

Stanovení objemového koeficientu přenosu kyslíku zahrnující korekci na skutečné kultivační podmínky

Ing. JAN PÁČA, CSC., Vysoká škola chemicko-technologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha

Klíčová slova: kultivace mikroorganismů, přenos kyslíku, objemový koeficient, růst mikroorganismů, vliv kyslíku, vliv prostředí na mikroorganismy

57.083.13 57.044:546.21
683.13:546.21

1. ÚVOD

Při studiu přenosu kyslíku z plynné fáze do kapalného média v průběhu aerobních kultur je nezbytná znalost hodnoty saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku a změn v koncentraci rozpuštěného kyslíku, které jsou měřítkem růstu buněk a tvorby produktů. Tyto parametry jsou zvláště důležité v případech, kdy lze očekávat přechod do podmínek limitace růstu kyslíkem.

V posledních letech se věnuje značná pozornost určení objemového koeficientu přenosu kyslíku. Většinu těchto studií však lze jen obtížně použít v konkrétním biologickém systému, neboť měření se provádí za jiných podmínek. Mezi tyto metody patří širšíčitanová metoda [1–18], nepřímá biologická metoda [19–24], statická metoda [25–30] a výpočetní metoda [31–34].

Pro určení koeficientu K_{La} v průběhu kultivačního procesu lze použít dynamické metody a bilanční metody. Obě tyto metody porovnali Tuffile a Pinho [35] a zjistili, že bilanční metoda je výhodnější pro viskózní nenewtonská média (suspenze). Vyžaduje však současné měření koncentrace kyslíku v plynné a kapalné fázi. Je-li rychlost spotřeby kyslíku nízká je tato metoda nepřesná [36]. Schneider a Frischknecht [37] otestovali metodu stanovení K_{La} bilanční metodou, při které použili skokové změny v plynné fázi.

Dynamická metoda se často používá při kultivacích mikroorganismů, protože umožňuje určit nejen koeficient K_{La} , ale i respirační rychlosti a skutečné hodnoty saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku. Práce zabývající se dynamickou metodou lze rozdělit do dvou skupin. První skupina zahrnuje práce [38–51], kde dynamická metoda byla studována z chemicko-inženýrského hlediska bez uvažování specifických požadavků souvisejících s biologickými procesy. Druhá skupina autorů [52–57] odvodila metody, které lze použít pro přímé měření v průběhu kultivace mikroorganismů.

Tato práce se zabývá odvozením metody využívající integrálního tvaru bilanční rovnice pro kyslík. Metoda umožňuje určení koeficientu K_{La} a rychlosti respirace buněk s korekcí na změny rozpustnosti kyslíku, které nastávají v průběhu kultivace buněk. Druhá část se zabývá využitím této metody při sledování vlivu rychlosti dodávky kyslíku na růst a změny fyziologické aktivity buněk *Klebsiella aerogenes*.

2. TEORIE

2.1 Určení K_{La} z integrované rovnice bilance kyslíku

Obecnou bilanci kyslíku v průběhu kontinuální kultivace buněk v míchaném a větraném fermentoru popisuje rovnice (1)

$$\pm \frac{dC_L}{dt} = K_{La}(C^* - C_L) + D(C_{La} - C_L) - q_{O_2}' - k \frac{dP}{dt} \quad (1)$$

První část pravé strany rovnice (1) popisuje dodávku kyslíku z plynné fáze do fáze kapalné a je ovlivněna intenzitou míchání, rychlostí průtoku plynu a fyzikálně chemickými vlastnostmi kultivačního média. Druhý výraz pravé strany vyjadřuje dodávku kyslíku ve formě rozpuštěného kyslíku obsaženého v přitékajícím živném médiu a rozpuštěný kyslík, který odchází z fermentoru v kapalné fázi (v odtoku). Další výrazy na pravé straně rovnice (1) vyjadřují spotřebu kyslíku buňkami vztaženou na jednotkový objem a spotřebu kyslíku na tvorbu produktů.

Pro řešení rovnice (1) byly zavedeny tyto předpoklady:

1. Dodávku kyslíku v přítoku živného média lze zanedbat.
2. $q_{O_2}' = \text{konst.}$ a $K_{La} = \text{konst.}$ v ustálených stavech kontinuální kultivace a v průběhu krátké doby měření v jednorázové kultivaci.
3. Spotřeba kyslíku nutného na tvorbu produktů je zahrnuta v požadavku buněk na kyslík, protože většinou nelze stanovit všechny metabolické produkty.

Na základě těchto předpokladů lze rovnici (1) přepsat do tvaru

$$\pm \frac{dC_L}{dt} = K_{La}(C^* - C_L) - q_{O_2}' - DC_L \quad (2)$$

Rovnice (2) byla použita pro stanovení C^* , q_{O_2}' a K_{La} .

Integrovaný tvar bilanční rovnice pro kyslík byl již několika autory použit v případě statické metody [29, 58]. Také při aplikaci dynamické metody bylo již použito integrovaného tvaru bilanční rovnice pro vyhodnocení výsledků [55].

Integrální metoda je odvozena z rovnice (2). Ze sklonu přímkové části závislosti $C_L = f(t)$ mezi body $\{t_1; C_{L1}\}$ a $\{t_2; C_{L2}\}$ lze určit hodnotu celkové rychlosti respirace buněk q_{O_2}' (obr. 1).

$$\frac{dC_L}{dt} = q_{O_2}' = \frac{C_{L1} - C_{L2}}{t_1 - t_2} \quad (3)$$

Hnací silou absorpce kyslíku je koncentrační spád, který v průběhu času klesá (druhá, vzestupná část křivky v obr. 1). V průběhu tohoto procesu, který reprezentuje část křivky mezi body $\{t_3; C_{L3}\}$ a $\{t_4; C_{L4}\}$ v obr. 1, platí na levé straně rovnice (2) kladné znaménko. Pro integraci rovnice (2) je nezbytné zavést předpoklad, že v průběhu přerušování a opětovného zahájení aerace jsou hodnoty C^* , q_{O_2}' a K_{La} konstantní. V ustáleném stavu

kontinuální kultivace je i zředovací rychlost konstantní. Na základě těchto předpokladů lze pak rovnici (2) převést do tvaru

$$\frac{1}{K_L a + D} \int_{C_{L3}}^{C_{L4}} \frac{dC_L}{[(C^* - q'_{O_2}/K_L a)(1 + D/K_L a)] - C_L} = \int_{t_3}^{t_4} dt \quad (4)$$

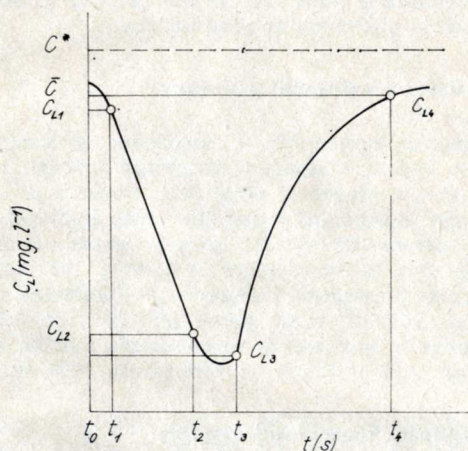
Po integraci rov. (4) dostaneme

$$\frac{1}{K_L a + D} \ln \frac{[(C^* - q'_{O_2}/K_L a)(1 + D/K_L a)] - C_{L3}}{[(C^* - q'_{O_2}/K_L a)(1 + D/K_L a)] - C_{L4}} = t_4 - t_3 \quad (5)$$

V ustáleném stavu kontinuální kultivace, kde

$$\begin{aligned} \frac{dC_L}{dt} &= 0 \\ \text{výraz} \\ \frac{C^* - q'_{O_2}/K_L a}{1 + D/K_L a} &= \bar{C} \end{aligned} \quad (6)$$

odpovídá skutečné hodnotě koncentrace rozpuštěného kyslíku v čase měření. Tento výraz (6) vyjadřuje podmínku rovnováhy mezi dodávkou kyslíku a jeho spotřebou buňkami a odváděním v odtoku suspenze buněk z fermentoru.



Obr. 1

Výraz $q'_{O_2}/K_L a$ je funkcí koncentrace biomasy, fyziologického stavu buněk (vyjádřeného rychlostí respirace), intenzitou míchání a velikostí aerace. Proto lze považovat tento výraz za parametr charakterizující vliv dodávky kyslíku na fyziologický stav buněčné populace.

Dosažením rov. (6) do rov. (5) a úpravou dostaneme rovnici (7).

$$K_L a = \left[\frac{1}{t_4 - t_3} \ln \frac{\bar{C} - C_{L3}}{\bar{C} - C_{L4}} \right] - D$$

Rovnici (6) lze použít pro určení skutečné hodnoty saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku za podmínek měření. Dosažením hodnoty q'_{O_2} získané z rovnice (3) a $K_L a$ určeného z rovnice (7) spolu s prvním odhadem hodnoty C^* do rovnice (6) dostáváme korigovanou hodnotu C , tj. $(C)'$.

Jestliže $(C)' = C$, pak první odhad saturační koncentrace C^* odpovídá skutečné hodnotě C_a^* v době měření. Uvedené rovnosti může být teoreticky dosaženo při kultivaci mikroorganismů, kdy do média nejsou vylučovány žádné metabolické produkty, živiny jsou z živného média vyčerpány velmi málo (tzn.

při vysoké zředovací rychlosti) a zdroj uhlíku a energie přítomný v médiu je buňkami využíván pouze k tvorbě biomasy, CO_2 a H_2O (např. u striktně aerobních mikroorganismů nebo na počátku jednorázové kultivace).

V průběhu skutečných kultivací není $(C)'$ rovno C v důsledku vyčerpání živin a hromadění produktů metabolismu v médiu. Z toho důvodu je hodnota $(C)'$ získaná dosazením C^* , q'_{O_2} a $K_L a$ do rovnice (8)

$$(\bar{C})' = \frac{C^* - q'_{O_2}/K_L a}{1 + D/K_L a} \quad (8)$$

vyšší než naměřená koncentrace rozpuštěného kyslíku C . Z toho plyne, že skutečná hodnota C_a^* je nižší než C^* o hodnotu popsanou vztahem (9)

$$\Delta \bar{C} = (\bar{C})' - \bar{C} \quad (9)$$

Skutečnou hodnotu saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku lze určit ze vztahu

$$C_a^* = C^* - \Delta \bar{C} \quad (10)$$

Skutečná hodnota koncentrace rozpuštěného kyslíku může být pak určena pomocí C_a^* . Tato korigovaná hodnota C_a^* se dosadí opět do rovnice (7) a tím se určí koeficient $(K_L a)'$ korigovaný na skutečné experimentální podmínky.

V případech, kdy výraz $D C_L$ je roven nule (jednorázové kultivace) nebo je velmi malý ve srovnání s hodnotami výrazů $K_L a (C^* - C_L)$ a q'_{O_2} (v kontinuálních kultivacích) lze rovnici (2) zjednodušit do tvaru

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L) - q'_{O_2} \quad (11)$$

Za těchto podmínek lze rovnici (6) zjednodušit na tvar

$$C^* - \frac{q'_{O_2}}{K_L a} = \bar{C} \quad (12)$$

Podobně rovnici (8) se zjednoduší a výraz D v rovnici (7) lze zanedbat. Další postup určení C_c^* zůstává stejný.

2.2 Modifikace metody určení koeficientu $K_L a$ za podmínek limitace kyslíkem

Za podmínek limitace růstu buněk kyslíkem je koncentrace rozpuštěného kyslíku v kultivačním médiu velmi malá nebo rovna nule. Proto v tomto případě nelze běžnou dynamickou metodu použít. Odvozená modifikace dynamické metody však umožňuje měření hodnoty $K_L a$ i za těchto podmínek. Postup provádění vyplývá z obr. 2.

Nejprve je nutno určit rychlost spotřeby kyslíku buňkami (obr. 2a). V čase t_0 se zvýší frekvence otáčení míchadla a velikost aerace. V čase t_1 se zastaví aerace a současně se sníží frekvence otáčení míchadla na původní hodnotu (jako při $t < t_0$). Celková rychlost spotřeby kyslíku buňkami se pak určí ze sklonu regresní přímky proložené mezi body t_1 a t_2 . Frekvence otáčení míchadla a velikost aerace se poté opět zvýší a v čase t_3 se oba parametry nastaví na původní hodnoty. Průběh hnací síly přenosu kyslíku má charakter uvedený v obr. 2b. Za těchto podmínek přechází rovnice (7) do tvaru

$$K_L a = \frac{1}{t_4 - t_3} \ln \frac{C_{L3} - \bar{C}}{C_{L4} - \bar{C}} \quad (13)$$

Pro určení hodnoty C_a^* se kromě rovnice (13) použije

rovnice (12) a postupu uvedeného v předchozí kapitole 2.1.

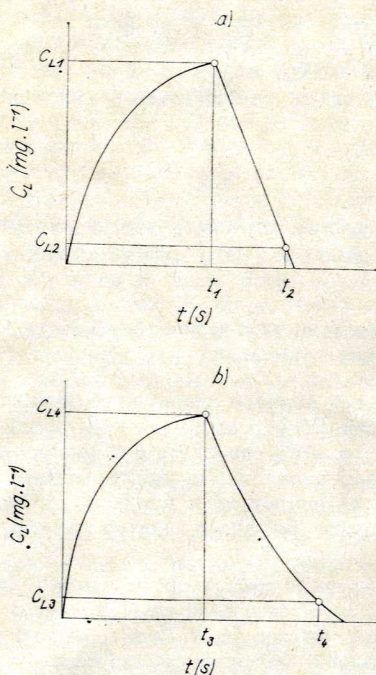
Za podmínek limitace růstu buněk kyslíkem lze rovnici (12) psát ve tvaru

$$\bar{C} = (C^* - \frac{q'_{O_2}}{K_L a}) \rightarrow 0 \quad (14)$$

$$\bar{C} = (C^* - \frac{q'_{O_2}}{K_L a}) = 0 \quad (15)$$

Rozlišení, které vzrůstá z podmínek definovaných rovnicemi (14) a (15) v průběhu reálné kultivace, není snadné a závisí na vlastnostech použité elektrody. Výsledky získané měřením redox-potenciálu ukázaly [59], že tense kyslíku v kultivačním médiu aerobních bakterií je přibližně 1 Pa a v kultivačním médiu fakultativně anaerobních mikroorganismů kolem 10^{-4} Pa. Naopak, Harrison [60] a Linton *et al.* [61] naměřili nulové hodnoty koncentrace rozpuštěného kyslíku kyslíkovou elektrodou, přestože aerace nebyla zcela zastavena. Za podmínek popsaných rovnicí (14) lze hodnotu $K_L a$ určit z rovnice (13). S ohledem na uvedené obtíže související se stanovením hodnoty C je nutné pro určení koeficientu $K_L a$ použít rovnici (16), i když tato rovnice striktně platí pouze za podmínek popsaných rovnicí (15).

$$K_L a = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \frac{C_{L3}}{C_{L4}} \quad (16)$$



Obr. 2

Porovnáním výsledků získaných z rovnic (16) a (13) bylo zjištěno, že jelikož $C_{L3} \gg C$ a $C_{L4} \gg C$ lze skutečnou rovnovážnou koncentraci C zanedbat. Chyba vzniklá zanedbáním hodnoty C je menší než 0,5 %.

Za podmínek $C_L \sim 0$ je nutno skutečnou hodnotu saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku určit z rovnice (15), ze které však vyplývá, že $C_a^* = [C]$. Na základě srovnání korigované hodnoty $[K_L a]'$ s hodnotou $K_L a$ za podmínek limitace kyslíkem bylo zjištěno, že korekci

není třeba provádět v důsledku velmi malého rozdílu mezi oběma hodnotami.

3. METODIKA POKUSŮ

3.1 Mikroorganismus

Pro experimenty bylo použito mikroorganismu *Klebsiella aerogenes* CCM 2318 z Čs. sbírky mikroorganismů v Brně.

3.2 Kultivační média

Kultivace byly prováděny na modifikovaném syntetickém médiu podle Holmeho a Lindholma [62] obsahujícím v 1000 ml 15,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 5 g NH_4Cl , 0,22 g Na_2SO_4 , 1 ml 20 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,5 ml roztoku stopových prvků. Roztok stopových prvků obsahoval: 0,18 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,04 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 16,70 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,18 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,16 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,15 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ v 1000 ml. Při všech experimentech bylo použito jako zdroje uhlíku a energie k růstu glukosy o koncentraci 4 g/l. Inokulační médium obsahovalo dvojnásobné množství fosfátů pro zvýšení pufrovací kapacity. Všechny použité roztoky pro média včetně glukosy byly sterilovány odděleně 30 min při 120 °C, ochlazeny a do média přidávány až před kultivací.

3.3 Zařízení a kultivační podmínky

Geometrie fermentoru a míchacího zařízení včetně způsobu regulace aerace a frekvence otáčení míchadel je popsána v předchozí práci [63]. Hodnota pH 7,0 byla udržována konstantní v průběhu všech kultivací pomocí pH regulátoru (ČSAV-MBÚ, Praha). Úprava pH byla prováděna 25% NaOH. Teplota 30 °C byla též udržována konstantní regulačním zařízením [64]. Zařízení bylo sterilováno „in situ“ sytou párou při 120 °C po dobu 2 h, pH elektrody pro měření rozpuštěného kyslíku byly sterilovány před vložením do fermentoru 70% ethanolom.

3.4 Stanovení koncentrace biomasy

Sušina biomasy byla zjišťována měřením optické density na spektrálním kolorimetru Spekol (Zeiss, Jena) při 445 nm. Kromě toho bylo prováděno i kontrolní gravimetrické stanovení. Vzorky byly odstředěny a po dvojnásobném promytí sušeny 1 h při 70 °C a 2 h při 105 °C.

3.5 Určení saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku

Koncentrace rozpuštěného kyslíku byla měřena analyzátozem Oxytest MU-66 (VD ČSAV Praha) pomocí Ag-Ag/AgCl elektrody kryté polypropylenovou membránou tloušťky 12 μm . Pro zajištění dostatečné přesnosti měření byl též ověřen vliv dynamických účinků kapaliny na údaj elektrody. Toto ověření bylo prováděno v systému voda—vzduch i živné médium—vzduch. Frekvence otáčení míchadel v rozsahu 200–1000 min^{-1} působilo 6% odchylku v hodnotě měření saturační koncentrace kyslíku. Odchylku čtení v rozsahu aerace 0,01–1,5 VVM za konstantní frekvence otáčení míchadel byla 2 %. Zjištěné odchylky jsou již značně velké a nelze je proto zanedbat, zvláště za podmínek nízké dodávky kyslíku. Proto byla elektroda kalibrována pro každou použitou frekvenci otáčení míchadel a velikost aerace. Touto kalibrací byl eliminován vliv dynamických sil kapaliny od míchadla na přenos kyslíku membránou elektrody.

Saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku byla ur-

čena z celkového tlaku nad hladinou ve fermentoru z rovnice

$$P_{O_2} = 0,21(P_b + \frac{P}{\rho_0} \cdot \Delta H_f) \quad (17)$$

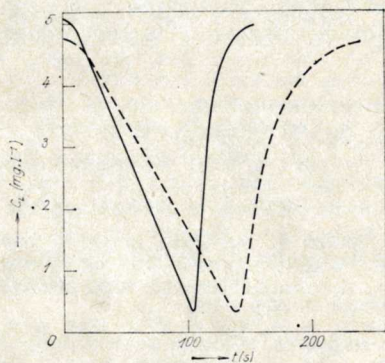
$$C_{H_2O}^* = \frac{P_{O_2}/H}{1 - (P_{O_2}/H)} \cdot \frac{M_{O_2}}{M_{H_2O}} \cdot \varphi_1 \cdot 10^{-3} \quad (18)$$

Nižší rozpustnost kyslíku v živném médiu v důsledku přítomnosti rozpuštěných solí a cukru ve srovnání s rozpustností v destilované vodě činila 2 %, což bylo zjištěno experimentálně.

Ke snímání odezvy elektrody při dynamických měřeních bylo použito zapisovače TZ 21 (Laboratorní přístroje, Praha).

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Kultivace byly prováděny při dvou výrazně odlišných zředovacích rychlostech 0,96 h⁻¹ a 0,178 h⁻¹ a při odlišných rychlostech dodávky kyslíku, aby bylo možné odvozenou metodu pro určení koeficientu K_{La} , skutečné hodnoty saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku a respirační rychlosti buněk dostatečně experimentálně ověřit.



Obr. 3

Obrázek 3 ukazuje časové průběhy koncentrace rozpuštěného kyslíku v kultivačním médiu při konstantní frekvenci otáčení míchadel a konstantní rychlosti aerace při různých zředovacích rychlostech.

Hodnota q_{O_2} byla určena z rovnice (3). Za podmínek intenzivního míchání a aerace (800 min⁻¹, 1 VVM) výraz (-DC_L) lze zanechat a výsledky byly proto určeny z rovnice (11). Výrazný rozdíl v hodnotách K_{La} zjištěných při stejné frekvenci otáčení míchadel a velikosti aerace, avšak výrazně odlišných zředovacích rychlostech souvisí se změnami fyziologického stavu buněk [65] (mimo jiné i q_{O_2}) a fyzikálně chemických vlastnostech kultivačního média [66]. Postup výpočtu odvozený v teoretické části lze použít pouze za podmínek ideálního míchání ve fermentoru. Za všech podmínek použitých pro ověřování této metody podmínky prakticky ideálního míchání bylo dosaženo (ověřeno konduktometricky metodou vzduchu a odezvy v systému voda-vzduch). Odvozená metoda stanovení K_{La} byla ověřena porovnáním s postupem publikovaným Bandyopadhyayem et al. [54]. Výsledky porovnání jsou uvedeny v tabulce 1. Je zřejmé, že obě metody dávají podobné výsledky. Maximální odchylka (ΔK_{La}) mezi oběma metodami byla v rozsahu ± 4 %.

Porovnání hodnot saturačních koncentrací rozpuštěného kyslíku získaných zde odvozenou metodou a metodou podle Bandyopadhyaye et al. [54] je uvedeno v tabulce 2.

Souhlas výsledků je zřejmý. Maximální odchylka (ΔC_a^*) činila ± 2 %.

Tabulka 1. Porovnání hodnot K_{La} určených z integrovaného tvaru bilance kyslíku a metodou podle Bandyopadhyaye et al. [54] v ustálených stavech chemostatu.

n (min ⁻¹)	V_g (VVM)	D (h ⁻¹)	x (g.l ⁻¹)	$(K_{La})_B$ (h ⁻¹)	ΔK_{La} (%)	K_{La} (h ⁻¹)
600	0,1	0,96	0,73	86,7	-0,70	86,1
600	0,3	0,96	0,83	94,3	+3,40	97,6
800	1,0	0,96	1,07	394,7	-3,76	366,9
800	1,0	0,178	2,80	158,2	+3,88	164,6

Tabulka 2. Porovnání skutečné saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku určené z integrované rovnice bilance kyslíku a metodou podle Bandyopadhyaye et al. [54] v ustálených stavech chemostatu.

D (h ⁻¹)	x (g.l ⁻¹)	C (mg.l ⁻¹)	C^* (mg.l ⁻¹)	C_a^* (mg.l ⁻¹)	C_{aB}^* (mg.l ⁻¹)	ΔC_a^* (%)
0,96	0,73	2,59	7,45	5,23	5,13	+1,91
0,96	0,83	2,58	7,35	6,04	6,11	-1,15
0,96	1,07	3,56	7,46	5,28	5,25	-0,56
0,178	2,80	3,31	7,38	5,13	5,21	-1,50

Hodnota K_{La} je ovlivněna volbou mezních bodů, jejichž hodnoty se dosazují do rovnice (7) a (16) a délkou doby expozice buněk na změnu koncentrace rozpuštěného kyslíku, která ovlivňuje fyziologický stav buněk.

Vliv volby mezních bodů na hodnotu K_{La} byl testován u všech stanovení. Bylo zjištěno, že hodnota K_{La} je více citlivá na volbu horní meze (3–5 %) než v případě dolní meze (1,5–3 %). Hodnotu C_{La} pro určení správné hodnoty K_{La} je třeba volit v rozsahu 0,97 až 0,99 C . Chyba stanovení je pak v rozsahu 0,02 až 0,08 K_{La} . Přesnost stanovení závisí na absolutních hodnotách K_{La} a q_{O_2} . Čím vyšší je hodnota K_{La} , tím nižší hodnotu dolního mezního bodu je třeba volit. Opak platí pro volbu horního mezního bodu. Výsledky prokázaly platnost uvedené postupu jak pro měření za podmínek přebytku kyslíku, tak i za podmínek kultivace v kyslíkovém limitu.

Při použití této metody nelze postihnout změny hodnoty K_{La} v průběhu dynamického měření, neboť tato metoda vede k vyhlazení experimentálních dat. Proto se získají průměrné hodnoty K_{La} . Zjištění, zda K_{La} je funkcí koncentračního spádu ($C^* - C_L$) v průběhu vlastního dynamického měření má pouze teoretický význam z hlediska přenosu hmoty.

Skutečnou hodnotu K_{La} v průběhu kultivačního procesu lze určit buď dynamickou nebo bilanční metodou. Žádná metoda však nedává absolutně přesné výsledky. Velikost chyby nelze exaktně určit, neboť není známo do jaké míry je rozdíl hodnoty K_{La} změřený v destilované vodě a kultivačním médiu ovlivněn změnami fyzikálně chemických vlastností kapalně fáze [67], selektivní schopností membrány, která ovlivňuje odezvu elektrody a rychlostí skokové změny aerace [41]. Výsledky ukázaly, že metoda stanovení průměrné hodnoty K_{La} je dostatečně přesná pro aplikaci v průběhu kultivace mikroorganismů.

Některé studie [38–40, 43] byly zaměřeny na posouzení vlivu rychlosti odezvy kyslíkové elektrody na přesnost stanovení K_{La} . Tyto experimenty však byly konány pouze v systému voda–vzduch a živné médium–vzduch. Proto autoři nebyli nuceni řešit problémy související s kultivací mikroorganismů (např. otázka sterility). Metoda zde odvozená nezahrnuje korekci na rychlost odezvy, naopak však zahrnuje korekci na změny skutečné saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku. Otevřenou otázkou zůstává, která korekce je při skutečných kultivacích významější. Vzhledem k tomu je dále stručně proveden rozbor faktorů ovlivňujících přesnost stanovení hodnoty K_{La} .

Rozdíly v rychlosti odezvy elektrody zjištěné v systému voda–vzduch a živné médium–vzduch jsou ovlivněny:

1. čistotou KCl (elektrolyt),
2. tloušťkou elektrolytu mezi katodou a krycí membránou,
3. kvalitou materiálu membrány.

Tyto faktory ovlivňují rychlost odezvy v důsledku transportu přes krycí membránu a vrstvou elektrolytu ke katodě. Další podrobnosti jsou diskutovány v předchozí práci [66].

Metoda stanovení K_{La} popsaná v této zprávě má ve srovnání s postupem odvozeným *Bandyopadhyayem et al.* [54] výhodu, že není třeba určovat hodnotu dC_L/dt . Na rozdíl od metody popsané *Fujiou et al.* [55] tato metoda využívá numerické iterace, která umožňuje korekci na skutečnou saturační koncentraci rozpuštěného kyslíku. Navíc byl odvozen a ověřen postup umožňující aplikaci dynamické metody i za podmínek limitace růstu buněk kyslíkem.

Použité symboly

C^*	saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku v kultivačním médiu před inokulací (mg/l)
C_a^*	skutečná saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku v kultivačním médiu v čase měření (mg/l)
C_{aB}	hodnota C_a^* vypočtená podle <i>Bandyopadhyaye et al.</i> [54]
ΔC_a^*	rozdíl mezi C_a^* a C_{aB} (%)
C_L	koncentrace rozpuštěného kyslíku v kultivačním médiu (mg/l)
C_{LR}	koncentrace rozpuštěného kyslíku v přítoku média (mg/l)
C	měřená koncentrace rozpuštěného kyslíku při startu dynamického testu (mg/l)
$[C]'$	skutečná koncentrace rozpuštěného kyslíku při startu dynamického testu (mg/l)
ΔC	hodnota definovaná rovnicí (9)
D	zředovací rychlost (h^{-1})
H	Henryho konstanta (Pa)
ΔH_f	tlak nad hladinou ve fermentoru (Pa)
k	rychlostní konstanta v rovnici (1)
K_{La}	objemový koeficient přenosu kyslíku (h^{-1})
K_{LaB}	hodnota K_{La} určená metodou podle <i>Bandyopadhyaye et al.</i> [54]
ΔK_{La}	rozdíl mezi K_{La} a K_{LaB} (%)
M_{O_2}, M_{H_2O}	molekulární hmotnost kyslíku resp. vody
n	frekvence otáčení míchadla (min^{-1})
P_{O_2}	parciální tlak kyslíku v plynné fázi (Pa)
P_b	barometrický tlak (Pa)
q_{O_2}	respirační rychlost buněk ($mmol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)
$q'O_2$	celková rychlost spotřeby kyslíku ($mmol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)
t	čas (s)
VVM	objem plynu vztažený na objem kapaliny za minutu

V_g	objemový přítok plynu do fermentoru (min^{-1})
X	koncentrace biomasy (g/l)
$\rho; \rho_0$	specifická hmotnost vody při teplotě měření a za normálních podmínek (kg/m^3)
ρ_1	specifická hmotnost vody ve fermentoru při teplotě kultivace (kg/m^3)

Literatura

- [1] COOPER, C. M., FERNSTROM, G. A., MILLER, S. A.: Ind. Eng. Chem. **36**, 1944, s. 504
- [2] FINE, R. K.: Biochem. Biol. Eng. Sci. Vol. 1 (Blakebrough, H., Ed.), Academic Press, London 1967, s. 89
- [3] SRISTAVA, R. D., McMILLAN, A. F., HARRIS, I. J.: Can. J. Chem. Eng. **46**, 1968, s. 181
- [4] BELL, G. H., GALLO, M.: Proc. Biochem. **6** (4), 1971, s. 33
- [5] LINEK, V., TVRDÍK, J.: Biotechnol. Bioeng. **13**, 1971, s. 353
- [6] MIMURA, A., KAWANO, K., KODAIRA, R.: J. Ferment. Technol. **47**, 1969, s. 229
- [7] BENEDEK, A., BENNETT, G. F., HO, K. W. A.: Water-1974: II, Municipal Wastewater Treatment, Amer. Inst. Chem. Eng. Symp. Series **71**, (145), 1975, s. 190
- [8] YAGI, S., INOUE, H.: Chem. Eng. Sci. **17**, 1962, s. 411
- [9] BARRON, C. H., O'HERN, H. A. O.: Chem. Eng. Sci. **21**, 1966, s. 397
- [10] SCHULTZ, J. S., GADEN, E. L.: Ind. Eng. Chem. **48**, 1956, s. 2209
- [11] GREENGHALGH S. H., McMANAMEY, W. J., PORTER, K. E.: J. Appl. Chem. Biotechnol. **25**, 1975, s. 143
- [12] PHILLIPS, D., JOHNSON, M. J.: Ind. Eng. Chem. **51**, 1959, s. 83
- [13] YOSHIDA, F., AKITA, K.: A. I. Ch. E. J. **11**, 1965, s. 9
- [14] KOETSIER, W. T., THOENES, D., FRANKENA, J. F.: Chem. Eng. J. **5**, 1973, s. 61
- [15] SATOH, K., MIYAMOTO, S.: J. Ferment. Technol. **48**, 1970, s. 804
- [16] ROBINSON, C. W., WILKE, C. R.: Biotechnol. Bioeng. **15**, 1973, s. 755
- [17] LINEK, V.: Chem. Eng. Sci. **21**, 1966, s. 777
- [18] LINEK, V.: Coll. Czech. Chem. Comm. **40**, 1975, s. 2442
- [19] ELSWORTH, R., WILLIAMS, V., HARRIS-SMITH, R.: J. Appl. Chem. Biotechnol. **7**, 1957, s. 261
- [20] TSAO, G. T., KEMPE, L. L.: J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. **2**, 1960, s. 129
- [21] BENNETT, G. F., KEMPE, L. L.: Biotechnol. Bioeng. **6**, 1964, s. 347
- [22] LINEK, V., BENEŠ, P.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 565
- [23] LEE, Y. Y., TSAO, C. T.: Chem. Eng. Sci. **27**, 1972, s. 1601
- [24] LEE, E. J., De Witt, J., BENNETT, G. F., BROCKWELL, J. L.: Water Research **10**, 1976, s. 1611
- [25] BARTHOLOMEW, W. H., KAROW, E. O., SFAT, M. R., WILHELM, R. H.: Ind. Eng. Chem. **42**, 1950, s. 1801
- [26] WISE, W. S.: J. Gen. Microbiol. **5**, 1951, s. 167
- [27] TSAO, G. T.: Biotechnol. Bioeng. **10**, 1968, s. 765
- [28] MUCHMORE, C. B., CHEN, J. W., BEMILLER, J. N.: Biotechnol. Bioeng. **13**, 1971, s. 271
- [29] BULL, D. N., KEMPE, L. L.: Biotechnol. Bioeng. **13**, 1971, s. 529
- [30] YOSHIDA, E., YAMANA, T.: Biotechnol. Bioeng. **13**, 1971, s. 691
- [31] DECKWER, W. D., BURCKHART, R.: 5th Internat. Ferment. Symp. Berlin, 1976
- [32] HSU, K. H., ERICKSON, L. E., FAN, L. T.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 493
- [33] MacLEAN, G. T., ERICKSON, L. E., HSU, K. H., FAN, L. T.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 493
- [34] HO, G. S., ERICKSON, L. E., FAN, L. T.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 1503
- [35] TUFFILE, C. M., PINHO, F.: Biotechnol. Bioeng. **12**, 1970, s. 849
- [36] HILL, G. A., ROBINSON, C. W.: Biotechnol. Bioeng. **16**, 1974, s. 531
- [37] SCHNEIDER, K., FRISCHKNECHT, K.: J. Appl. Chem. Biotechnol. **27**, 1977, s. 631
- [38] HEINEKEN, F. G.: Biotechnol. Bioeng. **12**, 1970, s. 145
- [39] HEINEKEN, F. G.: Biotechnol. Bioeng. **13**, 1971, s. 599
- [40] FUCHS, R., RYU, D. Y., HUMPREY, A. E.: Industr. Eng. Chem. Prod. Des. Develop. **10**, s. 190
- [41] WERNAU, W. V., WILKE, C. R.: Biotechnol. Bioeng. **15**, 1973, s. 571
- [42] LINEK, V.: Biotechnol. Bioeng. **14**, 1972, s. 285
- [43] LINEK, V., SOBOTKA, M., PROKOP, A.: Biotechnol. Bioeng. Symp. **4**, 1973, s. 429
- [44] VOTRUBA, J., SOBOTKA, M.: Biotechnol. Bioeng. **18**, 1976, s. 1815
- [45] DANG, NDP., KARRER, D. A., DUNN, I. J.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 853
- [46] LINEK, V., VACEK, V.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 983
- [47] LINEK, V., VACEK, V.: Biotechnol. Bioeng. **20**, 1978, s. 305
- [48] LINEK, V., BENEŠ, P.: Biotechnol. Bioeng. **20**, 1978, s. 903
- [49] VOTRUBA, J., SOBOTKA, M., PROKOP, A.: Biotechnol. Bioeng. **20**, 1978, s. 435

- [50] VOTRUBA, J., SOBOTKA, M., PROKOP, A.: *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1978, s. 913
- [51] VOTRUBA, J., SOBOTKA, M., PROKOP, A.: *Coll. Czech. Chem. Comm.* **4**, 1978, s. 713
- [52] TAGUCHI, H., HUMPHREY, A. E.: *J. Ferment. Technol.* **44**, 1966, s. 881
- [53] SUBRAMANIAN, T. V.: *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1978, s. 601
- [54] BANDYOPADHYAY, B., HUMPHREY, A. E., TAGUCHI, H.: *Biotechnol. Bioeng.* **9**, 1967, s. 533
- [55] FUJIO, Y., SAMBUICHI, M., UEDA, S.: *J. Ferment. Technol.* **51**, 1973, s. 154
- [56] HSU, K. H., ERICKSON, L. E., FAN, L. T.: *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 1975, s. 499
- [57] VOTRUBA, J., SOBOTKA, M., PROKOP, A.: *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 1977, s. 1553
- [58] BENEDEK, A., HEIDEGGER, W. J.: *Biotechnol. Bioeng.* **13**, 1971, s. 663
- [59] JAKOB, H. R.: *Methods in Microbiology* (Norris, J. R., Ribbons, D. W., Eds.), Vol. 2, Academic Press, London 1970, s. 91
- [60] HARRISON, D. E.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **22**, 1972, s. 417
- [61] LINTON, J. D., HARRISON, D. E. F., BULL, A. T.: *J. Gen. Microbiol.* **90**, 1975, s. 237
- [62] HOLME, T., LINDHOLM, B.: *Proc. Biochem.* **5**, [2], 1970, s. 7
- [63] PÁCA, J., GRÉGR, V.: *J. Ferment. Technol.* **55**, 1977, s. 213
- [64] PÁCA, J.: *Sborník VŠCHT, E* **43**, 1975, s. 67
- [65] DOLEŽAL, J., KAPRÁLEK, F.: *Folia Microbiol.* **21**, 1976, s. 138
- [66] PÁCA, J.: *Folia Microbiol.* **21**, 1976, s. 417
- [67] ZLOKARNIK, M.: *Adv. Biochem. Eng.*, Vol. 8 (Ghose, T. K., Fiechter, A., Blakebrough, N., Eds.), Springer Verlag, Berlin, 1978, s. 133

Páca, J.: Stanovení objemového koeficientu přenosu kyslíku zahrnující korekci na skutečné kultivační podmínky. *Kvas. prům.*, **30**, 1984, č. 8, s. 182—187.

Je popsána metoda pro stanovení objemového koeficientu přenosu kyslíku z dynamické metody pro aplikaci v podmínkách přebytku kyslíku i při limitaci růstu kyslíkem. Pro určení K_La se využívá integrovaného tvaru rovnice přenosu kyslíku a metoda zahrnuje korekci na skutečné kultivační podmínky v průběhu měření. Metoda je prakticky ověřena na výsledcích získaných při kontinuálních kultivacích bakterií.

Паца, Я.: Определение объемного коэффициента передачи кислорода, включающее коррекцию в отношении

к действительным условиям культивирования. *Квас. прум.* **30**, 1984, № 8, стр. 182—187.

Описывается метод для определения объемного коэффициента передачи кислорода из динамического метода для применения в условиях избытка кислорода и при лимитировании роста кислородом. Для установления K_La используется интегрированная форма уравнения передачи кислорода и метод включает коррекцию в отношении к действительным условиям культивирования в течение измерения. Метод подвергли практической проверке на результатах, полученных при непрерывном культивировании бактерий.

Páca, J.: Determination of Oxygen Transfer Coefficient with the Correction for the Actual Cultivation Conditions. *Kvas. prům.*, **30**, 1984, No. 8, pp. 182—187.

A method for determination of the volumetric oxygen transfer coefficient K_La from dynamic measurement data under conditions of both excess oxygen and oxygen-limited growth of microorganisms is described. The K_La determination follows from the integrated form of the oxygen balance equation and involves a correction for the actual cultivation conditions during measurement. In addition, the method is verified by its application to cultivation data.

Páca, J.: Bestimmung des Volumenoeffizienten der Sauerstoff-Übertragung einschließlich der Korrektur auf die tatsächlichen Kultivationsbedingungen. *Kvas. prům.* **30**, Nr. 8, S. 182—187.

Es wird die Methode zur Bestimmung des Volumenoeffizienten des Sauerstoffübertragung aus der dynamischen Methode für die Applikation in den Bedingungen des Sauerstoffüberschusses und bei der Limitation des Wachstums durch Sauerstoff beschrieben. Für die Ermittlung von K_La wird die integrierte Form der Sauerstoffübertragungsgleichung ausgenutzt und die Methode enthält eine Korrektur auf die tatsächlichen Kultivationsbedingungen im Verlauf der Messung. Die Methode wurde praktisch an den Ergebnissen getestet, die bei kontinuierlichen Kultivationen von Bakterien gewonnen wurden.

Vztahy mezi friabilimetrickou křehkostí, obsahem tanoidů, redukční mohutností podle Chapona a jakostí sladů plzeňského typu

Podstatnou částí práce je chronologicky uspořádaná rekapitulace výsledků studia od poznání rozdílů ve sté kání kongresní sladiny vlivem částečně sklovitých a sklovitých zrn ve sladu až ke zjištění, že paralelita mezi fyzikálním rozluštěním endospermu, obsahem tanoidů a redukční mohutností je logickým důsledkem rovnováhy mezi bílkovinami a tanoidy při výrobě sladiny. Příznivá korelace mezi tanoidy a redukční mohutností vedla k závěru, že změny koncentrace tanoidů a obsahu jednoduchých polyfenolů probíhají při výrobě sladů a piva paralelně s redukční mohutností.

Z uvedeného bohatého číselného materiálu vyplývá, že slady s dobrou křehkostí, snadno podléhající působení enzymů, mohou současně poskytovat piva se znaky dobré jakosti. Se stoupající homogenitou křehkosti stoupá obsah tanoidů a redukční schopnost, tj. takové slady vnášejí při zpracování do piva typické cenné látky, podporující lahodnost chuti.

Velký počet údajů získaných analýzou sladů, ztěžuje sládkům odvodit z nich závěry pro praxi. Test friabilimetrem představuje pokrok v tomto směru. Jsou-li hodnoty křehkosti vyhovující, je slad kvalitní a lze jej zpracovat infúzním postupem, který šetří energii i čas. Se stoupající křehkostí sladů zlepšuje se jakost a výtěžnost. Jako hodnoty použitelné v praxi doporučují autoři zjišťovat při analýze sladů:

1. test friabilimetrem k určení křehkých, částečně sklovitých a sklovitých zrn,
2. obsah extraktu v sušině moučky s údaji o době zcukření, stékání, barvě a pH sladiny,
3. RE 45 °C k posouzení aktivity enzymů.

Pivovarům a sladovnám bez vlastní laboratoře umožňuje určení friability usuzovat na pivovarskou hodnotu sladů, pokud jde o obsah tanoidů a redukční mohutnost.

KRETSCHMER, K. F., CHAPON, L., ERBER, H.-L., KRETSCHMER, H.: Gütebeziehungen zwischen Friabilimeter-Mürbigkeit, Tannoidgehalt und Reduktionskraft nach Chapon in Pilsner Malzen. *Forum Brauerei* **36**, 1983, č. 10, s. 297—302; Tabellenanlog: tamtéž, č. 11, s. 365—367.

Lhotský