,2080		
0	0,1617			0,2120		
0	0,1600			0,2000		
0				0,1980		
2	0,1217	0,1000	0,0412	0,2000	0,2006	0,0009
2	0,1017			0,2020		
2	0,1350			0,2010		
2	0,0417			0,2000		
2				0,2000		
4	0,2133	0,2033	0,0178	0,3330	0,3370	0,0025
4	0,1783			0,3360		
4	0,2183			0,3380		
4	0,2033			0,3390		
4				0,3390		
6	0,3967	0,4037	0,0257	0,6150	0,6156	0,0019
6	0,4417			0,6190		
6	0,3850			0,6150		
6	0,3917			0,6140		
6				0,6150		
8	0,9050	0,9112	0,0093	1,0060	1,0116	0,0101
8	0,9067			1,0030		
8	0,9250			1,0040		
8	0,9083			1,0210		
8				1,0240		
10	1,5167	1,6283	0,0965	1,4090	1,4080	0,0010
10	1,7217			1,4070		
10	1,6950			1,4070		
10	1,5800			1,4080		
10				1,4090		

(se nadaljuje)

Nadaljevanje priloge B1: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 17.10.2005)

Čas (h)	Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L)	Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času
12	2,2830	2,6645	0,2756	1,7060	1,7076	0,0037
12	2,6433			1,7070		
12	2,8867			1,7090		
12	2,8450			1,7130		
12				1,7030		
24	4,7367	4,7838	0,0382	1,9510	1,9522	0,0026
24	4,7867			1,9520		
24	4,7817			1,9530		
24	4,8300			1,9560		
24				1,9490		

Priloga B2: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 18.10.2005)

Čas (h)	Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L)	Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času
0	0,1450	0,1379	0,0067	0,2070	0,2030	0,0032
0	0,1417			0,2010		
0	0,1300			0,2000		
0	0,1350			0,2060		
0				0,2010		
2	0,1550	0,1462	0,0085	0,1980	0,2016	0,0026
2	0,1517			0,2040		
2	0,1417			0,2000		
2	0,1367			0,2020		
2				0,2040		

(se nadaljuje)

Nadaljevanje priloge B2: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 18.10.2005)

Čas (h)	Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L)	Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času
4,25	0,2100	0,2517	0,0282	0,3600	0,3622	0,0032
4,25	0,2717			0,3600		
4,25	0,2650			0,3600		
4,25	0,2600			0,3640		
4,25				0,3670		
6	0,5583	0,5483	0,0127	0,6500	0,6472	0,0041
6	0,5500			0,6430		
6	0,5300			0,6480		
6	0,5550			0,6520		
6				0,6430		
8	1,0717	1,0746	0,0125	1,0210	1,0276	0,0092
8	1,0917			1,0250		
8	1,0617			1,0180		
8	1,0733			1,0400		
8				1,0340		
10	2,0417	2,0079	0,0290	1,4050	1,3974	0,0075
10	2,0033			1,3940		
10	2,0150			1,3920		
10	1,9717			1,3900		
10				1,4060		
12,67	3,3683	3,6038	0,4296	1,6840	1,6852	0,0066
12,67	3,4300			1,6880		
12,67	4,2467			1,6750		
12,67	3,3700			1,6930		
12,67				1,6860		
24	4,9817	4,9133	0,0549	1,9050	1,9048	0,0018
24	4,9267			1,9070		
24	4,8933			1,9050		
24	4,8517			1,9050		
24				1,9020		

Priloga B3: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 12. in 13.12.2005)

Čas (h)	Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L)	Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času
0	0,0867	0,1221	0,0357	0,1950	0,1960	0,0035
0	0,1167			0,2020		
0	0,1717			0,1930		
0	0,1133			0,1950		
0				0,1950		
2	0,1683	0,1458	0,0321	0,2200	0,2174	0,0042
2	0,1550			0,2120		
2	0,1617			0,2190		
2	0,0983			0,2220		
2				0,2140		
4,125	0,3283	0,3196	0,0385	0,4940	0,5054	0,0077
4,125	0,3700			0,5030		
4,125	0,2833			0,5080		
4,125	0,2967			0,5150		
4,125				0,5070		
6,125	0,6783	0,7067	0,0323	0,9310	0,9318	0,0090
6,125	0,6817			0,9350		
6,125	0,7217			0,9320		
6,125	0,7450			0,9430		
6,125				0,9180		
8,125	1,6917	1,6908	0,0274	1,4500	1,4445	0,0066
8,125	1,7183			1,4337		
8,125	1,7000			1,4490		
8,125	1,6533			1,4464		
8,125				1,4432		
10,125	3,0233	3,0963	0,0747	1,8141	1,8085	0,0043
10,125	3,0550			1,8045		
10,125	3,1133			1,8111		
10,125	3,1933			1,8039		
10,125				1,8087		
12,125	3,2600	3,3171	0,0657	1,8547	1,8554	0,0026
12,125	3,2933			1,8574		
12,125	3,4117			1,8581		
12,125	3,3033			1,8514		
12,125				1,8554		

Priloga B4: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 12. in 13.12.2005)

Čas (h)	Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L)	Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času
0	0,1117	0,1000	0,0222	0,2140	0,2154	0,0048
0	0,1100			0,2080		
0	0,0667			0,2170		
0	0,1117			0,2170		
0				0,2210		
2	0,1817	0,2029	0,0338	0,2510	0,2536	0,0060
2	0,2533			0,2510		
2	0,1900			0,2640		
2	0,1867			0,2490		
2				0,2530		
4,083	0,3767	0,3525	0,0389	0,5540	0,5506	0,0064
4,083	0,3883			0,5410		
4,083	0,3017			0,5470		
4,083	0,3433			0,5560		
4,083				0,5550		
6,125	0,7450	0,7938	0,0395	0,9790	0,9984	0,0144
6,125	0,8117			1,0070		
6,125	0,8367			0,9960		
6,125	0,7817			0,9930		
6,125				1,0170		
8,125	1,9567	1,9663	0,0409	1,5090	1,5128	0,0113
8,125	1,9133			1,5130		
8,125	2,0067			1,5040		
8,125	1,9883			1,5060		
8,125				1,5320		
10,125	3,3817	3,3392	0,0601	1,8230	1,8260	0,0020
10,125	3,2967			1,8270		
10,125				1,8250		
10,125				1,8270		
10,125				1,8280		
12,125	3,1000	3,0692	0,0731	1,8470	1,8498	0,0023
12,125	3,1150			1,8510		
12,125	3,1017			1,8530		
12,125	2,9600			1,8490		
12,125				1,8490		



Priloga B5: Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L) in optična gostota kvasne suspenzije v odvisnosti od časa (z dne 12. in 13.12.2005)

Čas (h)	Vsebnost suhe kvasne biomase (g/L)	Povprečna vsebnost suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Standardna deviacija povprečne vsebnosti suhe kvasne biomase pri določenem času (g/L)	Optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Povprečna optična gostota kvasne suspenzije pri določenem času	Standardna deviacija povprečne optične gostote kvasne suspenzije pri določenem času
14	3,8433	3,7304	0,0852	1,8374	1,8309	0,0040
14	3,6567			1,8323		
14	3,7483			1,8279		
14	3,6733			1,8279		
14				1,8291		
16	4,0283	3,9704	0,0615	1,8827	1,8831	0,0010
16	3,9250			1,8841		
16	3,9100			1,8841		
16	4,0183			1,8819		
16				1,8827		
18	4,5583	4,5704	0,0152	1,9097	1,9120	0,0025
18	4,5750			1,9104		
18	4,5583			1,9143		
18	4,5900			1,9151		
18				1,9104		
20	4,6850	4,7854	0,0923	1,9324	1,9350	0,0031
20	4,9033			1,9332		
20	4,8033			1,9364		
20	4,7500			1,9397		
20				1,9332		
22	4,9883	5,0025	0,0189	1,9518	1,9466	0,0032
22	5,0267			1,9476		
22	4,9867			1,9443		
22	5,0083			1,9451		
22				1,9443		
24	4,8033	4,8188	0,0516	1,9547	1,9545	0,0032
24	4,8950			1,9572		
24	4,7817			1,9505		
24	4,7950			1,9522		
24				1,9581		