

PŘENOS KYSLÍKU V BIOTECHNOLOGII

Při aerobních procesech katalyzovaných buňkami nebo enzymy je nutné zabezpečit dostatečný přívod kyslíku do fermentačního média bioreaktoru. U některých organismů i krátkodobá limitace metabolismu kyslíkem může způsobit nevratné změny v respiračním systému. Každopádně dochází ke snížení rychlosti tvorby produktů (a růstu biomasy v kulturách organismů). Limitace kyslíkem má proto negativní nejen biochemické, ale i ekonomické dopady. Samotný proces aerace zvyšuje ekonomickou náročnost bioproduktu z důvodu zvýšené spotřeby energie, zejména ve větším měřítku. Výsledkem proto musí být průnik takových podmínek dodávky a biochemické spotřeby kyslíku, aby se aplikovala co nejnižší intenzita aerace, ale přitom se vyloučila biochemická limitace kyslíkem. Ukazatel účinnosti systému vzdušnění a míchání (viz k_{LA} níže) je jedním z nejdůležitějších parametrů bioreaktoru v laboratorním i provozním a jeho určení je náplní této úlohy.

Úvod

Limitace metabolismu kyslíkem

Důvody limitace respirace a růstu buněk kyslíkem vyplývají z následujících vztahů. Při aplikaci kinetiky Michaelise a Mentenové platí:

$$Q = Q_m c / (K_m + c) \quad (1)$$

Q	celková (objemová) rychlost spotřeby kyslíku (Q_m je maximální hodnota)
K_m	Michaelisova konstanta pro kyslík (v případě celých buněk jde o zdánlivou hodnotu)
c	koncentrace kyslíku v kapalném médiu.

V uzavřeném systému (bez dodávky kyslíku) lze určit Q z poklesu koncentrace kyslíku v čase (t):

$$Q = - dc/dt \quad (2)$$

Vliv koncentrace kyslíku na metabolismus růstových kultur organismů lze po zanedbání energie udržování vyjádřit:

$$Q = (1/Y_{X/O}) (dX/dt) \quad (3)$$

$Y_{X/O}$	výtěžek biomasy na kyslík
X	koncentrace biomasy
t	čas

Uvedené vztahy demonstrují úzkou souvislost mezi koncentrací kyslíku (a tedy jeho dodávkou) a respirační (příp. růstovou) aktivitou organismů.

Objemový koeficient přestupu kyslíku (k_{LA})

Pro rychlost přestupu kyslíku z plynné do kapalně fáze lze odvodit následující vztah:

$$dc/dt = k_{LA}(c_s - c) \quad (4)$$

- c aktuální koncentrace kyslíku v kapalině
- c_s nasycená (rovnovážná) koncentrace kyslíku v kapalině
- k_{LA} objemový koeficient přestupu kyslíku z plynu do kapaliny

k_{LA} představuje součin koeficientu přestupu kyslíku z fázového rozhraní do kapalně fáze (k_L) a specifického povrchu mezifázového rozhraní (a). Je konstantní pouze pro konstantní fyzikální podmínky aerace. Hodnota k_{LA} je nejen ukazatelem účinnosti aeračního systému bioreaktoru, ale i důležitým parametrem pro přenos podmínek aerace do většího měřítka. Jeho hodnota je proto důležitý ukazatel podmínek aerace v laboratorním i průmyslovém měřítku.

Je-li v aerovaném systému kultura respirujících organismů (příp. suspenze enzymů spotřebovávajících kyslík), rovnice (4) přejde na tvar:

$$dc/dt = k_{LA}(c_s - c) - Q \quad (5)$$

což znamená, že rychlost změny koncentrace kyslíku se rovná rychlosti dodávky kyslíku snížené o rychlost spotřeby kyslíku.

Určení k_{LA}

Z více možností zde uvedeme dva často používané způsoby, jež budou předmětem experimentální práce.

1. Vytěšňovací metoda

Jde o postup určení k_{LA} bez přítomnosti organismů nebo enzymů, takže se projeví pouze konstrukční vlastnosti bioreaktoru. V kapalině bez respirujících organismů se vytěšní kyslík inertním plynem a poté se za definovaných podmínek aerace registruje sycení média kyslíkem. Po integraci rovnice (4) (v hranicích 0 - t, $c_0 - c$) platí:

$$\ln(c_s - c) = \ln(c_s - c_0) - k_{LA} \cdot t \quad (6)$$

Hodnoty c_s za dané teploty a tlaku jsou pro vodu známé. Po vynesení rovnice (6) získáme lineární regresí k_{LA} jako směrnici.

Za přítomnosti organismů lze určit k_{LA} vytěšňovací metodou po úplné inhibici respirace organismu ($Q = 0$ v rovnici (5)).

2. Rovnovážná metoda

Tato metoda má za cíl určení k_{LA} v bioreaktoru za reálných podmínek kultivace nebo produkce, čili za přítomnosti organismů nebo enzymů spotřebovávajících kyslík. Po zjištění rychlosti spotřeby kyslíku v uzavřené nádobě podle vztahu (2) se po otevření nádoby a tím obnovení vzdušné aerace určí k_{LA} z podmínky ustáleného stavu, kdy $dc/dt = 0$. Ustálí se koncentrace kyslíku c' jako výsledek rovnováhy mezi rychlostmi dodávky a spotřeby kyslíku. Z rovnice (5) za ustáleného stavu plyne:

$$k_{LA} = Q/(c_s - c') \quad (7)$$

c' je ustálená koncentrace kyslíku.

Výpočet je tedy jednoduchý, navození ustáleného stavu však může trvat delší dobu. Q lze změřit v krátkém čase v uzavřeném systému, hodnotu c_s lze aproximovat známými hodnotami pro destilovanou vodu.

Pro charakterizaci aerační účinnosti samotného bioreaktoru a její srovnání s dalšími bioreaktory, jakož i pro optimalizaci míchání a vzdušnění, je výhodné určení k_{LA} vytěšňovací metodou. Pro určení k_{LA} v reálných kultivačních nebo produkčních podmínkách může být vhodnější rovnovážná metoda.

Pro vyjádření minimální intenzity aerace zabezpečující kyslíkem nelimitovaný reálný (bio)proces v ustáleném stavu lze rovnici (7) použít pro charakterizaci minimální hodnoty kritického koeficientu k_{LA} :

$$(k_{LA})_{crit} = Q/(c_s - c_{crit}) \quad (8)$$

kde c_{crit} představuje dolní kritickou koncentraci kyslíku za ustáleného stavu, při které ještě nedochází k limitaci kyslíkem. Koncentrace kyslíku v bioreaktoru by se proto měla dlouhodobě udržovat v užším intervalu nad c_{crit} , kdy bude optimalizovaná biochemická i ekonomická náročnost procesu.

Cíl práce

Stanovení objemového koeficientu přestupu kyslíku jako indikátoru účinnosti aerace.

Vybavení

Amperometrický detektor, termostat, magneticky míchaná termostatovaná měřicí nádobka (simulace bioreaktoru) s kyslíkovou elektrodou, použitelná v otevřeném i uzavřeném systému, zdroj dusíku (pro vytěšňovací metodu), kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (jako univerzální příklad aplikace organismů). Ukázka laboratorních bioreaktorů a souvislosti se simulací podmínek v úloze.

Pracovní postup

Kalibrace kyslíkové elektrody

Nulová hodnota koncentrace kyslíku se nastaví pomocí roztoku siřičitanu sodného, nasycená (rovnovážná) koncentrace kyslíku pomocí destilované vody za definované (pracovní) teploty. V měřicí nádobce s kyslíkovou elektrodou se provzdušňuje destilovaná voda, po ustálení záznamu koncentrace kyslíku se nastaví její tabelovaná hodnota (c_s) pro danou teplotu a atmosférický tlak.

Určení k_{LA} vytěšňovací metodou

Destilovaná voda bez jakýkoli organismů nebo enzymů se v bioreaktoru zbaví kyslíku probubláváním dusíkem. Jakmile se koncentrace kyslíku blíží k nule, přeruší se přívod dusíku a za daných podmínek aerace (konstantní teplota, objem a otáčky míchadla) se voda sytí vzdušným kyslíkem. Registrací hodnot koncentrace rozpuštěného kyslíku získáme záznam odpovídající rovnici (4). Při známé hodnotě c_s se určí z rovnice (6) k_{LA} lineární regresí.

Určení k_{LA} rovnovážnou metodou

0,2 g pekařského droždí se rozsuspenduje v 50 ml vytemperované destilované vody a suspenze se přenese do vytemperované měřicí nádobky. V uzavřené nádobce změříme rychlost spotřeby kyslíku (Q) jako směrnici lineárního časového poklesu koncentrace kyslíku podle rovnice (2). Poté nádobku otevřeme a ve stejném objemu kultury jako byl objem vody u vytěšňovací metody vyčkáme ustáleného stavu a odečteme c' . Hodnotu k_{LA} určíme z rovnice (7). Alternativním úkolem je využití hodnoty k_{LA} z vytěšňovací metody a určení teoretické hodnoty ustálené koncentrace kyslíku c' ze vztahu (7).

Závěr

Vypracování protokolu demonstrujícího lineární regresi a určení k_{LA} vytěšňovací metodou a vyhodnocení dat z rovnovážné metody.