

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de determinare a activității dehidrogenazei în biomasă la fermentare.

Invenția poate fi aplicată pentru controlul expres al procesului de fermentare anaerobă a materiei prime organice în tehnologia de biogaz și pentru dirijarea acestui proces. Activitatea sumară a fermenților dehidrogenazici reprezintă un indicator al activității biologice generale în procesul de fermentare anaerobă, care caracterizează activitatea microorganismelor însuși, determină viteza și profunzimea proceselor biochimice din bioreactor.

Este cunoscut procedeu de control al procesului de fermentare anaerobă a materiei prime organice, care constă în determinarea analitică a materiei prime organice, care include determinarea analitică a indicatorilor de consum chimic al oxigenului (CCO) și consum biochimic (CBO) al oxigenului în biomasa supusă fermentării, pH-ului și a temperaturii în bioreactor. Însă acest procedeu este indirect, nu permite evaluarea cantitativă a activității procesului de metanogeneză și, respectiv, controlul operativ al formării biogazului pe parcursul proceselor anaerobe de fermentare a biomasei [1].

Cel mai apropiat conform esenței tehnice și rezultatului scontat este procedeu de determinare a activității dehidrogenazei, care include introducerea în proba analizată de biomasă supusă fermentării a soluțiilor de glucoză și 2,3,5-trifenil-tetrazoliu clorurat (TTC), incubarea amestecului în condiții de vid cu extragerea ulterioară cu alcool și determinarea colorimetrică a densității optice a soluției colorate de trifenil-formazan (TFF) în calitate de produs al reacției de dehidrogenare a TTC [2].

Dezavantajele acestui procedeu constau în durata mare a reacției, volumul mare de muncă și capacitatea înaltă de absorbție a energiei, lipsa factorilor de stabilizare a activității dehidrogenazei (extractele colorate se decolorează repede) și inconvenienta determinării și măsurării activității dehidrogenazei în cazul unui număr mare de probe analizate, ceea ce îl face nerentabil din punct de vedere economic. Totodată, procesul de incubare, având loc timp de 60 min, este îndelungat.

Problema soluționată prin prezenta invenție constă în accelerarea, reducerea volumului de muncă a procesului de analiză și ieftinirea procedurii de efectuare a analizei.

Procedeu de determinare a activității dehidrogenazei în biomasă la fermentare prevede introducerea în proba analizată a soluției de glucoză și de clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu (TTC), incubarea amestecului în condiții de vid, extragerea ulterioară cu alcool, determinarea colorimetrică a densității optice a soluției colorate de trifenilformazan (TFF) formate în rezultatul reacției de dehidrogenare a TTC cu calcularea ulterioară a activității dehidrogenazei, totodată în componența amestecului supus analizei se introduce scuolenă, în cantitate de $(5,0...5,5)10^{-4}$ % în raport cu volumul amestecului analizat, și soluție tampon de fosfat cu pH-ul 7,2, totodată se utilizează soluții de 0,2 M de glucoză și 2% TTC, procesul de incubare având loc în condiții mezofile la temperatura de $33\pm 1^\circ\text{C}$ timp de 25...30 min, cu agitarea ulterioară prin scuturare timp de 5 min, iar calcularea activității dehidrogenazei se efectuează conform formulei:

$$AD = \frac{(D_{\text{probă}} - D_{\text{probă sterilă}} - D_{\text{control}})}{t} * K * 1,5,$$

unde

AD – activitatea dehidrogenazei, mg TFF/ml·h;

D_{probă} – valoarea absolută a densității optice a probei analizate, media a 3 măsurări;

D_{probă sterilă} – valoarea absolută a densității optice a probei sterile;

D_{control} – valoarea absolută a densității optice a reactivilor fără probă;

t – timpul incubării, h;

K – coeficient de corecție a densității optice conform curbei de calibrare, mg TFF/ml;

1,5 – raportul dintre volumul amestecului pentru extragere în probă și volumul probei pentru calibrare.

Soluția tampon, utilizată la realizarea procedurii, conține fosfat de sodiu monosubstituit (NaH_2PO_4) – 68,4 g/L și disubstituit (Na_2HPO_4) – 31,6 g/L.

Rezultatul tehnic obținut în urma realizării invenției propuse constă în accelerarea procesului de incubare datorită prezenței în componența amestecului a microadaosului de scuolenă (2,6,10,15,19,23 – hexametiltetracoza – 2,6,10,14,18,22 – hexaen), care reduce durata de adaptare a microorganismelor la noile substraturi și asigură o efectuare mai rapidă a reacției de dehidrogenare a TTC și de formare a TFF. Utilizarea unor concentrații mai mari de glucoză și TTC duce la accelerarea suplimentară a reacției țintă de dehidrogenare. Agitarea prin scuturare a amestecului după incubare îl omogenizează și îmbunătățește solubilitatea și extragerea TFF pentru determinarea colorimetrică a densității optice a probei. După intensitatea colorării se apreciază cantitatea de formazan, care este proporțională cu activitatea dehidrogenazei.

Rezultatul obținut este condiționat de reducerea duratei de incubare a probelor datorită utilizării adaosului activant de scuolenă și majorării concentrației de TTC și glucoză de 2 ori, stabilizării activității dehidrogenazei prin utilizarea amestecului tampon, îmbunătățirii extragerii TFF prin agitare și economia energiei electrice la incubarea probelor.

Exemplu de realizarea a invenției

Determinarea activității dehidrogenazei a fost efectuată în modul următor. Au fost preluate mostre din bioreactorul metanogen al gospodăriei agricole „GARMA-GRUP, SRL”, c. Fârlădeni, Hâncești. Componenta biomasei fermentate – 60% de borhot de la distilarea alcoolului + 40% bălegar.

Proba biomasei fermentate, cu volumul de 1 ml, a fost plasată într-o eprubetă, s-au adăugat 2 ml de soluție tampon fosfat cu pH=7,2, 1 ml de soluție 2% TTC, 1 ml 0,2 M de soluție de glucoză și scuolenă (5,0...5,5)10⁻⁴% în raport cu volumul total de amestec (5 ml) incubat, care este scuturat atent.

Apoi amestecul a fost vacuumat la un vid de 10...12 mm Hg și incubat la temperatura de 33±1°C timp de o oră în termostat. Drept control au servit materia primă (biomasa) fermentată sterilizată și reactivii.

După finalizarea incubării în eprubetă s-au adăugat porționat câte 10 ml de alcool etilic 96%, apoi a fost supusă agitării prin scuturare timp de 5 min. Conținutul eprubetelor a fost apoi filtrat, iar soluția de TFF a fost analizată la fotocolorimetru, folosind chiuvete cu lățimea de 5 mm și un filtru de lumină cu lungimea de undă de 540 nm. Cantitatea de trifenilformazan (în mg) a fost determinată cu ajutorul curbei standard. Pentru alcătuirea curbei de calibrare a fost preparată soluția standard de formazan în alcool etilic (0,1 mg la 1 ml). Calculele s-au efectuat conform formulei.

Exemplu de calcul conform procedurii propus:

$$AD = \frac{(D_{\text{probă}} - D_{\text{probă sterilă}} - D_{\text{control}})}{t} * K * 1,5 * 10,$$

unde AD – activitatea dehidrogenazei, mg TFF/10 ml/1 oră;

$D_{\text{probă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei analizate, media a 3 măsurări;

$D_{\text{probă sterilă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei sterile;

D_{control} – valoarea absolută a densității optice a reactivilor fără probă;

t – timpul incubării, ore;

K – coeficientul de corecție a densității optice conform curbei de calibrare, mg TFF/ml;

1,5 – raportul dintre amestecul pentru extragere în probă (15 ml) și în proba pentru calibrare (10 ml);

10 – recalcularea/corecția pentru 10 ml de biomasă analizată.

$$D_{\text{probă}} = 0,26; 0,27; 0,29$$

$$D_{\text{probă sterilă}} = 0$$

$$D_{\text{control}} = 0$$

$$t = 0,5$$

$$K = 0,641152899$$

$$AD_1 = \frac{(0,26 - 0 - 0)}{0,5} * 0,641152899 * 1,5 * 10 \approx 5,00 \text{ mg TFF/10 ml/1 oră}$$

$$AD_2 = \frac{(0,27 - 0 - 0)}{0,5} * 0,641152899 * 1,5 * 10 \approx 5,19 \text{ mg TFF/10 ml/1 oră}$$

$$AD_3 = \frac{(0,29 - 0 - 0)}{0,5} * 0,641152899 * 1,5 * 10 \approx 5,58 \text{ mg TFF/10 ml/1 oră}$$

$$AD \text{ medie} = (AD_1 + AD_2 + AD_3)/3 = (5,00 + 5,19 + 5,58)/3 = 5,26 \text{ mg TFF/10 ml/1 oră}$$

Exemplu de calcul conform celei mai apropiate soluții

Calculele s-au efectuat conform formulei:

$$AD = \frac{(D_{\text{probă}} - D_{\text{probă sterilă}} - D_{\text{control}})}{t} * K * 1,3 * 10,$$

unde: AD – activitatea dehidrogenazei, mg TFF/10 ml/1 oră;

$D_{\text{probă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei analizate, media a 3 măsurări;

$D_{\text{probă sterilă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei sterile;

D_{control} – valoarea absolută a densității optice a reactivilor fără probă;

t – timpul incubării, ore;

K – coeficient de corecție a densității optice conform curbei de calibrare, mg TFF/ml;

1,3 – raportul dintre amestecul pentru extragere în probă (13 ml) și în proba pentru calibrare (10 ml);

10 – recalcularea/corecția pentru 10 ml de biomasă analizată.

$$D_{\text{probă}} = 0,59; 0,56; 0,59$$

$$D_{\text{probă sterilă}} = 0$$

$$D_{\text{control}} = 0$$

$$t = 1,0$$

$$K = 0,641152899$$

$$AD_1 = \frac{(0,59 - 0 - 0)}{1,0} * 0,641152899 * 1,3 * 10 \approx 4,92 \text{ mg TFF/10 ml/1 oră}$$

$$AD_2 = \frac{(0,56 - 0 - 0)}{1,0} * 0,641152899 * 1,3 * 10 \approx 4,67 \text{ mg TFF/10 ml/1oră}$$

$$AD_3 = \frac{(0,59 - 0 - 0)}{1,0} * 0,641152899 * 1,3 * 10 \approx 4,92 \text{ mg TFF/10 ml/1oră}$$

$$AD \text{ medie} = (AD_1 + AD_2 + AD_3)/3 = (4,92 + 4,67 + 4,92)/3 = 4,84 \text{ mg TFF/10 ml/1oră}$$

Rezultatele analizelor activității dehidrogenazei din biomasa fermentată sunt prezentate în tabel.

Tabel

Condiții	Date cantitative	
	Procedeul conform invenției	Conform celei mai apropiate soluții
Biomasa fermentată (60% borhot de la distilarea alcoolului + 40% bălegar)	1 ml	1 ml
clorură de 2,3,5- trifeniltetrazoliu (TTC), 1%	1 ml	1 ml
Concentrația de glucoză	0,1 M	-
	0,2 M	1 ml
CaCO ₃	-	10 mg
Soluție tampon de fosfat, pH=7,2	2 ml	-
Alcool etilic, 96%	10 ml	10 ml
Scualenă (2,6,10,15,19,23-hexametiltetracoza - 2,6,10,14,18,22-hexaen)	0,025 mg	-
Timpul de incubare, min	30	55
Activitatea dehidrogenazei, mg TFF(10 ml)	5,26	4,84

Rezultatele obținute demonstrează că durata incubării probelor analizate s-a redus de 2 ori în comparație cu condițiile analizei activității dehidrogenazei conform procedurii cunoscute, ceea ce este condiționat de utilizarea adaosului biologic activ de scualenă, de majorarea concentrațiilor de TTC și glucoză, precum și de utilizarea soluției tampon, ceea ce stabilizează activitatea dehidrogenazei, iar agitarea suplimentară a amestecului după incubare majorează precizia analizei datorită îmbunătățirii solubilității și a extracției TFF în soluția hidroalcoolică a amestecului analizat. De rând cu aceasta, accelerarea esențială a procesului de efectuare a analizei asigură reducerea volumului de muncă, iar concomitent se reduce consumul de energie datorită reducerii duratei de incubare a probelor în termostat.

Nu este mai puțin importantă operativitatea tehnologică a rezultatelor analizei care este mai înaltă în comparație cu condițiile de efectuare a lor în conformitate cu cea mai apropiată soluție – procedeul cunoscut, ceea ce permite o dirijare operativă a procesului de obținere a biogazului, de exemplu, prin introducerea adaosurilor stimulante pentru intensificarea producției de biogaz din biomasa și majorarea maxim posibilă a conținutului de biometan.