ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ: ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
т. XXVII, № 1, 1974

УДК 578.08.66,098

Э. М. АКОПЯН, И. Ф. БАУМ, А. Е. ЕРШОВ, О. Б. КОМАРОВ

ПРИМЕНЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА АНАЛИЗА ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОГО ЭКСПРЕССНОГО ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ФОСФОРА

Неорганический фосфор является одним из наиболее важнейших компонентов минерального питания микроорганизмов, используемых для получения белково-витаминных концентратов. Отклонение концентрации неорганического фосфора в культуральной жидкости от необходимой величины в процессе микробиосинтеза приводит к уменьшению производительности, угнетению роста популяции микроорганизмов, ухудшает качество продукта биосинтеза, увеличивает расход сырья и может привести к срыву процесса. В настоящее время динамика потребления неорганического фосфора из культуральной жидкости растущей популяцией микроорганизмов, вследствие отсутствия необходимых технических средств, недостаточно изучена. Однако установлено, что он потребляется весьма интенсивно. Поэтому задача экспрессного автоматического измерения и регулирования концентрации неорганического фосфора в ферментере является весьма актуальной.

На сегодняшний день концентрация неорганического фосфора в промышленности микробиологического синтеза определяется колориметрическим методом Бриггса, согласно которому в растворе, содержащем неорганический фосфор, в присутствии молибденовокислого аммония идет образование фосфорно-молибденовой кислоты и восстановление ее гидрохиноном и двуокисью серы, а сам раствор окрашивается в устойчивый синий цвет. Интенсивность окраски раствора пропорциональна концентрации неорганического фосфора в нем и определяется на фотоэлектроколориметре. Такой способ определения концентрации неорганического фосфора в культуральной жидкости имеет ряд существенных недостатков в условиях промышленного культивирования микроорганизмов. Во-первых, пользоваться этим методом можно только при определении неорганического фосфора в бесцветных растворах, в противном случае естественная окраска испытуемого раствора повлияет на интенсивность окраски его в синий цвет. А как известно, культуральная жидкость представляет собой суспензию, содержащую высокие концентрации микроорганизмов (примерно двести грамм на литр), мелкодисперсные частицы парафинов и имеет большую мутность. Поэтому исследуемая проба должна подвергаться предварительной сепарации и фильтрации. Во-вторых, время определения концентрации фосфора составляет 55—60 мин. Задержка фактических данных о кон-

центрации (с запозданием 60 мин) приводит к невозможности поддержания необходимой концентрации фосфора в ферментере, т. е. к избытку или недостатку его, что несомненно отражается на ряде показателей процесса биосинтеза.

Таким образом, метод Бриггса является «ручным способом» и не позволяет автоматически измерять и поддерживать нужную концентрацию неорганического фосфора, и, следовательно, не может удовлетворять требованиям современного автоматизированного производства, осуществляемого в широких масштабах в настоящее время.

Для решения задачи экспрессного автоматического измерения и регулирования концентрации неорганического фосфора в процессе ферментации дрожжей рода Candida, нами была предложена система, работа которой основана на методе кинетического анализа*. Сущность этого метода состоит в использовании зависимости скорости химической реакции от концентрации реагирующих веществ:

$$V = \frac{dx}{dt} kC_A C_B, \qquad (1)$$

где V — скорость химической реакции,

t — время,

k — константа скорости реакции,

C_A и C^B — концентрации исходных веществ,

x — концентрация продуктов реакции.

Скорость реакции определяется по скорости изменения какого-либо физического или химического параметра, пропорционально связанного с концентрацией одного из веществ, участвующего в химической реакции, например, вещества x.

В нашем случае используется связь величины оптической плотности D культуральной жидкости, содержащей искомую концентрацию неорганического фосфора, с концентрацией окрашенного вещества x, образующегося после добавления в культуральную жидкость реагента, т. е. используется закон Бугера — Ламберта — Беера:

$$D = Elx,$$

где D — величина оптической плотности,

E — молярный коэффициент погашения,

x — концентрация окрашенного вещества,

l — толщина кюветы.

Перепишем исходное уравнение (1) в виде

$$\frac{dx}{dt} = k(A - x)C, \qquad (2)$$

где A и (A—x) — начальная и текущая концентрации исходного вещества A,

C — определяемая концентрация,

k — константа скорости реакции.

---

* Яцимирский К. Б. Кинетические методы анализа. Изд. „Химия", 1967 г.

При наличии чувствительных методов определения вещества x в начальный момент реакции, когда концентрация x мала по сравнению с A, уравнение (2) можно переписать в виде:

$$C = \frac{\frac{dx}{dt}}{kA}. \qquad (3)$$

Если вместо x использовать, как было сказано выше, величину оптической плотности D, пропорционально связанную с x, то из (3) получим:

$$C = \frac{\frac{dD}{dt}}{kA},$$

где $\frac{dD}{dt} = \operatorname{tg}\alpha$ -- тангенс угла наклона зависимости изменения оптической плотности раствора от времени. Следовательно, определив аппаратурным путем величину $\frac{dD}{dt}$, легко найти искомую концентрацию:

$$C = \frac{1}{kA}\operatorname{tg}\alpha. \qquad (4)$$

Изменение величины $\operatorname{tg}\alpha = \frac{dD}{dt}$ в зависимости от концентрации C иллюстрируется рис. 1. Получение сигнала, пропорционального величине $\frac{dD}{dt}$, а следовательно и искомого значения концентрации (согласно формуле

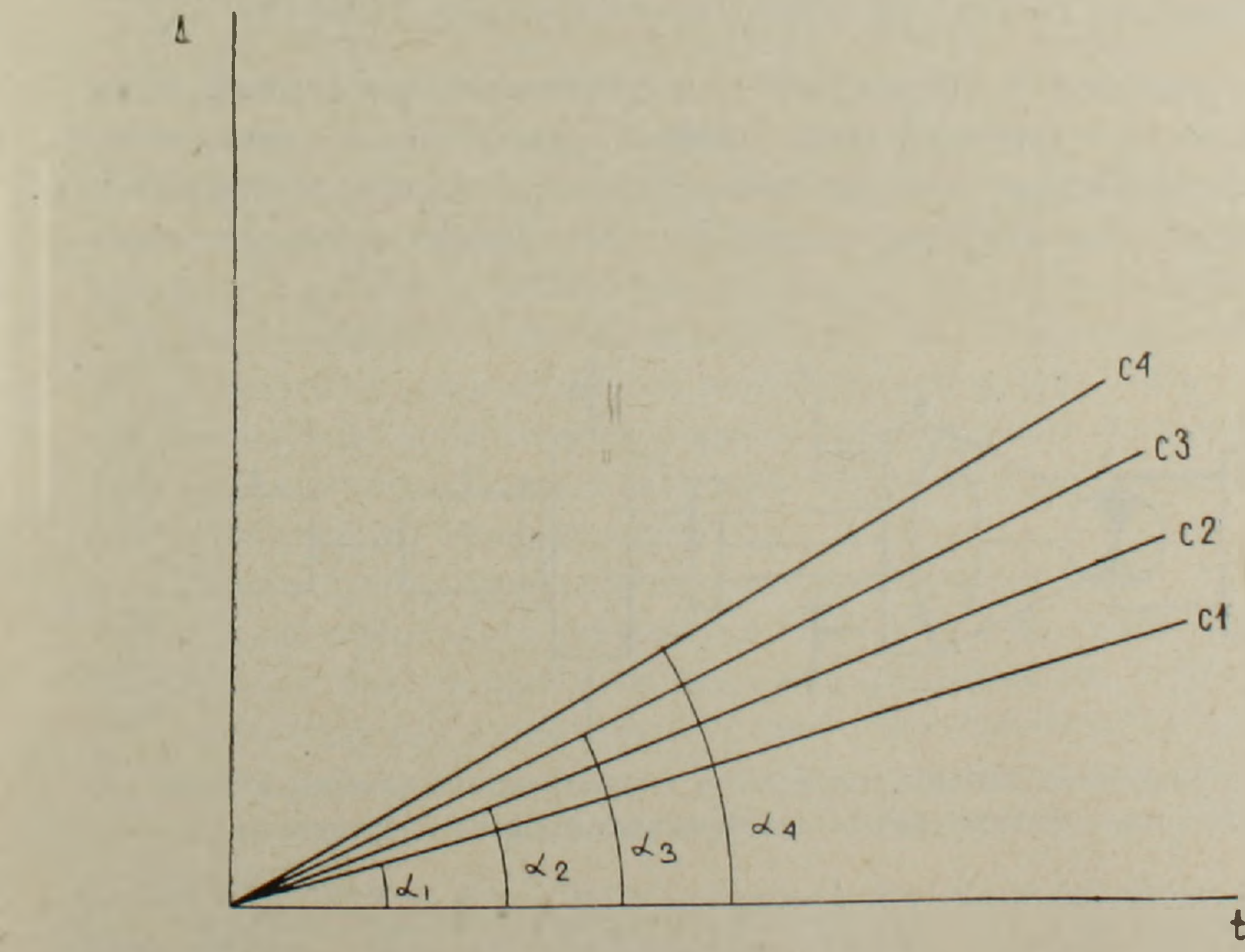

Рис. 1. Зависимость угла наклона кривой оптической плотности раствора от концентрации в нем неорганического фосфора.

(4)) происходит следующим образом. Из ферментера Ф (рис. 2) с помощью дозирующего насоса (1) непрерывно осуществляется отбор культуральной жидкости, которая попадает в смесительный коллектор (2). Программно-временное устройство (10) включает с определенной частотой насос (1), подающий в смесительный коллектор дозированное

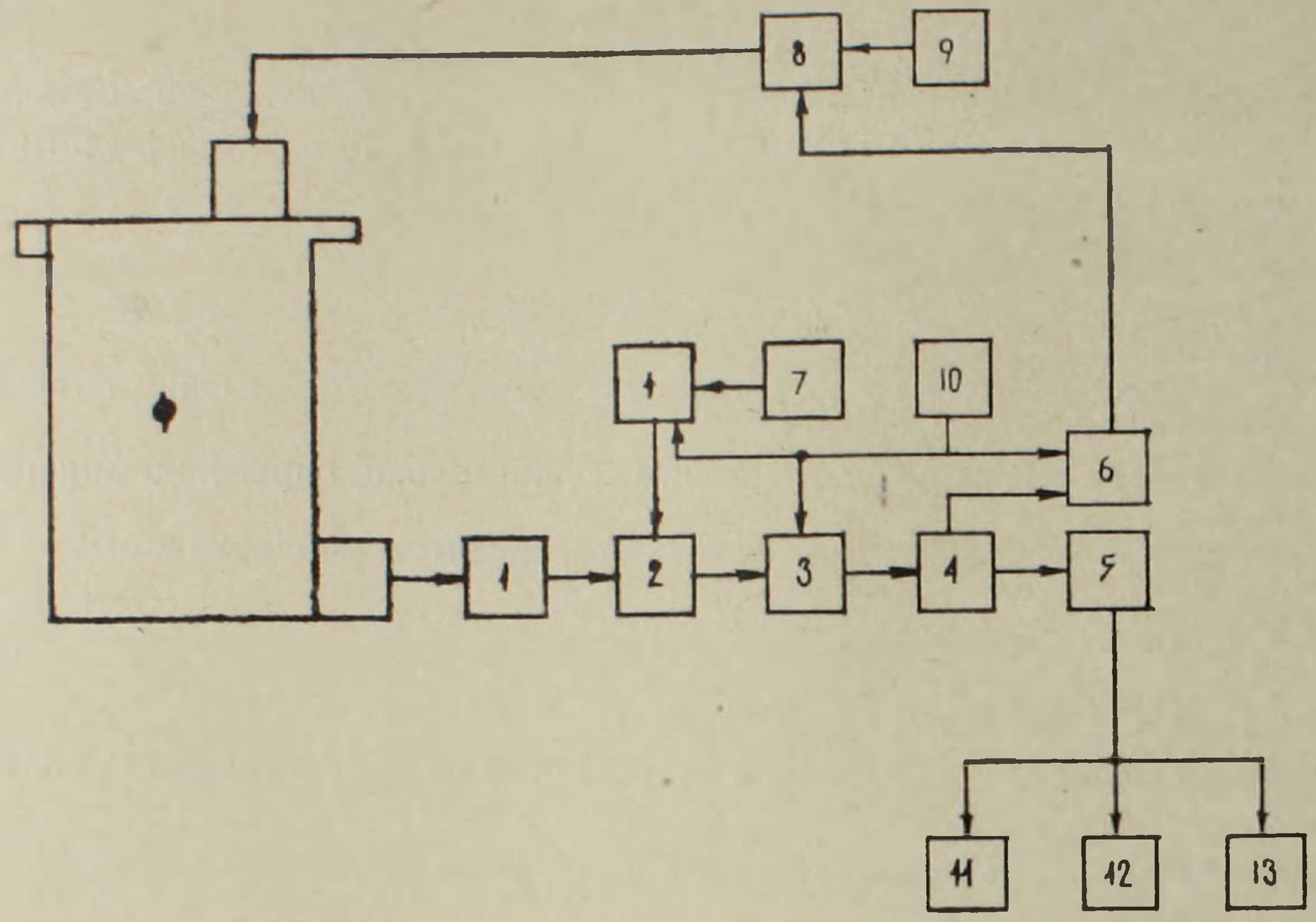

Рис. 2. Блок-схема системы экспрессного автоматического измерения и регулирования концентрация неорганического фосфора в ферментере.

количество реагента из емкости (7). В смесительном коллекторе происходит интенсивное перемешивание пробы с реагентом и начинающая вступать в химическую реакцию смесь быстро подается в проточную кювету электронно-оптического датчика (3), схема которого приведена на рис. 3.

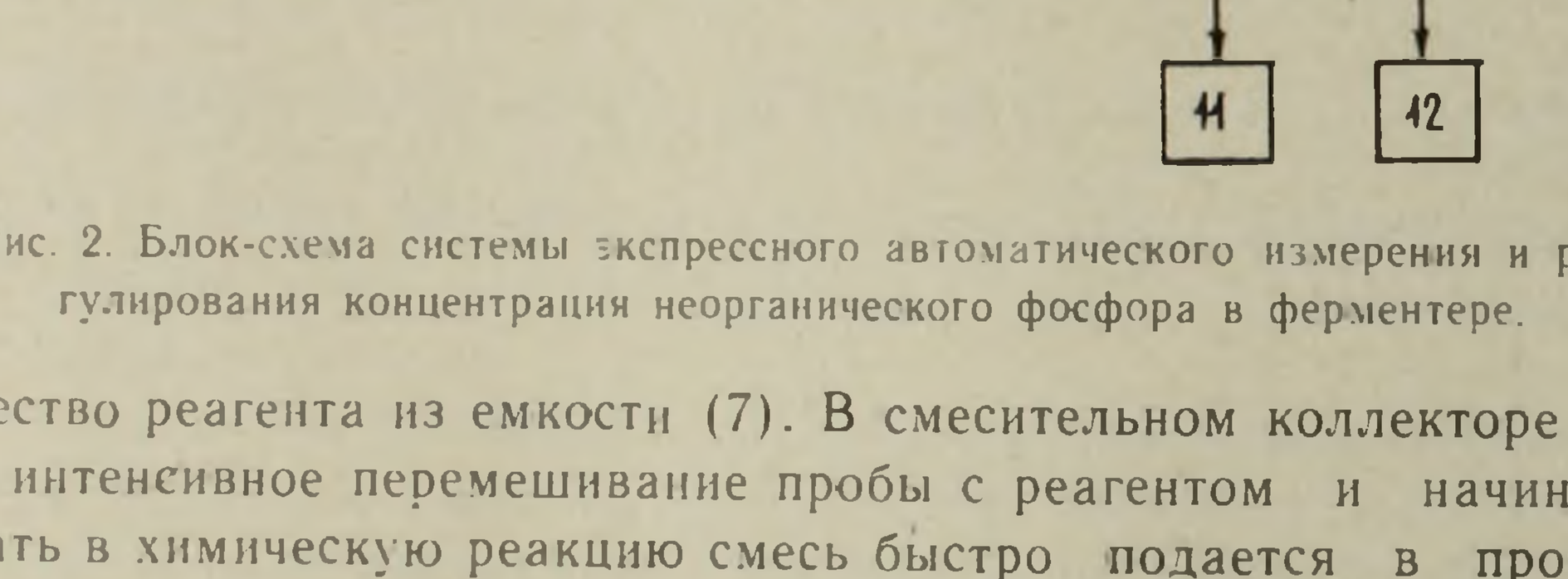

Рис. 2. Блок-схема системы экспрессного автоматического измерения и регулирования концентрации неорганического фосфора в ферментере.

Источником света (2) служит лампа СЦ61 (8 в, 20ВТ). Для получения требуемой точности работы электронно-оптического датчика необходимо иметь постоянный накал для лампы, который осуществляется

специальным стабилизирующим устройством (1). Точность стабилизации напряжения на выходе питающего устройства составляет ±0,5%.

Лучи от нити лампы, пройдя конденсор (3), выходят параллельным пучком. Далее параллельный пучок идет через интерференционный светофильтр (5) и проточную кювету (6) на фотоприемник (7). В качестве фотоприемника используется фотоэлектронный умножитель (ФЭУ-28). Необходимый световой поток задается ирисовой диафрагмой (4) по сигналу с ФЭУ. С выхода ФЭУ сигнал, пропорциональный пропусканию τ, поступает в функциональный преобразователь (8), где он логарифмируется, что делает возможным на выходе функционального преобразователя (8) получить сигнал, пропорциональный оптической плотности $D=-\lg \tau$. С выхода функционального преобразователя сигнал поступает в электронный блок (4) (рис. 2), где он усиливается и дифференцируется, т. е. получается значение сигнала пропорционального $\frac{dD}{dt}$, а величина этого сигнала в свою очередь пропорциональна величине искомой концентрации C (см. формулу 4). Далее этот сигнал поступает в аналогово-цифровой преобразователь, где он преобразуется в единичный последовательный код, т. е. $\frac{dD}{dt} = u = k_1 n$,

где k_1 — коэффициент преобразования,

n — величина цифрового кода.

В аналогово-цифровой преобразователь (5) на рис. 2 входят помимо кодирующей части, регистр памяти, матрицы дешифратора для ламповой цифровой индикации (11), цифропечатающее устройство (12) и блок код-аналог для вывода данных на самописец (13). Для поддержания в ферментере Ф значения концентрации неорганического фосфора на заданном уровне предусмотрен регулятор (6). Сигнал пропорциональный величине концентрации неорганического фосфора поступает на вход регулятора из блока (4). В регуляторе величина сигнала сравнивается со значением уставки задатчика и в зависимости от результатов сравнения выдается управляющий сигнал на исполнительный механизм (8). Исполнительный механизм осуществляет подачу P_2O_5 из емкости (9) до тех пор, пока концентрация неорганического фосфора в ферментере не достигнет заданной величины, после чего работа исполнительного устройства (8) прекращается.

Работа всего устройства происходит в соответствии с командами программно-временного устройства ПВУ (10). В промежутке между сигналами с ПВУ в пробу, непрерывно протекающую через смесительный коллектор (2) и проточную кювету электронно-оптического датчика (3), не добавляется реагент, в заблокированном состоянии находится функциональный преобразователь, вход электронного блока (4) и регулятор (6).

Следует отметить, что реализация формулы (4) дает точные результаты только в начальный период редакции, поэтому получение и форми-

рование сигнала, пропорционального $\frac{dD}{dt}$, происходит в первый момент от начала реакции. Так как информация о концентрации неорганического фосфора заложена в сигнале пропорциональный $\frac{dD}{dt}$, то такие факторы, как абсолютная мутность пробы, нестабильность источника света и фотоприемника не играют роли в процессе измерения и не требуют второго компенсирующего канала электронно-оптического датчика, что значительно упрощает конструкцию датчика и вторичной обрабатывающей аппаратуры, повышает точность измерения.

Описанное устройство в различных модификациях может использоваться в медицинских, биохимических, аналитических и других исследованиях. Например, анализ концентрации фосфора в крови, динамика потребления фосфора биообъектами, определение фосфора в химических реакциях и т. д.

Всесоюзный научно-исследовательский
биотехнический институт, Москва

Поступило 26.V 1973 г.

Է. Մ. ՀԱԿՈԲՅԱՆ, Ի. Ֆ. ԲԱՈՒՄ, Ա. Ե. ԵՐՇՈՎ, Օ Բ. ԿՈՄԱՐՈՎ

ԿԻՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԱՆԱԼԻԶԻ ՄԵԹՈԴԻ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ ՖՈՍՖՈՐԻ ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՑԻԱՅԻ ԱՎՏՈՄԱՏԻԿ ԷՔՍՊՐԵՍ ՉԱՓՈՒՄՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Անօրգանական ֆոսֆորը հանդիսանում է միկրոօրգանիզմների հանքային սննդառության ամենակարևոր կոմպոնենտներից մեկը, որոնք օգտագործվում են սպիտակուցա-վիտամինային կոնցենտրատների ստացման համար։

Այժմ անօրգանական ֆոսֆորի կոնցենտրացիան որոշվում է Բրիգսի կոլորիմետրիկ մեթոդով։ Սակայն Բրիգսի մեթոդը թույլ չի տալիս ավտոմատիկ չափումներ կատարել և պահպանել անօրգանական ֆոսֆորի անհրաժեշտ կոնցենտրացիան ֆերմենտյորներում, հետևաբար չի կարող բավարարել ժամանակակից ավտոմատացված արդյունաբերության պահանջներին։ Candida ցեղի խմորասնկերի ֆերմենտատիվ պրոցեսում, էքսպրես ավտոմատիկ չափումների և անօրգանական ֆոսֆորի կոնցենտրացիայի կարգավորման խնդիրը լուծելու համար մեր կողմից առաջարկված է մի սխեմա, որի աշխատանքը հիմնված է կինետիկական մեթոդի վրա։

Նկարագրված սարքավորումը տարբեր մոդիֆիկացիաներով կարող է կիրառվել բժշկական, բիոքիմիական, անալիտիկ և այլն ուսումնասիրություններում։