

PŘENOS KYSLÍKU V BIOTECHNOLOGII

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

$$Q_{O_2} = Q_{O_2,m} c / (K_m + c) \quad (1)$$

Q_{O_2}	specifická rychlost spotřeby kyslíku ($Q_{O_2,m}$ je maximální hodnota)
K_m	Michaelisova konstanta pro kyslík (v případě celých buněk jde o zdánlivou hodnotu)
c	koncentrace kyslíku v kapalném médiu.

Podle Monodova vztahu pro růst mikroorganismů a kyslík jako substrát platí:

$$\mu = \mu_m c / (K_S + c) \quad (2)$$

μ	specifická růstová rychlost (μ_m je maximální hodnota)
K_S	saturační konstanta pro kyslík

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

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

Protože $dX/dt = \mu X$ a $Q_{O_2} = Q/X$,

$$Q_{O_2} = \mu / Y_{X/O} \quad (4)$$

Q	celková (objemová) rychlost spotřeby kyslíku
$Y_{X/O}$	výtěžek biomasy na kyslík
X	koncentrace biomasy
t	čas

Uvedené vztahy demonstrují úzkou souvislost mezi koncentrací kyslíku 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:

$$dc/dt = k_La(c_s - c) \quad (5)$$

- 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.

Je-li v systému kultura respirujících organismů (příp. suspenze enzymů spotřebovávajících kyslík), rovnice (5) přejde na tvar:

$$dc/dt = k_La(c_s - c) - Q \quad (6)$$

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 (5) (v hranicích 0 - t, $c_0 - c$) platí:

$$\ln(c_s - c) = \ln(c_s - c_0) - k_La \cdot t \quad (7)$$

Hodnoty c_s za dané teploty a tlaku jsou pro vodu známé. Po vynesení rovnice (7) získáme lineární regresí k_La jako směrnici.

Za přítomnosti respirujících organismů lze určit k_La vytěšňovací metodou po inaktivaci organismu ($Q = 0$ v rovnici (6)), což však neodpovídá přirozeným fyziologickým podmínkám.

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 (Q) se k_{La} určí z podmínky ustáleného stavu, kdy $dc/dt = 0$. Ustálí se koncentrace kyslíku jako výsledek rovnováhy mezi rychlostmi dodávky a spotřeby kyslíku. Z rovnice (6) plyne:

$$k_{La} = Q/(c_s - c') \quad (8)$$

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 proces v ustáleném stavu lze rovnici (8) použít pro charakterizaci kritického koeficientu k_{La} :

$$(k_{La})_{crit} = Q/(c_s - c_{crit}) \quad (9)$$

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} .

Cíl práce

Stanovení objemového koeficientu přestupu kyslíku jako indikátoru účinnosti aerace.

Vybavení

Amperometrický detektor, termostat, magneticky míchaná termostatovaná měřicí nádoba (simulace bioreaktoru) s kyslíkovou elektrodou, použitelná v otevřeném i uzavřeném systému, tlaková nádoba s dusíkem, kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

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 objem a otáčky míchadla, teplota 26 °C) se voda sytí vzdušným kyslíkem. Registrací hodnot koncentrace rozpuštěného kyslíku získáme záznam odpovídající rovnici (5). Při známé hodnotě c_s určíme z rovnice (7) 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 měřicí nádoby (teplota 26 °C). V uzavřené nádobce změříme rychlost spotřeby kyslíku (Q) jako směrnici lineárního časového poklesu koncentrace kyslíku. 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 (8).

Závěr

Z naměřených hodnot se porovnají rozdíly koeficientu k_La určeného oběma metodami.