

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 měřítku 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 (rychlost respirace, 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):

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

Souvislost kyslíkem nelimitované rychlosti respirace (Q) a rychlosti růstu (dX/dt) lze zjednodušeně vyjádřit:

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

$Y_{X/O}$	výtěžek biomasy na kyslík (jaké množství biomasy vyroste na dodaný kyslík)
X	koncentrace biomasy
t	čas

Uvedené vztahy demonstrují úzký vztah 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:

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

- 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

Jako model bioreaktoru, pouze pro účely této úlohy, poslouží jeho zjednodušená zmenšená forma. Detekce rozpuštěného kyslíku a reakční nádobka: 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). Dále 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

Reálné podmínky bioprocessu s aerobní biomasou. 0,2 g pekařského droždí se rozsuspěduje v 50 ml vytemperované destilované vody a suspenze se přenesí 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.