

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Vojtěch Vyklický

Srovnání sedimentačních vlastností vybraných kvasničných suspenzí praktického významu metodou zobrazovací fotometrie

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Ing. Petr Sladký, CSc.

Studijní program: Fyzika, obecná fyzika

2007

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval doc. Ing. Petru Sladkému, CSc. za odborné vedení bakalářské práce. Dále pak děkuji Bc. Martinu Srkalovi za pomoc při vývoji softwaru použitého k počítačovému zpracování naměřených dat a věcné připomínky. V neposlední řadě mu také děkuji za podporu a přátelské pracovní prostředí.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsal(a) samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Praze dne 29. května 2007

Vojtěch Vyklický


Obsah

1 Úvod	6
2 Teoretický úvod	7
2.1 Disperzní systémy	7
2.2 Rozptyl světla	8
2.3 Sedimentace	10
2.4 Metoda sedimentační rychlosti	11
3 Experimentální část	15
3.1 Měřicí aparatura	15
3.2 Formazin	16
3.3 Separon	17
3.4 Kvasinky	18
4 Výsledky měření a diskuze	20
4.1 Závislost mezi koncentrací a intenzitou rozptylu částic	20
4.2 Měření rychlosti sedimentace separonu	21
4.3 Měření rozměrové distribuce sedimentujících kvasinek	24
5 Závěr	29
Literatura	30

Název práce: Srovnání sedimentačních vlastností vybraných kvasničných suspenzí praktického významu metodou zobrazovací fotometrie

Autor: Vojtěch Vyklický

Katedra (ústav): Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Ing. Petr Sladký, CSc.

e-mail vedoucího: Petr.Sladky@mff.cuni.cz

Abstrakt: Tato práce se zabývá možnostmi využití CCD detektoru pro snímání časového vývoje intenzitních profilů záření zpětně rozptýleného od rozhraní sedimentujících suspenzí. Takto získaná data jsou pomocí navrženého modelu použita k charakterizaci částic v suspenzi obsažených. Speciálně pak k určení střední velikosti a pološířky distribuce velikosti kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* jakožto modelového eukaryotního organismu, u kterého nás často zajímají jeho rozměry. Pro určení přesnosti metody bylo měření sedimentační rychlosti taktéž provedeno na modelové suspenzi monodisperzních křemičitých částic o velikosti $10\ \mu\text{m}$ v destilované vodě. Pro ověření předpokladu lineárního vztahu mezi koncentrací částic a intenzitou rozptýleného záření je zde provedeno měření této závislosti a určený rozsah její platnosti. Součástí práce je sestavení měřící aparatury, jež je založena na CCD detektoru obsaženém v komerční webkameře a umožňuje paralelní měření více vzorků najednou.

Klíčová slova: sedimentace, kvasinky, zobrazovací fotometrie, CCD detektor

Title: Comparison of sedimentation properties of selected yeast suspensions of practical importance using the method of imaging photometry

Author: Vojtěch Vyklický

Department: Department of Chemical Physics and Optics

Supervisor: Doc. Ing. Petr Sladký, CSc.

Supervisor's e-mail address: Petr.Sladky@mff.cuni.cz

Abstract: In this thesis, we study the options of applications of CCD detector for imaging the time evolution of intensity profiles of back scattered light from the interface of sedimentated suspension. Obtained data have been used for the characterization of particles in the suspension using designed model. Especially for assignment of median size and half-width of the distribution of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, the model of eukaryotic organisms for which we are often interest in the size. For evaluation of correctness of the method, the measurement of the sedimentary speed was also simulated in the test suspension of monodispersed silica particles of the dimension $10\ \mu\text{m}$ in distillate water. The measurement of dependence of concentration of the particles, and intensity of the light and assessment of range of the validity was investigated for the verification of the presumption of the linear dependence. The result of this research is also used for construction of the measuring apparatus based on the CCD detector which is a component of common commercial web camera; the apparatus provides parallel measurements of many samples at the same time.

Keywords: sedimentation, yeast, imaging photometry, CCD detector

Kapitola 1

Úvod

Kvasinky patří mezi mikroorganismy s významným praktickým využitím nejen pro výrobu alkoholických nápojů, potravin a léčiv, ale v poslední době též pro výrobu paliva v podobě bioetanolu pro pohon dopravních prostředků [14]. Důležitou zpracovatelskou vlastností kvasinek je jejich schopnost sedimentovat v gravitačním poli [2].

Sedimentace kvasinek se stanovuje jednoduše gravimetricky v sedimentačních nádobách nebo odsáváním známého objemu ze známé hloubky a počítáním jedinců v objemové jednotce odsáté kvasničné suspenze [24].

Informačně více účinné je stanovení koncentrace sedimentujících kvasnic turbidimetrickými metodami, založenými na měření světla, které rozptylují [15]. Předností turbidimetrických metod resp. metod založených na elastickém rozptylu světla je, že umožňují sledovat nejen proces sedimentace kvasnic, ale i celý kvasný proces včetně sedimentace částic kvasných substrátů během jejich přípravy do zkvasitelné podoby, jako je tomu např. v případě přípravy a kvašení sladiny a mladiny [17], [18].

Výzkumu, vývoji a využití nových turbidimetrických metod pro pivovarskou a sladařskou analýzu se věnuje i oddělení opto-termální spektroskopie na katedře chemické fyziky Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze, v jehož laboratoři předložená bakalářská práce vznikla.

Rámcovým cílem této bakalářské práce bylo pomocí nenákladných přístrojových pomůcek a vyhledávacích měření ověřit možnost rozšíření stávajících, převážně jednocestných turbidimetrických metod a přístrojů, vyvinutých v oddělení [3], [15], [19], [20], [21], o metody vícekanálové, založené na principu zobrazovací fotometrie.

Kapitola 2

Teoretický úvod

2.1 Disperzní systémy

Disperzní systém, zkráceně též disperze, je soustava obsahující *disperzní prostředí* a *disperzní podíl*, který je ve formě částic v disperzním prostředí rozptýlen. Až na malé výjimky představují disperzní podíl a disperzní prostředí dvě chemicky odlišné složky nebo směsi složek.

Disperzní podíl lze charakterizovat z různých hledisek. Jestliže jsou všechny dispergující částice v systému stejně velké, tak ho nazýváme monodisperzní. V případě různé velikosti částic ho pak nazýváme polydisperzní. Pro charakterizaci takové soustavy je nutné zadat tzv. distribuční funkci velikosti částic. Podle velikosti částic pak systémy rozdělujeme na hrubé disperze (suspenze, emulze, dým, prach), koloidní disperze (micelární koloidní roztoky, roztoky makromolekulárních sloučenin) a analytické disperze (pravé roztoky nízko-molekulárních látek). Rozměr koloidně disperzní částice se udává od 1 nm do 1 μm . Horní hranice velikosti koloidní částice řádově odpovídá rozlišení mikroskopu pracujícího s viditelným světlem. Částice se též rozdělují z hlediska jejich tvaru na izometrické (sféricky symetrické) a anizometrické (zploštělého či protáhlého tvaru) [12].

Disperzní částice je obklopena molekulami disperzního prostředí, které vykonávají tepelný pohyb. Jejich nerovnoměrné nárazy uvádějí do tepelného pohybu i samotné částice. Intenzita tohoto tepelného pohybu částic roste s teplotou a klesá s jejich rozměrem. Udává se, že u částic větších rozměrů než 4 μm není již pohyb znatelný [12]. Důsledkem translačního tepelného pohybu částic a molekul je samovolné vyrovnávání koncentrací. Kdybychom měli nádobu striktně rozdělenou na dvě části, kde by v jedné části byla

disperzní soustava a v druhé části čisté disperzní prostředí, potom by pohybující se částice postupně opustily vyhrazený objem a rozptýlily se do celého objemu, jež by měly nyní k dispozici. Tomuto jevu se říká *difúze*. Jiný způsob vyrovnávání koncentrací je přes polopropustnou membránu. Tomuto jevu se říká osmóza a je taktéž způsobený tepleným pohybem. Osmózou se zde ale zabývat nebudeme.

2.2 Rozptyl světla

Při šíření elektromagnetického záření hmotným prostředím vyvolává oscilující pole v molekulách nucené kmity, které lze v prvním přiblížení považovat za synchronní s budícím zářením. Z důvodu velké setrvačnosti jader se kmity realizují prakticky jen pohybem elektronů. Amplituda $D^{(0)}$ indukovaného dipólového momentu molekuly je ve slabých polích úměrná velikosti amplitudy elektrické intenzity $E^{(0)}$ působícího pole

$$D_i^{(0)} = \alpha_{ij} E_j^{(0)}, \quad (2.1)$$

kde α je tenzor polarizovatelnosti molekuly a je zde použito Einsteinovy sumační konvence. Oscilující dipólový moment molekuly je však sám elementárním zdrojem sekundárního záření. Kmity blízkých molekul mají definovaný fázový rozdíl a proto navzájem interferují. Tato interference je v případě buzení rovinnou vlnou destruktivní ve všech směrech kromě směru šíření budícího záření [13]. Složením budící a rozptýlené vlny vznikne rovinná vlna šířící se fázovou rychlostí

$$v = \frac{c}{n}, \quad (2.2)$$

kde n je index lomu daného prostředí a c rychlost světla ve vakuu. Pro anizotropní prostředí index lomu závisí na směru šíření vlnění, proto je to obecně tenzor. Jelikož při této interakci nedochází k předávání energie mezi světlem a molekulami látky, nazývá se elastická.

V opačném případě by se jednalo o interakci neelastickou. Jednou z nejčastějších neelastických interakcí je absorpce procházejícího záření molekulami prostředí, čímž se zmenšuje jeho intenzita I . Tento pokles intenzity lze popsat Lambert-Beerovým zákonem

$$I = I_0 e^{-\ell}, \quad (2.3)$$

kde ϵ je tzv. absorpční koeficient a l je dráha, kterou urazí světlo v daném prostředí. Mnoho dalších neelastických interakcí světla s látkou je podrobně popsáno v [13].

Situace se však komplikuje v případě, kdy prostředí obsahuje nehomogenity o nezanedbatelných rozměrech vůči vlnové délce procházejícího elektromagnetického záření. Takovými nehomogenitami mohou být například buňky rozptýlené v roztoku, makromolekuly v nízkomolekulárním rozpouštědle či jen rozdílná hustota molekul v kapalině způsobená neuspořádaným tepelným pohybem. Vlivem těchto rozptylových center dochází k narušení destruktivní interference sekundárních vln a vlnění se šíří v jiných směrech než by odpovídalo zákonům odrazu a lomu (viz [11]). Úhlové rozložení intenzity rozptýleného záření a jeho polarizační vlastnosti závisejí na hustotě, velikosti a tvaru rozptylových center.

Pro různé poměry velikosti částic vůči vlnové délce dopadajícího záření můžeme zavést různé aproximace výsledného vyzařovacího diagramu. Rozlišujeme tak mezi Rayleighovým, Rayleigh-Debyeovým a Mieovým rozptylem.

Rayleighova teorie rozptylu je nejjednodušší aproximace elastického rozptylu, která považuje rozptylová centra za zdroje dipólového záření. Tato aproximace je použitelná jen pro velmi malá izotropní rozptylová centra, jejichž rozměr nepřesahuje dvacetinu vlnové délky rozptylovaného záření. Intenzita rozptýleného záření nepřímo roste se čtvrtou mocninou vlnové délky záření dopadajícího.

Rayleigh-Debyeova teorie vychází z představy, že rozptylující částice je složena ze souboru elementárních zdrojů, jenž lze popsat Rayleighovou teorií. Zde je však potřeba uvažovat vzájemnou interferenci rozptýleného záření dopadajícího do detektoru z různých partií dané částice s různou fází. Z této úvahy je vidět, že paprsky rozptýlené ve směru primárního paprsku dopadají do detektoru se stejnou fází, proto není jejich intenzita interferencí ovlivněna. Naopak záření rozptýlené proti směru dopadajícího záření je interferencí nejvíce zeslabeno. Takto lze popisovat i částice obecného tvaru.

Mieova teorie je ze všech teorií nejobecnější. Lze jí popsat sféricky symetrická rozptylová centra o libovolné velikosti, avšak za její obecnost platíme její složitostí. Výsledky této teorie konvergují k výsledkům teorie Rayleighovy pro malá rozptylová centra a na druhé straně k výsledkům daným lomem, odrazem a difrakcí záření na velkém rozptylovém centru. Mezi těmito krajními případy vykazuje vyzařovací diagram poměrně komplikovaný charakter.

2.3 Sedimentace

Sedimentací nazýváme proces usazování těžších disperzních částic v disperzním prostředí vlivem působení silového pole.

Na částici o hmotnosti m a objemu V působí v kapalině o hustotě ρ a dynamické viskozitě η následující tři síly:

- Tíhová síla

$$\vec{G} = m\vec{g} \quad (2.4)$$

- Odporová síla prostředí

$$\vec{F}_{odpor} = 6\pi\eta r\vec{v} \quad (2.5)$$

- Vztlková síla

$$\vec{F}_{vztlak} = V\rho\vec{g} \quad (2.6)$$

Po určitém čase se částice v gravitačním poli \vec{g} začne pohybovat rovnoměrně přímočaře a síly \vec{G} , \vec{F}_{odpor} a \vec{F}_{vztlak} přejdou do rovnováhy. Pro velikosti těchto sil platí

$$G - F_{odpor} - F_{vztlak} = 0 \quad (2.7)$$

Po dosazení 2.4, 2.6 a 2.5 do 2.7 a využití vztahu pro objem koule $V = \frac{4}{3}\pi r^3$, již jednoduše vyjádříme rychlost sedimentace v kulové částice jako

$$v = \frac{2g(\rho_t - \rho)r^2}{9\eta}, \quad (2.8)$$

kde ρ_t označuje hustotu a r poloměr kulové částice pohybující se v kapalině.

Pro tělesa tvaru rotačního elipsoidu, jako jsou například kvasinky, můžeme vztah 2.8 modifikovat na

$$v = \frac{2g(\rho_t - \rho)\sqrt[3]{a^2b^4}}{9\eta}, \quad (2.9)$$

kde a vyjadřuje velikost velké a b vyjadřuje velikost malé poloosy rotačního elipsoidu [10].

Výše použitý vztah 2.5 pro odporovou sílu (tzv. Stokesův zákon), platí pro kulové částice výrazně větší než molekuly prostředí, které pak lze považovat za kontinuum. Rychlost pohybu částice musí být na druhé straně natolik malá, aby odpovídala oblasti laminárního proudění charakterizovaného Reynoldsovým číslem $Re \ll 1$, které je definováno jako

$$Re = \frac{2r\rho v}{\eta}. \quad (2.10)$$

Další podmínkou Stokesova zákona je, aby disperze byla natolik zředěná, že jednotlivé částice jsou od sebe dostatečně vzdálené, takže hydrodynamický profil kapaliny obtékající jednu částici není ovlivňován profilem jiné částice nebo dokonce povrchem sedimentační nádoby. Při vyšších koncentracích mohou také jednotlivé částice mít tendence k vzájemnému přitahování či odpuzování, což ovlivňuje rychlost sedimentace.

Vzhledem k tomu, že lze v některých případech obtížně dosáhnout dostatečně zředěných disperzí, aby na nich bylo možné provádět měření a zároveň byly částice natolik vzdáleny, aby se vzájemně neovlivňovaly, je někdy nutné zavést tzv. korekci na koncentraci. Ta spočívá v provedení měření pro několik různých koncentrací a poté se tyto výsledky extrapolují pro koncentraci jdoucí k nule.

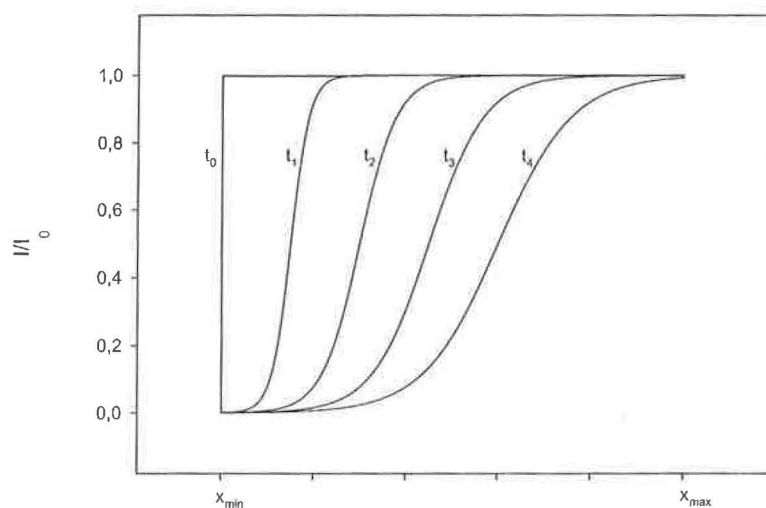
Sedimentaci lze v praxi použít pro hrubé disperze ($100\ \mu\text{m}$ až $1\ \mu\text{m}$), pro které je rychlost sedimentace dostatečně velká, ale jsou stále splněny výše uvedené podmínky. U koloidních disperzí je většinou doba sedimentace natolik dlouhá, že je pro laboratorní praxi neúnosná. Proto se v praxi pro koloidní disperze používá sedimentace v odstředivém poli ultracentrifugy, jež dosahuje až $2 \cdot 10^5$ -násobek gravitačního zrychlení Země. Úměrně tomu se také zvýší rychlost sedimentace. Jelikož v případě sedimentace v odstředivém poli je odstředivé zrychlení úměrné vzdálenosti od osy otáčení, je jeho popis komplikovanější než prostá sedimentace v gravitačním poli, kde je rozdíl v tíhovém zrychlení v různých částech sedimentační nádoby minimální.

2.4 Metoda sedimentační rychlosti

Vzhledem k výrazné závislosti sedimentační rychlosti na rozměrech disperzních částic, je možné z průběhu sedimentace určit velikost i jejich statistickou distribuci. Jak bylo uvedeno výše, u hrubých disperzí se sedimentace provádí v gravitačním poli. U disperzních částic dosud nerozptýlených

v disperzním prostředí, je nejprve nutné převést je do formy suspenze. Jelikož přímé stanovení rychlosti sedimentace jednotlivých částic by bylo příliš obtížné, měří se makroskopické veličiny z rychlosti sedimentace odvozené. Jednou z těchto metod je metoda sedimentační rychlosti vycházející z měření změny koncentrace částic disperzního podílu, jenž je registrována různým stupněm rozptylu dopadajícího světla.

Předpokládejme, že v čase t_0 je suspenze dokonale promíchána a koncentrace částic c_0 je v celém objemu konstantní. Potom v případě monodisperzního systému je sedimentační rychlost všech částic stejná. To znamená, že částice jenž se v čase t_0 nacházely u hladiny, se v čase t_1 budou nacházet o dráhu $s = v(t_1 - t_0)$ blíže ke dnu nádoby. Za rychlost v zde dosazujeme vztah 2.8 či 2.9. Během této doby dojde k vytvoření rozhraní mezi disperzním systémem a disperzním prostředím. Jelikož stejné množství částic, jenž svým poklesem snížily koncentraci u hladiny, klesly a usadily se na dně nádoby, koncentrace částic pod vytvořeným rozhraním se až k rozhraní sedlin na dně nezmění. Z toho vyplývá, že skokové rozhraní mezi nulovou a původní koncentrací částic se pohybuje směrem ke dnu rychlostí 2.8 či 2.9.

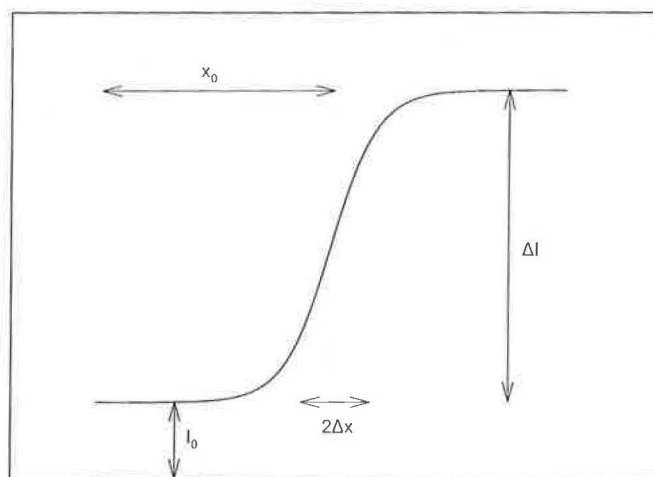


Obrázek 2.1: Teoretický průběh sedimentujícího rozhraní polydisperzních částic v různých časech od začátku sedimentace.

V případě polydisperzního systému se spojitou distribuční funkcí velikosti částic je situace obdobná s tím rozdílem, že si těchto rozhraní musíme představit nekonečně mnoho nad sebou (každé se bude pohybovat svou rychlostí úměrnou rozměrům částic této frakce nezávisle na ostatních). Tím, že se rychlost různých rozhraní liší, dochází k postupnému rozplývání rozhraní v čase (dráhový rozdíl rozhraní menší a větší frakce je přímo úměrný času).

$$I = I_0 + \frac{\Delta I}{1 + e^{-\frac{x-x_0}{\Delta x}}} \quad (2.11)$$

Průběh intenzity rozptýleného záření na sedimentačním rozhraní můžeme v prvním přiblížení považovat za sigmoidální dle vztahu 2.11. Změna průběhu intenzity I normovaná počáteční velikostí intenzity I_0 v závislosti na vzdálenosti od hladiny v různých časových okamžicích v sigmoidálním přiblížení je na obrázku 2.1. Význam koeficientů ze vztahu 2.11 je naznačen na obrázku 2.2.



Obrázek 2.2: Teoretický sigmoidální průběh rozhraní s vyznačeným významem koeficientů sigmoidální funkce 2.11.

V momentě, kdy na dno dosedne poslední částice z frakce o největším poloměru, sigmoidální průběh rozhraní se začne deformovat a již nejde použít pro charakterizaci distribuce velikosti částic obsažené v sedimentující suspenzi. Sedimentace končí usazením všech částic na dně sedimentační nádoby.

Pokud chceme hodnotu koncentrace částic měřit pomocí intenzity rozptýleného záření, je nutné si uvědomit, že větší částice rozptylují více než malé částice, a proto mají i větší příspěvek k intenzitě rozptýleného záření. Dokonce samotná závislost mezi koncentrací rozptylujících monodisperzních částic a intenzitou na nich rozptýleného záření bude lineárního charakteru jen do určité hodnoty koncentrace, od které dojde k saturaci intenzity. To je do značné míry způsobeno odstíněním dopadajícího světla okolními částicemi.

Jelikož na vytvořeném koncentračním rozhraní probíhá difúze, i v případě monodisperzních soustav dochází k postupnému rozplývání rozhraní. Dalším artefaktem, jenž komplikuje průběh rozhraní, je vliv rychlosti sedimentace na koncentraci (tzv. sedimentační koeficient), což má za následek, že v oblasti rozplývajícího se rozhraní s vyšší koncentrací je rychlost jiná než v místech s koncentrací nižší. V praxi to znamená, že se rozhraní bude zaostřovat nebo ještě více rozplývat v závislosti na hodnotě sedimentačního koeficientu.

Kapitola 3

Experimentální část

3.1 Měřicí aparatura

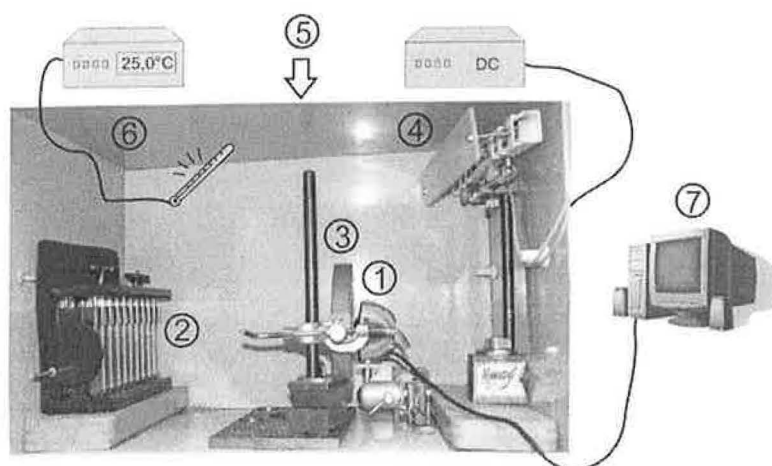
Základem celé aparatury vyobrazené na obrázku 3.1, je webkamera WebCam Live! Pro, jejímž výrobcem je firma Creative. Kamera obsahuje CCD detektor o rozlišení 640×480 pixel a je připojena k PC pomocí rozhraní USB 2.0. Software WebCam Center, který je ke kameře standardně dodáván, dokáže v zadaných intervalech zaznamenávat digitální snímky ve formátu JPEG v 8-bitové barevné hloubce.

Uprostřed zorného pole kamery je umístěno deset skleněných centrifugačních zkumavek o výšce 100 mm, vnějším průměru 16 mm a tloušťce stěn 1 mm, v kterých jsou studované vzorky. Zkumavky jsou připevněny ve stojánku, který umožňuje shodné promíchávání všech měřených vzorků najednou před započítím měření [22].

Abychom při všech měřeních docílili shodného a dobře definovaného homogenního osvětlení včetně stabilní teploty, je většina aparatury umístěna v termostatovaném boxu.

Osvětlení vzorků v měřicí komoře je realizováno osvětlovacím panelem zhotoveným z deseti bílých vysoce svítivých LED diod a difúzní clony [25]. Hlavní světelný tok však není směřován přímo na stojan se zkumavkami, ale mírně mimo, abychom docílili co největší homogenity nasvětlení pomocí difúzního světla rozptýleného na stěnách komory. Napájecí zdroj světelného panelu je umístěn mimo komoru, aby jeho ztrátové teplo nezvyšovalo teplotu uvnitř během měření.

Přes veškerou snahu o eliminaci nežádoucích reflexí na zkumavkách úpravou osvětlení, se je nepodařilo zcela odstranit. Proto je před kamerou



Obrázek 3.1: Měřící aparatura: [1] webkamera, [2] stojan se zkumavkami, [3] polarizační filtr, [4] osvětlovací panel s napájením, [5] termostatovaný box, [6] teploměr, [7] PC

umístěn polarizační filtr. Jeho správným nastavením je dále možné nežádoucí reflexe eliminovat.

Pro sledování vnitřní teploty komory je do ni zavedena teplotní sonda digitálního teploměru, jehož přesnost je $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Data přivedená do počítače z webkamery jsou v něm dále zpracovávána pomocí vyvinutého softwaru pro automatické zpracování dat [4], programu ImageJ [6] a komplexního softwaru pro analýzu vědeckých dat SigmaPlot.

3.2 Formazin

Transmisní zákal (turbidita) je definován jako míra úhrnné energie, která se při průchodu světelného paprsku vrstvou disperze o jednotkové tloušťce rozptýlí na všechny strany od tohoto paprsku. Více informace o zákalu disperzních soustav však poskytuje současné měření zákalu v dopředném a nefelometrickém směru rozptýleného světla v uspořádání dle Dienstbiera a Sladkého (viz [3], [17]–[18]). Formazin ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_2$) je látka používaná jako kalibrační standard zákalu [1]. Vyrábí se smícháním hexametylentetraminu, hydrazinsulfátu a přefiltrované destilované vody v definovaném poměru při teplotě $(25 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nechá se 24 hodin zrát. Tím se získá suspenze s hod-



Obrázek 3.2: Snímek částic formazinu prořízený pomocí SEM (Scanning Electron Microscope) [7].

notou zákalu 1000 EBC (European Brewery Convention). Jednotka EBC je používána v pivovarnictví, v jiných odvětvích se ale spíše používají jednotky FTU (Formazine Turbidity Unit), kde $1 \text{ EBC} = 4 \text{ FTU}$ nebo i jiné, které však mají převodní vztah k EBC stejný jako FTU. Částice formazinu, působící jako rozptylová centra (viz obrázek 3.2), dosahují různých rozměrů dle teploty přípravy (viz [8]). Jelikož časová stálost formazinu roste s jeho koncentrací, skladuje se ve vyšší koncentraci v chladu. Formazinová suspenze o požadovaném zákalu, se pak jednoduše získá poměrovým dělením koncentrované suspenze o známém zákalu destilovanou vodou. Použití formazinu jakožto modelové suspenze pro studium sedimentace je však, jak jsme se sami přesvědčili, zcela nevyhovující. Důvodem je to, že velikost, tvar a agregace formazinových částic je výrazně závislá na teplotě, času a jejich koncentraci [7], [19], [20].

3.3 Separon

Jako modelovou suspenzi pro ověření metodiky měření sedimentační rychlosti jsme si vybrali hydrofilní silikagel Separon SI VSK o velikosti křemičitých částic $10 \mu\text{m}$ rozptýlený v destilované vodě. Tento materiál se používá jako plnidlo do HPLC (High Performance Liquid Chromatography) kolon a vykazuje kulovitý tvar s úzkou distribucí velikosti částic, z čehož plyne malé rozplývání a snadnější určování sedimentujícího rozhraní.

Pro měření jsme si připravili devět suspenzí separonu o objemu 10 ml. První čtyři vzorky byly připraveny shodně jako suspenze separonu v destilované vodě s koncentrací suché váhy disperzního podílu $c = 2/7 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, aby-

chom mohli ověřit reprodukovatelnost metody. Další čtyři vzorky pak byly o shodné koncentraci částic jako první čtyři, avšak s postupně se měnící hustotou disperzního prostředí. Různá hustota prostředí byla vytvořena různými poměry destilované vody a 96 % lihu, který byl přidán do již vytvořené suspenze separonu ve vodě. Poměr směsi destilované vody a lihu je udán jako hmotnostní zlomek w , kde $w = 0$ označuje čistou destilovanou vodu. Jako poslední vzorek byl připraven opět separon v destilované vodě, ale tentokrát o vyšší koncentraci $c = 1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

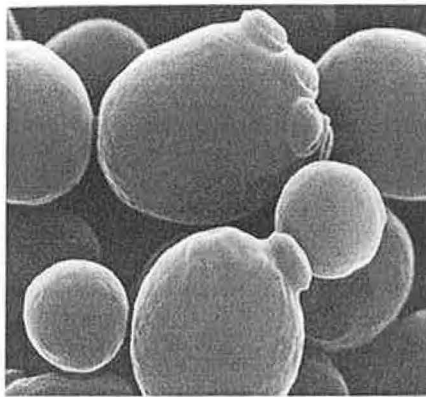
3.4 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotní mikroorganismy patřící mezi vyšší houby, tvoří však svoji taxonomickou skupinu, a proto není možné je jednotně definovat. Rozmnožují se převážně nepohlavně–pučením. Mohou také tvořit pseudomycelium napodobující kolonie jednobuněčných organismů, při kterém se rozmnožují přehrádečným dělením. Kvasinky zpracovávají zdroje uhlíku kvašením až na malé výjimky, které zdroje uhlíku zpracovávají výhradně oxidativními způsoby [2].

Kvasinky se využívají v biotechnologiích a v potravinářství, kde mají nezastupitelný význam jako pekařské droždí, při výrobě některých mléčných výrobků nebo v kvasném průmyslu při výrobě lihu, vína a piva. Jsou však mezi nimi i takové, jež způsobují nežádoucí kontaminaci při výrobním procesu nebo patogenní, které jsou původci závažných onemocnění.

Nejstarším nálezem, který dokládá využívání kvasinek pro produkci alkoholických nápojů je nález nádobek na víno pocházející z neolitické kuchyně v Hajji Firuz Tepe (8500 – 4000 let př. n. l.) na území dnešního Íránu. Kvašení bylo též známo ve starém Babylónu v období 6000 – 4000 let před naším letopočtem pro produkci nápoje podobnému dnešnímu pivu. Nejznámější kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* dostala svůj název v roce 1837, kdy ji Theodor Schwann označil jako cukernou houbu (z řeckého saccharos = cukr a mykes = houba). První jednotlivé kvasinky však pozoroval až Anton van Leeuwenhoek v podobě malých kuliček v pivě pomocí primitivního mikroskopu kolem roku 1680. V letech 1866 a 1876 publikoval L. Pasteur práce, v nichž ukázal aktivní účast kvasinek na kvasném procesu. Její čisté formy byly pak izolovány v letech 1883 – 1890 z piva E. Ch. Hansenem a z vína Müllerem-Thurgauem [5].

V systému hub (*Fungi*) patří kvasinky mezi *Eumycota* — vlastní houby, a to do dvou velkých pododdělení: *Ascomycotina* — vřecovýtrusé a



Obrázek 3.3: Snímek kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* pořízený DIC (Differential interference contrast) mikroskopii [26].

Basidiomycotina — stopkovýtrusé. Rod *Saccharomyces* je zařazován v rámci vřeckovýtrusých hub do *Endomycetes*.

Jak je vidět z obrázku 3.3, kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* vytvářejí buňky ve tvaru rotačního elipsoidu. Jejich rozměry pak obvykle dosahují délek 3 – 15 μm a šířek 3 – 4 μm . Hustota kvasničných buněk se pohybuje mezi 1070 – 1090 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ [23].

Pro naše měření byly použity kvasinky spodního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* pivovarského kmene 95. Spodní kvašení znamená, že kvasinky po skončení kvašení sedimentují na dno kvasné nádoby.

Kvasinky odebrané v pivovaru z CKT (Cylindro-Kónický Tank) byly po převozu do laboratoře rozmíchány v mladině a 100 – 200 ml této suspenze bylo přelito do 0,5l PET lahví a doplněno destilovanou vodou. Po promíchání byly tyto kvasinky skladovány v klidu při 1 °C. Před měřením jsme láhev s kvasinkami protřepali a odebrali potřebný objem suspenze, který jsme nechali při pokojové teplotě ohřát. Dále jsme tuto suspenzi naředili na požadovanou koncentraci a napipetovali 8 ml do měřících zkumavek. Nakonec jsme přidali 100 μl EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) o koncentraci 0,5 M, abychom zamezili, pro naše měření nežádoucí, flokulaci kvasinek a řádně promísili pomalým překlápěním stojanu se zkumavkami.

Kapitola 4

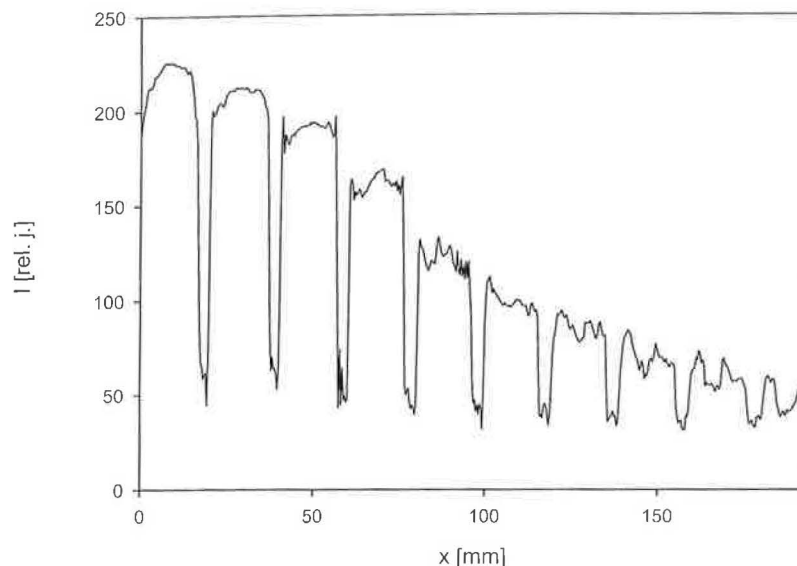
Výsledky měření a diskuze

4.1 Závislost mezi koncentrací a intenzitou rozptylu částic

K zjištění závislosti mezi definovaným zákalem formazinu a měřenou intenzitou v reflexi, jsme v programu ImageJ provedli intenzitní horizontální profil (obrázek 4.1) deseti zkumavkami obsahujícími formazin o různých stupních zákalu při pokojové teplotě 25 °C. Z takto získaných dat jsme v oblastech odpovídajících zkumavce o daném zákalu provedli aritmetický průměr intenzit. Tyto hodnoty jsou se standardní odchylkou aritmetického průměru vyneseny do grafu na obrázku 4.2. Z něho lze na lineární závislost usuzovat přibližně do 100 EBC, a proto je zde závislost pro tyto hodnoty fitována funkcí $y = a \cdot x + y_0$. Pro vyšší stupně zákalu již není tato závislost lineární. Pro popis celé závislosti, jsou hodnoty fitovány tří-parametrickou logaritmickou funkcí $y = a \cdot \ln(x - x_0) + y_0$, která ji dobře charakterizuje. Regresní koeficienty a korelační koeficient získané fitováním v programu SigmaPlot jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1: Výsledky fitů závislosti z obrázku 4.2.

rozsah zákalu [EBC]	0 – 100	0 – 800
funkce	$y = a \cdot x + y_0$	$y = a \cdot \ln(x - x_0) + y_0$
a [rel. j.]	$0,98 \pm 0,10$	$37,5 \pm 3,9$
x_0 [EBC]	$5,2 \pm 3,9$	—
y_0 [rel. j.]	$67,4 \pm 4,6$	$-21,5 \pm 21,4$
R^2	0,963	0,985

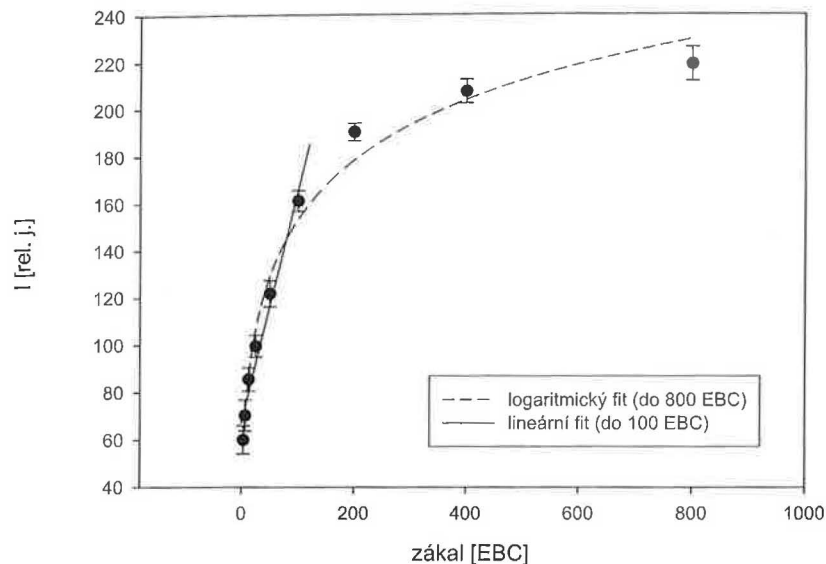


Obrázek 4.1: Intenzitní horizontální profil deseti zkumavkami formazinu o různém stupni zákalu.

4.2 Měření rychlosti sedimentace separonu

Snímkování jsme prováděli v pětiminutových intervalech při pokojové teplotě 25 °C.

Pro zpracování pořizovaných snímků sedimentace separonu jsme použili software pro automatické určování rozhraní. V tomto programu nejdříve uživatel zadá polohy x-ové a y-ové osy tím, že po načtení prvního snímku označí dno první a horní hranu poslední měřené zkumavky. Poté je požádán, aby určil dna jednotlivých zkumavek a zadal jejich výšku. Tímto již program ví, kde v obrázku se nacházejí jednotlivé zkumavky, je překalibrován z jednotek pixel na mm a je tedy připraven k samotnému vyhodnocování výšky sedimentujícího rozhraní. Dále již uživatel ručně pomocí myši zadává polohu jednotlivých rozhraní na snímku. Program sám rozezná k jaké zkumavce daná poloha rozhraní přísluší a hodnotu zapíše do tabulky. Takto si uživatel v programu postupně načítá po sobě jdoucí snímky a zadává polohy rozhraní v jednotlivých časech. Po načtení všech obrázků jsou získaná data vyexportována do tabulky v Excelu.

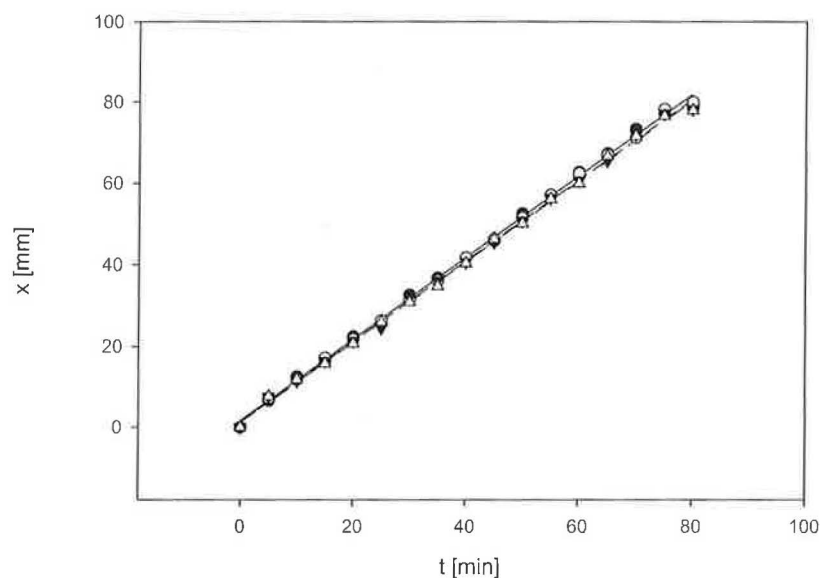


Obrázek 4.2: Závislost intenzity světla v reflexi na zákalu formazinu v jednotkách EBC. Závislost je fitována funkcí $y = a \cdot x + y_0$ pro hodnoty 0 – 100 EBC a funkcí $y = a \cdot \ln(x - x_0) + y_0$ pro hodnoty 0 – 800 EBC.

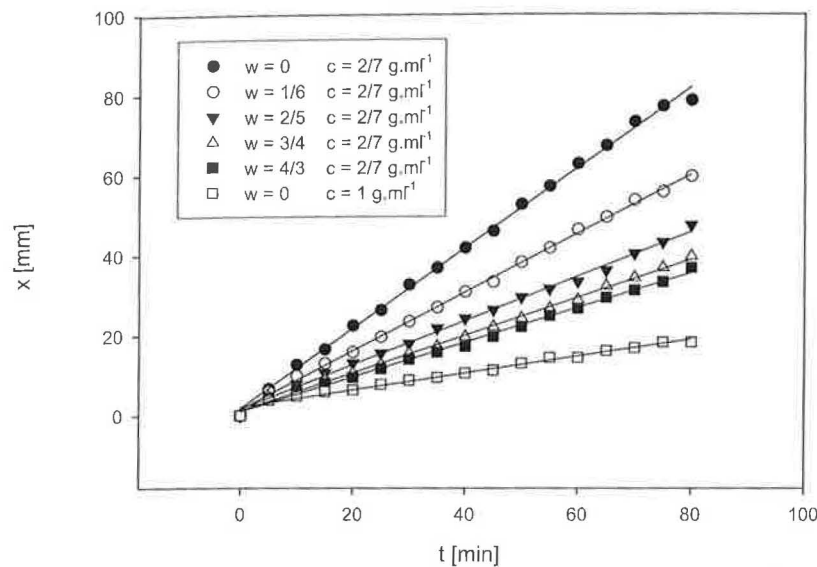
Při měření jsme zjistili, že čočka použitá v kameře vykazuje tzv. poduškové zkreslení [9]. To znamená, že zvětšení na okraji zorného pole je větší než uprostřed. To by mohlo mít vliv na přesnost měření, ale po přesnějším proměření jsme došli k závěru, že v místech umístění měřených vzorků, tedy u středu zorného pole, je tento jev nepodstatný. V případě potřeby využití celého zorného pole by bylo možné toto zkreslení korigovat softwarově.

Výsledná data pro čtyři shodné suspenze separonu jsou vynesena do grafu na obrázku 4.3, kde jsou fitovány lineární závislostí $y = a \cdot x + y_0$. Z obrázku je patrné, že si hodnoty vzájemně dobře odpovídají. To dokazuje i skutečnost, že výsledná chyba určení směrnic a lineární závislosti, které mají význam rychlosti sedimentace v jednotkách $\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$, je 1% a korelační koeficienty neklesají pod $R^2 = 0,998$. Chyba je vypočtena z odchylky aritmetického průměru všech čtyřech směrnic a chyb lineární regrese jednotlivých závislostí. Z grafu na obrázku 4.4, kde jsou hodnoty taktéž fitovány lineární závislostí $y = a \cdot x + y_0$ vidíme, že rychlost sedimentace je

nepřímo úměrná hustotě disperzního prostředí. Z rychlosti poklesu rozhraní posledního vzorku, jenž je vyneseno taktéž do grafu na obrázku 4.4, je vidět, že vzorek s vyšší koncentrací částic sedimentuje pomaleji než vzorek s koncentrací nižší. To ukazuje na to, že se částice vzájemně odpuzují a tím sedimentaci zpomalují. Z výsledků lineární regrese vyplývá, že naměřené hodnoty poklesu sedimentačního rozhraní v čase odpovídají velmi dobře teoretické lineární závislosti, jelikož korelační koeficient v žádném z případů neklesl pod $R^2 = 0,983$. Z hodnoty a získané lineární regrese je pak možné zpětně dopočítat velikost sedimentujících částic ze vztahu 2.8 v přiblížení kulové částice. V tomto případě však zpětné ověření velikosti částic pozbývá významu, jelikož částice separonu ve vodě postupně "bobtnají" a zvětšují tím svůj objem. Tento nárůst objemu nemá vliv na průběh sedimentace, protože ta je poměrně rychlá, avšak náš vzorek byl připraven již den předem a během této doby se velikost částic mohla změnit.



Obrázek 4.3: Časová závislost sedimentace čtyř shodných měření separonu o velikosti částic $10\ \mu\text{m}$ v destilované vodě ($w=0$) a koncentraci částic $c = 2/7\ \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Závislosti jsou fitovány funkcí $y = a \cdot x + y_0$



Obrázek 4.4: Časová závislost sedimentace separonu o velikosti částic $10 \mu\text{m}$ pro různé objemové zlomky w 96% lihu a různé koncentrace částic c . Závislosti jsou fitovány funkcí $y = a \cdot x + y_0$.

4.3 Měření rozměrové distribuce sedimentujících kvasinek

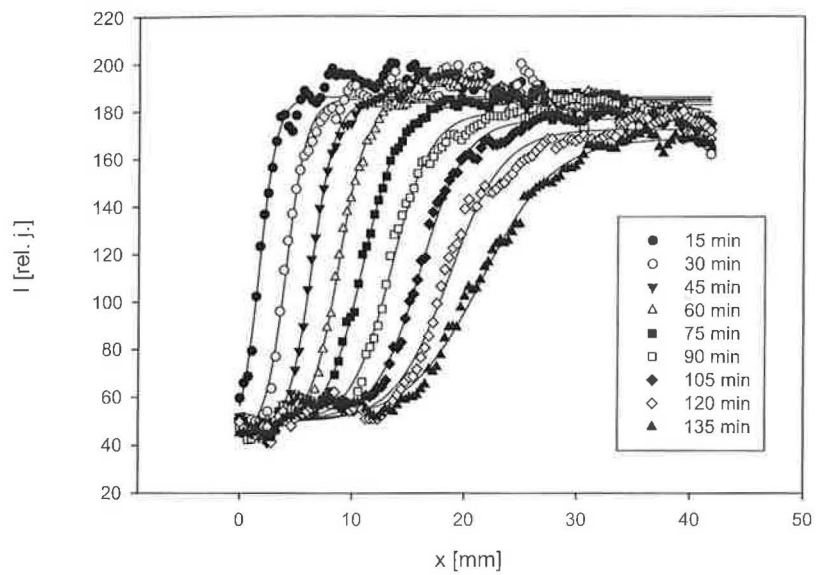
Při měření sedimentace kvasničných buněk jsme se rozhodli z intenzitního průběhu sedimentačního rozhraní měnícího se v čase, naměřit nejen rychlost sedimentace s dostatečnou přesností, ale zároveň zjistit i velikost sedimentujících kvasinek a jejich přibližnou rozměrovou distribuci.

Pro sedimentaci kvasinek jsme po předchozích orientačních měřeních vyhodnotili snímkování po 15 min jako optimální. Teplota během měření byla stabilně 25°C . Zákal suspenze změřený na zákaloměru (UZLP), byl 94 EBC, což ještě zaručovalo lineární závislost mezi koncentrací a intenzitou naměřeného záření (viz oddíl 4.1).

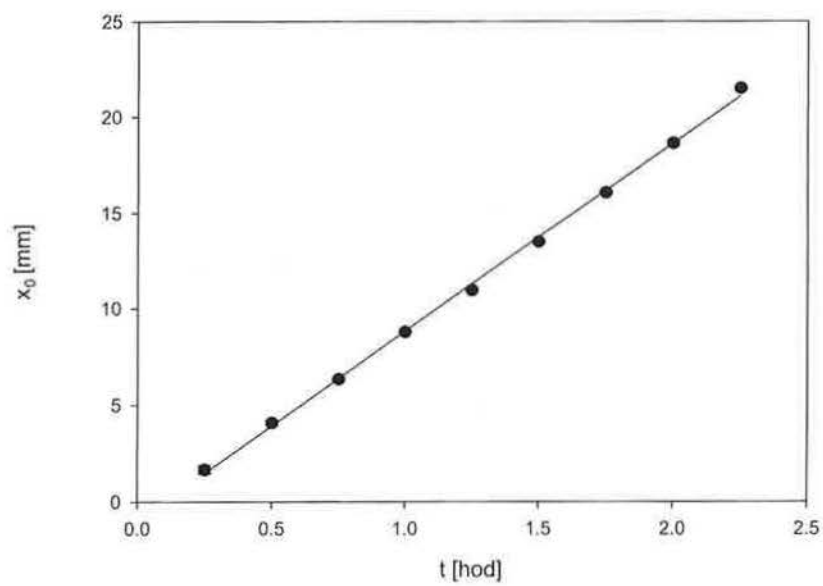
Pro vyhodnocování naměřených snímků jsme nejprve použili zdokonalené verze software pro automatické určování rozhraní, který dokáže automaticky načíst snímky v pořadí, v jakém byly pořízeny programem Web Cam Center a na určených místech poloh zkušavek vypíše

vertikální intenzitní profily zkumavek ve všech měřených časech do souboru typu Excel. Jelikož program vypisuje intenzity složek RGB zvlášť, provedli jsme aritmetický průměr z hodnot pro jednotlivé barvy a získali jsme tak hodnoty 8-bitových intenzit ve škále šedi. Dalším krokem bylo odstranit nerelevantní data a zanechat pouze hodnoty příslušející prostoru od hladiny suspenze po prostor, kde již docházelo k usazování sedimentu na dně zkumavky a tvořilo se tak druhé rozhraní. Nyní se jednotlivé intenzitní profily nafitovaly tří-parametrickou sigmoidální funkcí 2.11, jakožto modelem průběhu rozhraní (viz též obrázky 2.1 a 2.2). Nafitované průběhy v různých časových okamžicích jsou na obrázku 4.5. Oprávněnost použití sigmoidálního modelu rozhraní potvrzuje to, že korelační koeficient se v těchto fitech pohyboval okolo $R^2 = 0,980$. Horší shoda byla v počátečních časech, kdy bylo méně hodnot před strmým růstem křivky pro výpočet fitu. V dolní části obrázku 4.5 si lze všimnout malé neshody dat s proloženou křivkou. To je způsobeno tím, že hladina vzorku pod sebe vrhá mírný stín. Mírný pokles intenzity viditelný v horní části obrázku je způsoben tím, že intenzita světla mírně klesala směrem ke dnu zkumavek. Jinak byla intenzita v místě vzorků poměrně dobře homogenní. To jsme ověřili intenzitním profilem pořízeného snímku bílého papíru. Tyto jevy by šly odstranit jinou konfigurací světelného zdroje. Také by pomohlo umístění celého stojanu se zkumavkami do vodní imerze, čímž by se eliminovaly zbytkové reflexe a dala by se pomocí termostatu zajistit i vyšší míra teplotní variability.

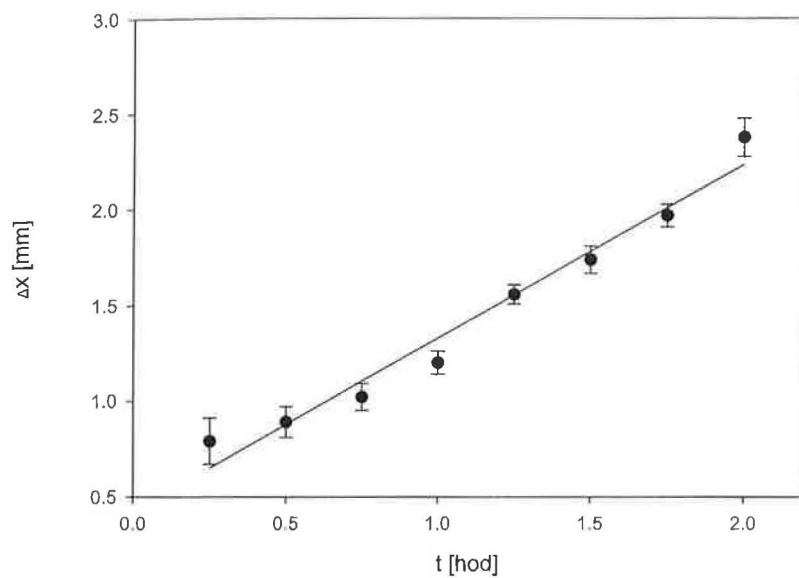
Z výsledků fitu nás nejvíce zajímaly parametry x_0 a Δx . Jestliže vyneseme časovou závislost parametru x_0 (obrázek 4.6), kterou následně nafitujeme lineární závislostí $y = a \cdot x + y_0$ ($R^2 = 0,998$), potom parametr $a = (9,6 \pm 0,2) \text{ mm} \cdot \text{hod}^{-1}$ má význam rychlosti pohybu středu rozhraní. Ze vztahu 2.8 a vztahu pro plochu kruhu $S = \pi r^2$ již jednoduše získáme střední velikost sedimentujících kvasinek $S = (42 \pm 1) \mu\text{m}$. Vynesením časové závislosti parametru Δx a její následné fitace lineární závislostí $y = a \cdot x + y_0$ (obrázek 4.7, $R^2 = 0,970$) dostaneme parametr $a = (0,90 \pm 0,07) \text{ mm} \cdot \text{hod}^{-1}$. Ten má význam rychlosti rozplývání rozhraní a pološířku distribuce velikosti částic $\Delta S = (3,9 \pm 0,3) \mu\text{m}$ z něj dostaneme opět přes vztah 2.8 a vztah pro plochu kruhu. Tvar distribuce je brán jako derivace závislosti 2.11, kde plocha buněk S odpovídá středu distribuce s pološířkou ΔS . Její maximum je dáno intenzitou I_0 , která je v tomto případě přímo úměrná koncentraci sedimentujících částic v celém objemu suspenze. Z obrázku 4.8, kde je distribuce vynesena, je vidět, že výsledné hodnoty odpovídají teoretickým velikostem kvasničných buněk [10].



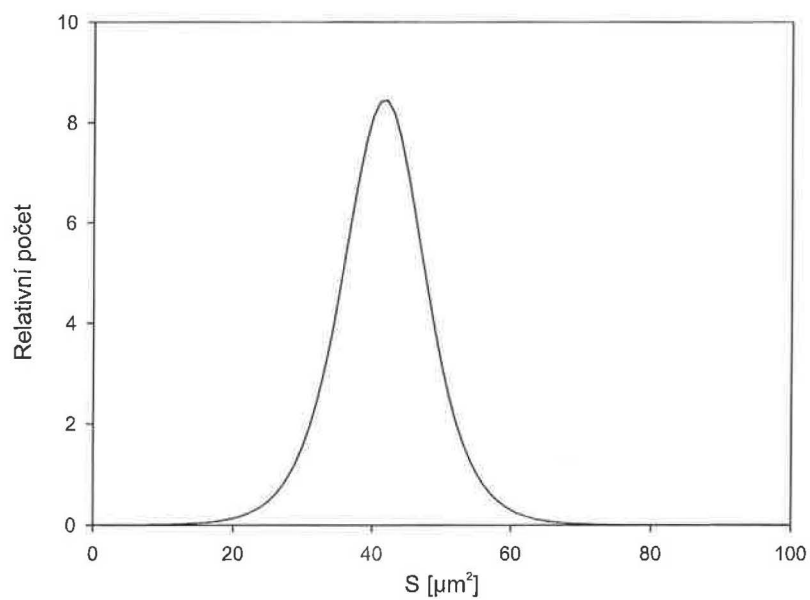
Obrázek 4.5: Závislost intenzity světla v reflexi na vzdálenosti od hladiny vzorku v časových intervalech po 15 min. Intenzita je získána z 8-bitového obrázku ve škále šedi. Závislosti jsou fitovány funkcí 2.11.



Obrázek 4.6: Časová závislost sedimentace kvasinek získaná z 4.3. Závislost je fitována funkcí $y = a \cdot x + y_0$.



Obrázek 4.7: Časová závislost rozplývání rozhraní kvasinek získaná z 4.3. Závislost je fitována funkcí $y = a \cdot x + y_0$.



Obrázek 4.8: Distribuce průřezů kvasničných buněk.

Kapitola 5

Závěr

Vyvinuli jsme a ověřili funkčnost modelu turbidimetrické aparatury pro současné sledování přípravy a měření sedimentace deseti vzorků kvasničných suspenzí na principu zobrazovací fotometrie. Dále jsme vypracovali automatickou metodu zpracování a vyhodnocování sedimentografických dat, naměřených v režimu zpětného rozptylu světla.

Pomocí vyvinuté aparatury a softwaru pro automatickou analýzu naměřených dat jsme použitím modelové suspenze zhodnotili přesnost metody určení polohy sedimentujícího rozhraní a určili oblast lineární závislosti mezi koncentrací sedimentujících částic a intenzitou zpětně rozptýleného záření. Nakonec jsme pomocí navrženého modelu dynamiky průběhu rozhraní suspenze sedimentujících kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* v destilované vodě určili střed a pološířku distribuční funkce jejich velikosti.

Hlavní výhody námi navržené metody jsou v tom, že aparatura je při dnešních cenách běžných CCD detektorů cenově přijatelná. Je velmi variabilní a lze ji tedy využít k automatickému záznamu a vyhodnocení dynamiky různorodých rozhraní. V neposlední řadě umožňuje měření velkého počtu různých vzorků najednou v dostatečné přesnosti, což je její velká přednost.

Literatura

- [1] Analytica-EBC, Method 9.29, *Haze in beer: calibration of haze meters*; Fach Verlag Heinz Carl, Nuernberg, 5th Edition 1997, Update 2004.
- [2] Bendová O., Kahler M.: *Pivovarské kvasinky*, SNTL, Praha, 1981. 12–24
- [3] Gabriel P., Dienstbier M., Sladký P., Černý L.: *Využití dvouúhlového zákaloměru k rozlišení typu některých zákalotvorných částic*, Kvasný Průmysl 40 (7), 1994. 203–207
- [4] Gabriel P., Srkala M., Vyklický V.: *Software pro autoamatické zpracování a vyhodnocování pohybu kapalinových fázových rozhraní v režimu zpětného rozptylu světla*, R+D Report GOPLS KCHFO MFF UK, Praha, 2006.
- [5] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kvasinky>
- [6] <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- [7] http://www.d-a-instruments.com/turbidity_standards.html
- [8] http://www.photometer.com/en/abc/abc_045.htm
- [9] http://www.nikon-foto.cz/old_pages/d_encyklop.htm
- [10] Kodedová M.: *Studium sedimentace a flokulace vybraných kmenů kvasnic metodami komplexní turbidimetrické analýzy*, MFF UK, 2006.
- [11] Klier E.: *Optika*, Universita Karlova, Praha, 1980. 15–20
- [12] Pouchlý J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*, Praha, 2001. 9–15

- [13] Prosser V. (Ed.), a kol.: *Experimentální metody biofyziky*, Academia, Praha, 1989. 319–322
- [14] Rychtera M., Uher J., Páca J.: *Lihovarnictví, droždářství a vinařství*, VŠCHT, Praha, 1991. 91–126
- [15] Sladký P., Císařová H., Hollerová I., Kohoutová P.: *Využití měření zákalu při jednorázové kultivaci mikroorganismů k rychlé mikrobiologické kontrole v pivovarství*, *Kvasný Průmysl* 44 (7-8), 1998. 208–213
- [16] Sladký P., Dienstbier M., Gabriel P., Kodedová M., Srkala M., Vyklický V.: *Sledování sedimentace a flokulace kvasnic jedno kanálovou dvou úhlovou turbidimetrií a vícekanálovými metodami zobrazovací fotometrie*, R+D Report GOPLS KCHFO UK MFF, Praha, 2006.
- [17] Sladký P., Dienstbier M., *Improved procedures for complex monitoring beer colloidal stability by means of dual angle turbidimetric and titration system DATTS*, part 1, *Kvasný Průmysl* 47 (5), 2001. 122–126
- [18] Sladký P., Dienstbier M., *Improved procedures for complex monitoring beer colloidal stability by means of dual angle turbidimetric and titration system DATTS*, part 2, *Kvasný Průmysl* 47 (7-8), 2001. 195–200
- [19] Sladký P., Dienstbier M., *Modular turbidimeter for the practical education in brewing and beverage industry*, part 1, *Kvasný Průmysl* 46 (10), 2000. 280–283
- [20] Sladký P., Dienstbier M., *Modular turbidimeter for the practical education in brewing and beverage industry*, part 2, *Kvasný Průmysl* 46 (11), 2000. 321–324
- [21] Sladký P., Dienstbier M., *Real time two angle rotating bottle beverage laboratory research hazemeter MZN91/92*, Users manual, Published by The Dept. of Chemical Physics and Optics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Prague, 1992.
- [22] Sladký P., Dienstbier M.: *Zařízení pro odměřování kapalin s paralelním upnutím vzorkovnic*, Užitečný vzor No. 17367, Praha, CZ, 2007.
- [23] Šavel J.: *Várečné kvasnice a jejich vlastnosti*, Pivovarský kalendář 2002, VÚSP a.s., 2001. 132–142

- [24] Vraná D. (Ed.), *Kvasinky ve výzkumu a praxi*, Academia, Praha, 1986. 121–126
- [25] Vyklický V., Sladký P.: *LED osvětlovací panel pro zobrazovací fotometrii paralelně upnutých vzorkovnic*, R+D Report GOPLS KCHFO MFF UK, Praha, 2006.
- [26] www.bath.ac.uk/bio-sci/wheals2.gif