

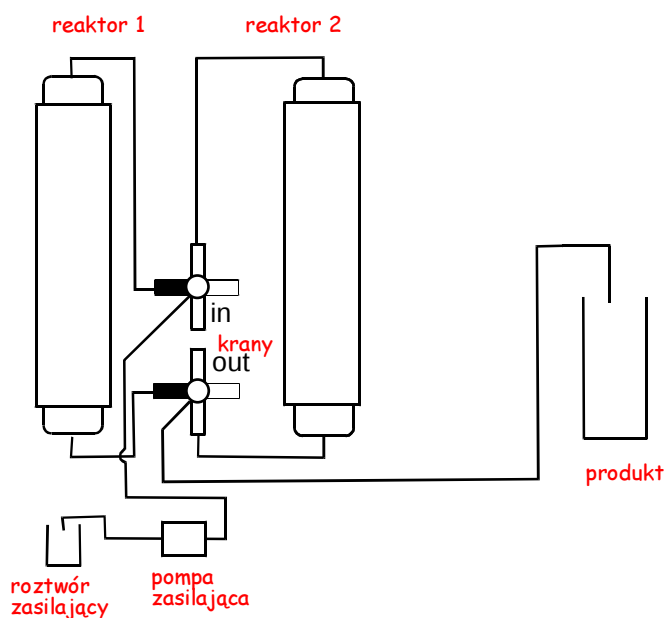
INSTRUKCJA WYKONANIA

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest poznanie procesu ciągłej produkcji cukru inwertowanego będącego mieszaniną glukozy i fruktozy. Proces ten prowadzony jest metodą biokatalityczną (na złożu zawierającym inwertazę drożdżową) w mikroskali w reaktorach kolumnowych z ciągłym dozowaniem roztworu substratu. Integralną częścią ćwiczenia jest wykonanie złoża zawierającego inwertazę unieruchomioną na żelu alginianowym.

W różnych wariantach ćwiczenia osoby wykonujące badają wpływ rodzaju katalizatora (jeśli używane są kolumny jonitowe), temperatury oraz objętościowego natężenia przepływu na wydajność procesu inwersji sacharozy. W wersji podstawowej detekcja glukozy w mieszaninie poreakcyjnej odbywa się metodą spektrofotometryczną (opis metody DNS zawarto na końcu). W wersji rozbudowanej detekcja glukozy odbywa się za pomocą wstrzykowej analizy przepływowej (*Flow Injection Analysis, FIA*)

W trakcie laboratorium jedna osoba będzie odpowiedzialna za proces przebiegający w reaktorach kolumnowych, druga osoba będzie odpowiedzialna za wyznaczenie krzywej kalibracyjnej do pomiaru stężenia glukozy a trzecia osoba przygotowuje złożo zawierające immobilizowany enzym. Uczestnicy laboratorium zobowiązani są zapoznać się z przebiegiem wszystkich prowadzonych doświadczeń (również z informacjami zawartymi w tym skrypcie) - wyniki eksperymentów omawiane są wspólnie. Studenci będą wypełniali arkusz z wyliczonymi czynnościami (zaznaczając czas ich rozpoczęcia i zakończenia) – każda czynność jest przyporządkowana do konkretnej osoby (student A, B, C). Na podstawie tak wypełnionego arkusza należy sporządzić wykres Gantta (opis sposobu wykonania takiego wykresu jest dołączony do Arkusza Wyników)



Rysunek 1. Schemat zestawu do prowadzenia reakcji inwersji sacharozy w reaktorach kolumnowych z unieruchomionym katalizatorem (moduł analityczny FIA).

Sprzęt	Odczynniki
Zestaw reaktorów kolumnowych CEU (zestaw zawiera termostat, reaktory, pompę perystaltyczną, układ wstrzykowej analizy przepływowej, komputer z oprogramowaniem) pompa perystaltyczna	roztwór sacharozy (stęż. 7,6 g/L) roztwór CaCl_2 (stęż. 2M) glukoza alginian sodu inwertaza drożdżowa lub drożdże kwas octowy octan sodu
Butelki 1 L 3 szt.	
Butelki 100 mL 5 szt.	
Zlewki 100 mL 5 szt.	
kolba miarowa 0,5 L 1 szt.	
pipeta 20,00 mL 1 szt.	
pompka do pipety 1 szt.	
cylinder 100 mL 1 szt.	
cylinder *)500 mL 1 szt.	
miniatury lejek 1 szt.	
zlewka*) 150 mL 1 szt.	
zlewka*) 1 L 1 szt.	
zlewka szklana 1 L 1 szt.	
zlewka szklana 600 mL 1 szt.	
zestaw do sączenia próżniowego	

*)sprzęt polipropylenowy, używany tylko do roztworów wodnych

Opis obsługi aparatury oraz kolejność wykonywanych czynności – proces przebiegający w reaktorach kolumnowych.

1. Sporządzić roztwór sacharozy o stężeniu 4 g L^{-1} (3 L) i doprowadzić pH roztworu do wartości 4,8-5,5. Butelki z roztworem odgazowywać przez 5 minut na myjce ultradźwiękowej.
2. Zapoznać się ze schematem przedstawionym na Rysunku 1 oraz oznaczeniami na Rysunku 2. Sprawdzić ustawienie kranów i prześledzić drogę cieczy, począwszy od naczynia, z którego jest pobierana, przez pompę zasilającą (3), reaktory (4), zawory sterujące kierunkiem cieczy pompowanej do reaktorów i wypływającej z reaktorów (6) aż do naczynia odbierającego produkt (Rysunek 2).

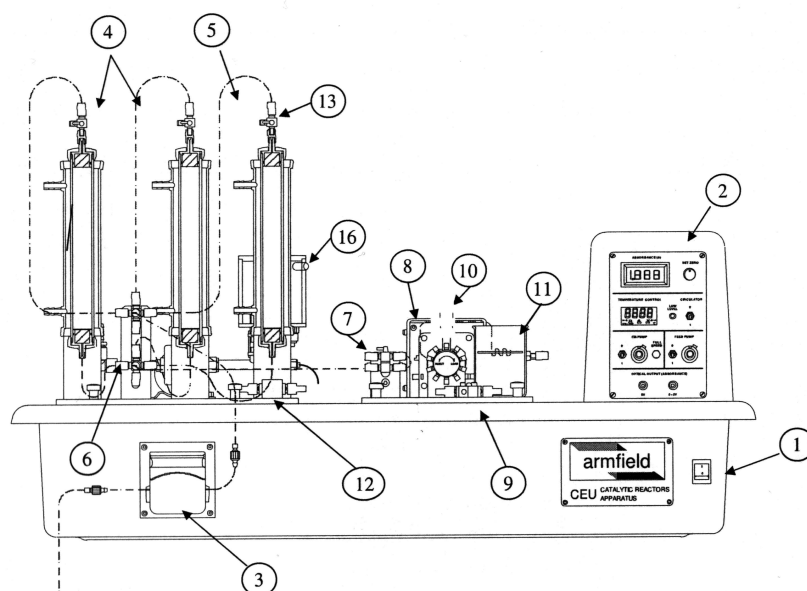
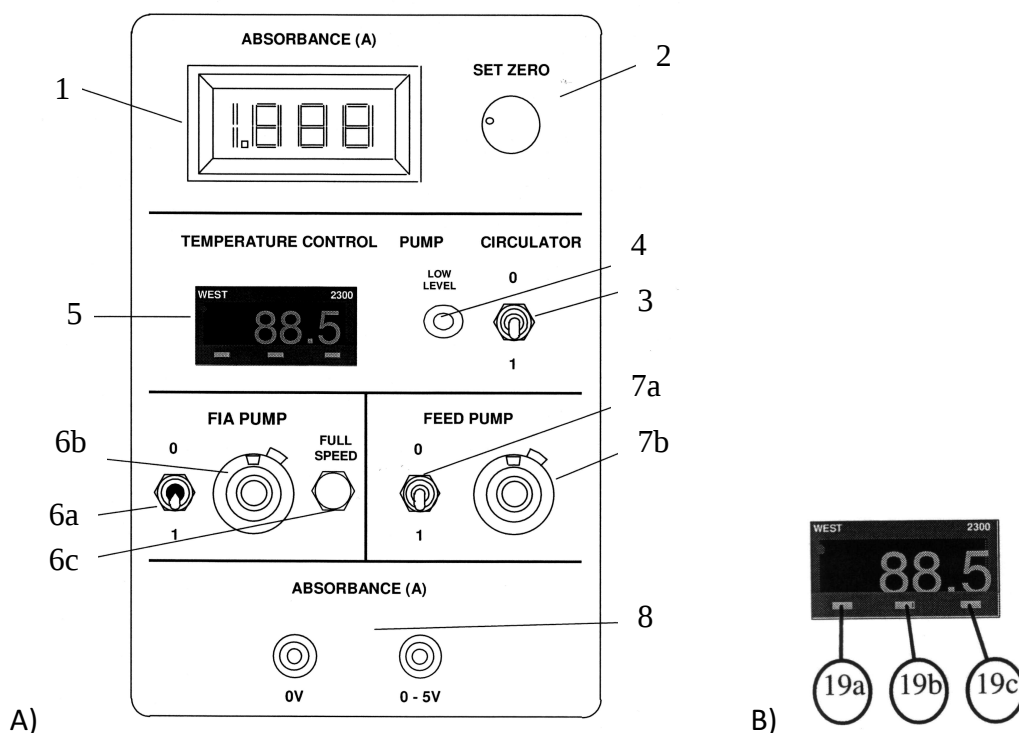


Figure 1 CEU with CEU-3 and CEU-5 options (front view)

1	On/off switch	2	Control console	3	Feed pump	4	Chemical reactors	5	Biological reactor*	6	Reactor input/output selector valves
7	T-piece/3-way valve**	8	FIA pump**	9	Optical flow cell**	10	FIA valve**	11	Beaker/holding tube**	12	Batch optical cell**
13	Bleed valve	16	HWC tank	* Option CEU-5, ** Option CEU-3							

Rysunek 2. Schemat zestawu do prowadzenia reakcji w układzie przepływowym - widok z przodu: (1) włącznik główny; (2) panel sterujący; (3) pompa perystaltyczna zasilająca (dozująca substrat); (4) szklane reaktory kolumnowe z płaszczami grzejnymi; (5) trzeci, opcjonalny reaktor z biokatalizatorem; (6) zawory dozujące i odbierające; (7) trójdrożny zawór sterujący wejściem do wstrzykowego analizatora przepływowego (FIA); (8) pompa dozująca reagenty i ciecz nośną do FIA; (9) przepływowa kuweta optyczna; (10) zawór FIA; (11) pętla reakcyjna; (12) kuweta optyczna (tylko wtedy, gdy nie ma zestawu FIA); (13) zawory odpowietrzające; (16) łaźnia termostatu.

3. Włączyć komputer z oprogramowaniem rejestrującym parametry procesu.
4. Zapoznać się z obsługą panelu sterującego (oznaczony jako 2 na Rysunku 2), sposobem regulacji natężenia objętościowego przepływu i innych parametrów procesu. Schemat panelu sterującego przedstawiono na Rysunku 3. Upewnić się, że termostat jest wyłączony (*TEMPERATURE CONTROL PUMP CIRCULATOR*, przełącznik 3 w pozycji „0”). Podobnie, wyłączona powinna być pompa zasilająca reaktor (*FEED PUMP*, przełącznik 7a) i pompa zasilająca analizator przepływowy (*FIA PUMP*, przełącznik 6a)



Rysunek 3. (A) Schemat panelu sterującego: ekran wyświetlający wartość absorbancji, rejestrowanej w module FIA (1); regulator zerowania absorbancji (2); kontroler termostatu (4); włącznik termostatu (3); ekran wyświetlający temperaturę (5); włącznik pompy FIA (6a); regulacja szybkości pompowania FIA (6b); przycisk maksymalnej prędkości pompowania (6c); włącznik pompy zasilającej reaktory (7a); regulacja szybkości pompowania (7b); gniazdko wyjścia sygnału absorbancji (8).

(B) Wygląd ekranu kontrolera termostatu: przyciski umożliwiające wprowadzenie żądanej temperatury (19a-19c).

5. Włączyć zasilanie całego urządzenia (włącznik 1 na Rysunku 2).
6. Ustawić temperaturę termostatu: wcisnąć lewy przycisk (oznaczony jako 19a na Rysunku 3) aż ukaże się napis SP (*set point*), wtedy posługując się przyciskami 19b i 19c doprowadzić wyświetlaną wartość temperatury do wartości pożądanej.
7. Włączyć termostat (przycisk 3 na Rysunku 3).
8. **URUCHOMIENIE REAKTORA**
Końcówkę wężyka pompy zasilającej włożyć do butelki z roztworem sacharozy. Upewnić się, że wężyk dotyka dna butelki i jest nieruchomy. Sprawdzić drożność układu (zawór zasilający reaktor oraz zawór odprowadzający roztwór z reaktora powinny być otwarte). Podstawić naczynie odbierające roztwór produktu. Włączyć pompę zasilającą reaktor. Zanotować czas.
9. *Osoba wykonująca krzywą kalibracyjną powinna wykonać czynności z instrukcji zawartej na końcu „Kolorymetryczne oznaczanie cukrów redukujących w reakcji z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (metoda DNS)” i w programie Excel wykreślić krzywą kalibracyjną (wykres absorbancji w funkcji stężenia glukozy).*
10. Wyznaczyć natężenie objętościowe przepływu roztworu sacharozy zbierając przez 10 minut roztwór produktu do cylindra o objętości 100 mL- odczytać objętość cieczy i zanotować natężenie przepływu w mL/min.
11. Po upływie 20 minut od czasu rozpoczęcia dozowania roztworu sacharozy pobrać dwie

próbki roztworu wypływającego z kolumny. Próbkę te zachować do analizy.

12. Zmienić temperaturę prowadzenia procesu (lub inny, wskazany przez prowadzącego parametr np. prędkość pompowania, wartość pH). Odczekać 20 minut. Pobrać dwie próbki roztworu wypływającego z kolumny. Próbkę te zachować do analizy.
13. Powtórzyć czynności z punktów 12 zmieniając temperaturę procesu, natężenie objętościowe przepływu lub stężenie surowca.
14. Dokonać analizy zawartości glukozy w produkcie reakcji wykonując czynności opisane w instrukcji „*Kolorymetryczne oznaczanie cukrów redukujących w reakcji z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (metoda DNS)*” dla każdej zadanej temperatury procesu.
15. Obliczyć stężenie glukozy i wydajność procesu inwersji dla danej temperatury i natężenia przepływu. Wyniki przedstawić w postaci:

RODZAJ KATALIZATORA:

TEMPERATURA REAKCJI:

NATĘŻENIE OBJĘTOŚCIOWE PRZEPŁYWU:

	PRZYCHÓD [g/godz]	ROZCHÓD [g/godz]
sacharoza		
glukoza		

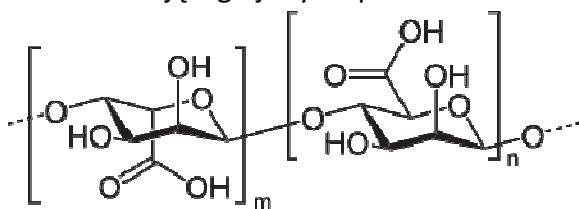
wydajność:

16. Po ostatnim odbiorze produktu bioreaktor przepłukać wodą destylowaną.
17. Do opisu ćwiczenia załączyć krzywą kalibracyjną, odczytane wartości absorbancji i obliczone stężenie glukozy przy określonych warunkach reakcji. Sporządzić bilans materiałowy dla jednej godziny ruchu ciągłego dla różnych warunków prowadzenia procesu. Obliczyć wydajności dla jednej godziny ruchu ciągłego.

Immobilizacja biokatalizatorów w alginianie wapnia.

Jedną z technik unieruchamiania enzymów lub całych komórek jest ich immobilizacja w sieci tworzonej przez polimer (czynnik sieciujący). W trakcie tego ćwiczenia inwertaza jest u nieruchomiona w alginianie wapnia (soli kwasu alginowego). Kwas alginowy jest liniowym polimerem, złożonym z monomerów kwasu D-mannuronowego i L-guluronowego, połączonych wiązaniem β -1-4 glikozydowym (Rysunek 5). W obecności jonów dwuwartościowych (w tym jonów wapnia) następuje wytrącanie alginianu wapnia z jednoczesnym sieciowaniem tego polimeru, prowadzącym do utworzenia trójwymiarowego żelu, w którym mogą zostać uwięzione cząsteczki enzymów bądź całe komórki. Metoda ta jest szeroko stosowana, ponieważ nie prowadzi do uszkodzenia immobilizowanych biokatalizatorów. Przy użyciu alginianu wapnia otrzymuje się złoża, którymi wypełnia się bioreaktory. Ponadto, alginian jest powszechnie używany w produkcji tzw. „sztucznych nasion”, czyli zarodków somatycznych ukrytych w ochronnej kapsułce zbudowanej z polimeru.

Proces unieruchamiania biokatalizatorów w alginianie wapnia polega na wymieszaniu materiału biologicznego z płynnym alginianem sodu, a następnie wkropleniu otrzymanej zawiesiny do roztworu zawierającego jony wapnia.



Rysunek 5. Kwas alginowy – liniowy polimer będący składnikiem ścian komórkowych alg.

Instrukcja sporządzenia złoża zawierającego immobilizowany enzym.

UWAGA: każda grupa ćwiczeniowa korzysta z preparatu przygotowanego przez poprzednią grupę studencką (ćwiczenie rozpoczyna się od czynności opisanych punktami 6-7, natomiast w trakcie ćwiczenia należy przygotować preparat dla następnej grupy, wykonując czynności z punktów 1-5).

1. Rozpuścić 0,5 g inwertazy w 300 mL wody destylowanej, delikatnie mieszając na mieszadłe magnetycznym.
2. Do roztworu inwertazy dodać 15 g alginianu sodowego – mieszać aż do uzyskania jednorodnego, mętnego roztworu (ok. jedną godzinę).
3. Na mieszadłe magnetycznym ustawić zlewkę 1 L, nalać 500 mL 0,2 M roztworu CaCl_2 , zmontować układ do wkraplania alginianu (wężyk z pompy perystaltycznej powinien być ok. 20 cm ponad lustrem cieczy).
4. Rozpocząć powolne wkraplanie roztworu alginianu sodu zawierającego inwertazę do roztworu chlorku wapnia. Obserwować wytrącanie się perełek alginianu wapnia.
5. Po zakończonym wkraplaniu pozostawić zawiesinę na jeden dzień.
6. Zdekantować roztwór CaCl_2 . Dwukrotnie zalać perełki alginianu (zawierającego unieruchomioną inwertazę) wodą destylowaną (2 $\times$ 500 mL), odsączyć.
7. Napełnić bioreaktor kolumnowy złożem zawierającym immobilizowaną inwertazę, uzupełnić wodą destylowaną, a następnie rozpocząć przepłukiwanie złoża wodą destylowaną. Dalej postępować jak w instrukcji dotyczącej pracy na reaktorach przepływowych.

Kolorymetryczne oznaczanie cukrów redukujących w reakcji z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (metoda DNS)

Sprzęt	Odczynniki
probówki kolbki miarowe 25 mL 4 szt. Zlewki 50 mL 3 szt. kolba miarowa 100 mL 1 szt. pipeta 20,00 mL 1 szt. pipeta 5,00 mL 1 szt. pompka do pipety 1 szt. mikropipeta 0,1-1,0 mL 1 szt. miniaturowy lejek 1 szt. kuwetka szklana spektrofotometr	roztwór DNS o następującym składzie: kwas dinitrosalicylowy 1,0g Na_2SO_3 50 mg NaOH 1,0 g dopełnić wodą do objętości 100 mL <i>ponadto</i> roztwór sacharozy (stęż. 2 g/L) fruktoza glukoza winian sodu (roztwór 15%)

I. Wykonanie krzywej wzorcowej

1. Sporządzić 100 mL roztworu sacharozy o stężeniu 2 g/L (**roztwór A**).
2. Sporządzić 100 mL roztworu zawierającego 1g/L glukozy i 1 g/L fruktozy (**roztwór B**).
3. Posługując się kolbkami miarowymi (o pojemności 25 mL) przygotować roztwory zawierające:
 - A1) 80% roztworu A i 20% roztworu B
 - A2) 60% roztworu A i 40% roztworu B
 - A3) 40% roztworu A i 60% roztworu B
 - A4) 20% roztworu A i 80% roztworu B
 Obliczyć zawartość sacharozy, glukozy i fruktozy w każdym z w.w. roztworów.
4. Do sześciu małych oznakowanych probówek wlać kolejno po 1,00 mL każdego z roztworów A, A1-A4, B wymienionych w punktach 1-3.
5. Do każdej probówki dodać po 1,00 mL roztworu DNS i **wymieszać zawartość**.
6. Probówki przykryć folią aluminiową lub wacikiem i wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 90°C na 10-15 minut.
7. Po wyjęciu z łaźni wodnej ostudzić i dodać po 1 mL wodnego roztworu winianu sodu.
8. Dokonać pomiaru absorbancji w długości fali 575 nm.
9. Wykreślić krzywą wzorcową: zmianę absorbancji w funkcji sumy zawartości glukozy i fruktozy. Obliczyć współczynnik nachylenia i wartość przecięcia krzywej kalibracyjnej metodą najmniejszych kwadratów.

II. Wykonanie oznaczeń

10. W celu dokonania pomiarów stężenia glukozy i fruktozy otrzymanych w reaktorach przepływowych zawierających złożo chemiczne oraz złożo enzymatyczne, należy (po ustaleniu stanu stacjonarnego w ruchu ciągłym) pobrać próbki o objętości kilku mililitrów.
11. Z każdej próbki pobrać do analizy po 1,00 mL roztworu i postępować analogicznie jak w punktach 5-8.
12. Odczytaną wartość absorbancji (575 nm) przeliczyć na zawartość glukozy i fruktozy.

KOLEJNOŚĆ CZYNNOŚCI ĆWICZENIA 29 (biokatalizatory)

student A:.....student B:student C:.....

Proszę o zaznaczanie (v) wykonanych czynności oraz o wpisanie czasu ich rozpoczęcia i zakończenia

lp.	Czynności do wykonania	student wykonujący		CZAS	
				Start	Stop
1	Zapoznanie się z obsługą aparatury	A		9:30	9:40
2	Włączenie zasilania aparatu i komputera.	A			
3	Sprawdzenie szczelności	A			
4	Pomiar objętości właściwej złoża z unieruchomionym biokatalizatorem	B			
5	Przygotowanie roztworu glukozy	C			
6	Łaďadowanie reaktora łożem immobilizowanego enzymu uwaga: w tym czasie student B wykonuje czynności z punktów 19-22 a student C wykonuje czynności z pkt. 23-27	A			
7	Uruchomienie reaktora: nastawienie przepływu P_1 i temperatury T_1 <i>(w innej wersji zamiast temperatury może być zmienione pH lub natężenie przepływu dozowanego roztworu)</i>	A			
8	Rozruch min. 20 min.	A			
9	Pomiar prędkości pompowania	A			
10	Dwukrotny pobór 20 mL próbki z reaktora.	A			
11	Zmiana temperatury na T_2 , rozruch min. 20 min.	A			
12	Dwukrotny pobór 20 mL próbki z reaktora.	A			
13	Powtórzenie czynności z pkt 11-12 (dla temperatury T_3).	A			
14	Powtórzenie czynności z pkt 11-12 (dla temperatury T_4).	A			
	Przepłukiwanie łoża wodą,	A			
15	Wyłączenie termostatu	A			
16	Przygotowanie próbek do oznaczeń zawartości glukozy (wg instrukcji)	C			
17	Dozowanie DNS, inkubacja próbek	C			
18	Studzenie próbek i pomiar absorpcji.	C			
19	Zmontowanie zestawu do immobilizacji enzymu	B			
20	Przygotowanie roztworu enzymu w alginianie sodu	B			
21	Wytrącanie immobilizowanego enzymu w roztworze $CaCl_2$	B			
22	Demontaż zestawu do immobilizacji, mycie szkła.	B			
23	<i>Przygotowanie roztworów wzorcowych do krzywej kalibracyjnej</i>	C			
24	<i>Dozowanie DNS, inkubacja roztworów standardowych</i>	C			
25	<i>Studzenie próbek i pomiar absorpcji</i>	C			
27	<i>Wykreślenie krzywej kalibracyjnej</i>	C			
28	Obliczenie zawartości glukozy w roztworze poreakcyjnym	A,B			
29	Mycie szkła.	A,B			
30	Rozliczenie szkła i sprzętu.	wszyscy			
31	Wypełnienie arkusza wyników.	wszyscy			
32	Sprawdzenie pokoju wagowego.	wszyscy		12:55	13:00

ĆWICZENIE NR 29 - ARKUSZ WYNIKÓW

(Biokatalizatory i ich zastosowanie w przemyśle)

data wykonania ćwiczenia:.....

imię i nazwisko

.....

.....

parametry prowadzenia procesu

objętość bioreaktora		cm ³
objętość właściwa biokatalizatora		%
nastawa pompy zasilającej		-
prędkość przepływu		cm ³ /godz
stężenie roztworu sacharozy		g/L

Wykonanie krzywej kalibracyjnej

masa naważki glukoza (G) : mg, fruktoza (F): mg, objętość:cm³

nr próbki	stęż. G+F g/L	absorbancja
1		
2		
3		
4		
5		
6		

równanie krzywej kalibracyjnej:

Pomiary stężenia glukozy i fruktozy

Temperatura	probka 1		próbka 2	
	Absorbancja	Stężenie	Absorbancja	Stężenie

podpis asystenta:

Opis do ćwiczenia powinien zawierać:

1. Cel ćwiczenia

2. Opis eksperymentu zawierający

- a. opis wykonywanych czynności oraz warunki i parametry prowadzenia procesu
- b. wyniki pomiarów (arkusz wyników)
- c. krzywą kalibracyjną, odczytane wartości absorbancji i obliczone stężenie glukozy przy określonych warunkach reakcji.

3. Opracowanie wyników - w tym:

- a. równania reakcji
- b. rachunkowe opracowanie otrzymanych wyników
- c. bilans materiałowy dla 1 godz. ruchu ciągłego dla różnych warunków prowadzenia procesu
- d. wykres Gantta (wg zasad zamieszczonych poniżej)

4. Dyskusję otrzymanych wyników.

- a. wydajność procesu dla jednej godziny ruchu ciągłego
- b. źródła błędów
- c. obliczenie parametrów kinetycznych reakcji (stałe szybkości, energia aktywacji)

5. Wnioski. W szczególności należy skomentować:

- a. wady i zalety procesu
- b. stronę ekonomiczną procesu
- c. stronę ekologiczną (porównanie z innymi metodami przemysłowymi)
- e. czy cel ćwiczenia został osiągnięty.

Instrukcja wykonania wykresu Gantta

Wykres Gantta jest diagramem dwuwymiarowym stanowiącym metodę wizualnego opisu projektu.

Na prawidłowo wykonanym wykresie można szynko odczytać podział projektu na zadania oraz ich rozplanowanie w czasie (czasy rozpoczęcia i zakończenia działań, ich czas trwania, kolejność, następstwo). Wykres Gantta może być wykonany odręcznie (na papierze milimetrowym) lub komputerowo. Zawsze konieczne jest jednoznaczne określenie przedziałów czasowych. Wykres wykonywany jest na podstawie arkusza, w którym zanotowano początek i koniec każdej czynności:

nazwa czynności	początek	koniec
A	8:30	8:45
B	8:35	8:45
...		
...		
N	12:25	12:50
O	12:50	13:00

Na osi rzędnych proszę umieścić nazwy czynności a na osi odciętych skalę czasu (np. godziny z podziałem na minuty, kwadranse itp):

