

Vliv parciálního tlaku kyslíku na růstovou a fyziologickou charakteristiku buněk *Candida utilis* ve věžovém vícestupňovém fermentoru

663.13
5770.831.12

Ing. JAN PÁCA, CSc., Vysoká škola chemickotechnologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha

Klíčová slova: kvasinky, *Candida utilis*, růst, fyziologie, kontinuální kultivace, fermentor, věžový fermentor, kyslík, parciální tlak, zředovací rychlost, teplota, pH, ethanol, koncentrace, médium, buňka

1. ÚVOD

Výhody věžových vícestupňových fermentorů pro tvorbu biomasy z těkavých substrátů prokázaly předchozí práce [1–7]. Je-li ethanol jediným zdrojem uhlíku a energie, mohou jej kvasinky metabolizovat pouze za aerobních podmínek. Jelikož velikost aerace negativně ovlivňuje pracovní objem fermentoru a působí problémy s tvorbou pěny, je tato studie zaměřena na sledování vlivu zvýšeného parciálního tlaku kyslíku na růst a fyziologickou aktivitu buněčné populace v jednotlivých stupních věžového vícestupňového fermentoru s určitým mezistupňovým promícháváním.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 Mikroorganismus a médium

Pokusy se prováděly s kvasinkami *Candida utilis* č. 136 ze sbírky katedry kvasné chemie a bioinženýrství VŠCHT v Praze.

Kultivace se prováděly v médiu tohoto složení: 0,28 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,10 % K_2SO_4 ; 0,07 % $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,01 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,02 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 % NaCl ; 0,02 % kvasničného autolýzátu. Koncentrace syntetického ethanolu na počátku jednorázové kultivace byla 2 %. Syntetický ethanol byl jediným zdrojem uhlíku a energie v médiu. Médium bylo sterilováno při 120 °C po dobu 30 min a před zaočkováním se kompletovalo přidávkem ethanolu a roztoku MgSO_4 , který byl sterilován odděleně.

Postup přípravy inokula byl popsán v předchozí práci [4].

2.2 Zařízení a kultivační podmínky

Kultivace probíhaly ve věžovém vícestupňovém fermentoru vybaveném měřením a regulací teploty, pH a dávkováním média, jak bylo popsáno v předchozí práci [4]. Také proces sterilace zařízení byl popsán dříve [4].

Frekvence otáčení míchadel byla udržována na kon-

stantní hodnotě. Parciální tlak kyslíku v aeračním plynu se zvyšoval směšováním kyslíku se vzduchem. Objemový průtok plynné fáze byl však udržován na konstantní hodnotě ve všech pokusech, aby se zajistily konstantní hydrodynamické poměry a plynná zadrž v jednotlivých stupních fermentoru [8, 9].

Všechny kultivace byly prováděny za těchto konstantních podmínek: zředovací rychlost vztažená na jeden stupeň $0,3 \text{ h}^{-1}$; pH 4,5; teplota 30°C a koncentrace ethanolu v přítoku živného média 50 g.l^{-1} . Tyto podmínky byly zvoleny na základě předchozích pokusů [4]. Pouze základní hodnota aerace byla nižší. Za těchto podmínek byly rychlosti přenosu kyslíku v jednotlivých stupních fermentoru: v prvním stupni $230 \text{ mmol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$; ve druhém stupni $198 \text{ mmol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$; ve třetím stupni $145 \text{ mmol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$; ve čtvrtém stupni $73 \text{ mmol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Tyto hodnoty byly stanoveny sířičitanovou metodou.

Očkování fermentoru a start kultivace byly stejné jako v předchozí práci [4]. Měření byla prováděna v ustálených stavech kontinuální kultivace v jednohodinových intervalech. Výsledky v obrázcích jsou průměrnými hodnotami šesti stanovení.

2.3 Analytické metody

Koncentrace sušiny biomasy byla stanovena gravimetricky. Vzorky se odstředily a po dvojnásobném promytí se sušily 1 h při 70°C a 2,5 h při 105°C .

Ethanol a acetat byly stanoveny metodou plynové chromatografie [10].

Intracelulární koncentrace RNK byla určena orcino-lovou metodou [11].

Intracelulární koncentrace ATP byla stanovena ATP testem UV (Boehringer, Mannheim, kat. 123 897). Tento enzymový test kvantitativně reaguje nejen s ATP, ale s GTP a UTP (CTP nedává měřitelnou reakci) [12]. Vzorky buněčné suspenze se zfiltrovaly a membrána s buňkami se ponořila do 2,5% HClO_4 na dobu 15 min při teplotě místnosti (extrakce). Poté byl roztok neutralizován na pH 6,0 až 6,5 roztokem 1,5 M KOH. Po 10 min stání byla membrána vyjmuta a opláchnuta. Sraženina obsahující zbytky buněk a krystaly KClO_4 byla odstraněna odstředěním při 13 000 g po dobu 20 min při teplotě 4°C .

Hodnoty aktuální a endogenní respirace a tvorby CO_2 byly stanoveny přímou Warburgovou metodou [4] v atmosféře vzduchu. Manometrická měření se prováděla při pH 4,5 a teplotě 30°C .

Výtěžnost biomasy vztažená na ethanol pro celý fermentor byla vypočtena ze vztahu

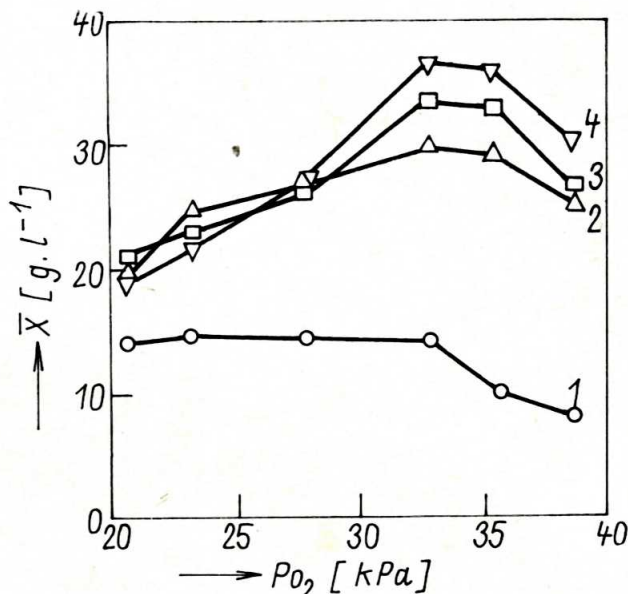
$$Y_{X/S} = \bar{X}_4 / (S_R - \bar{S}_4).$$

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1. Růstové charakteristiky

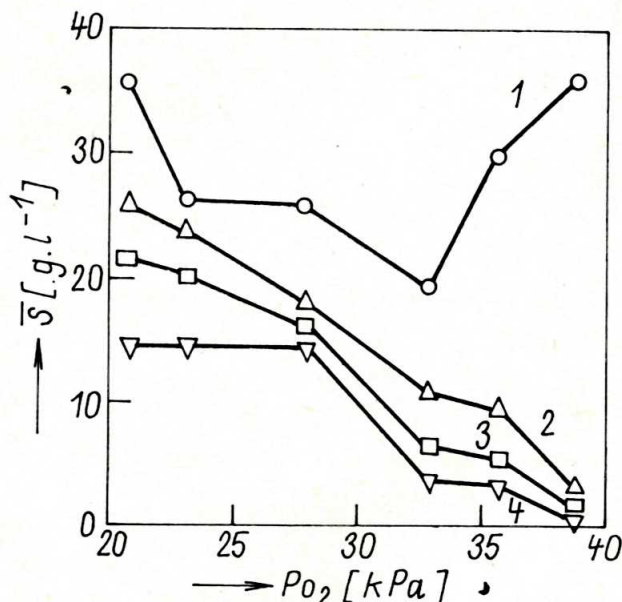
Obrázek 1 ukazuje změny koncentrace biomasy v jednotlivých stupních fermentoru. Hodnota $P_{\text{O}_2} = 21 \text{ kPa}$ odpovídá aeraci vzduchem. Zvýšení P_{O_2} z 21 na 33 kPa nemělo žádný vliv na koncentraci biomasy v 1. stupni, protože rychlost přenosu kyslíku v tomto stupni byla dostatečná již při pouhé aeraci vzduchem. Ve 2. až 4. stupni vedlo zvýšení P_{O_2} k postupné eliminaci limitace růstu kyslíkem, což se projevilo vzrůstem koncentrace biomasy v těchto stupních. Tenze rozpuštěného kyslíku se měřila v každém stupni polarografickými elektrodami Au-Ag/AgCl krytými polypropylenovými membránami [13]. Měření ukázala, že při $P_{\text{O}_2} < 33 \text{ kPa}$ dochází k limitaci růstu kyslíkem alespoň ve 4. stupni. Je tedy příčinou poklesu koncentrace biomasy ve vyšších stupních limitace kyslíkem a nikoliv flotace buněk do pěny, jak předpokládali ve svých pracích Kitai et al. [1] a Goto et al. [2]. Dalším důkazem podporujícím platnost negativního účinku limitace kyslíkem na koncentraci biomasy jsou výsledky získané z pokusů s rozdělením přítoku ethanolu do více stupňů fermentoru [14]. Při překročení $P_{\text{O}_2} = 33 \text{ kPa}$ nastal pokles koncentrace biomasy ve všech stupních. Nejvýraznější pokles se projevil v 1. stupni. Příčinou poklesu byla inhibice růstu buněk vysokým parciálním tlakem kyslíku.

Průběhy aktuálních koncentrací ethanolu v jednotli-



Obr. 1. Koncentrace biomasy v jednotlivých stupních jako funkce parciálního tlaku kyslíku v aeračním plynu

(1) 1. stupeň, (2) 2. stupeň, (3) 3. stupeň, (4) 4. stupeň.



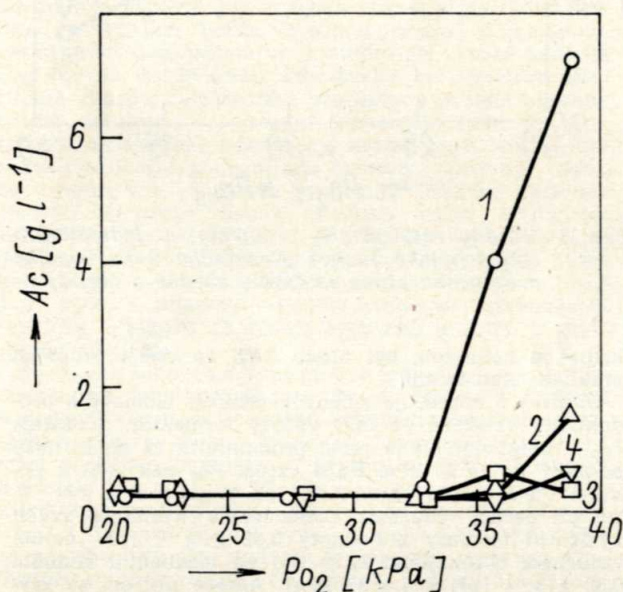
Obr. 2. Koncentrace ethanolu v jednotlivých stupních jako funkce parciálního tlaku kyslíku v aeračním plynu (symboly shodné s obr. 1)

vých stupních fermentoru jsou uvedeny na obr. 2. Pokles \bar{S}_1 při zvýšení P_{O_2} z 21 na 23 kPa nebyl doprovázen ani vzrůstem biomasy, ani koncentrací kyseliny octové (obr. 3) v médiu. Došlo však k tvorbě kyselin s více než dvěma atomy uhlíku v molekule, což se projevilo vzrůstem hodnoty respiračního kvocientu RQ z 0,45 na 0,57 (obr. 8) a vyšší spotřebou NaOH nutnou na udržení konstantní hodnoty pH média. Současně v 1. stupni vzrostla endogenní respirace (obr. 7) a obsah ATP (obr. 9). Průběh koncentrace ethanolu v 1. stupni ukazuje, že s růstem P_{O_2} v plynné fázi klesá aktuální koncentrace ethanolu tak dlouho, dokud se nedosáhne horní kritické hodnoty P_{O_2} , která za daných podmínek činila asi 33 kPa. Při překročení této kritické hodnoty P_{O_2} došlo k inhibici růstu vysokým P_{O_2} , což vedlo k vzrůstu aktuální koncentrace ethanolu v médiu a tím

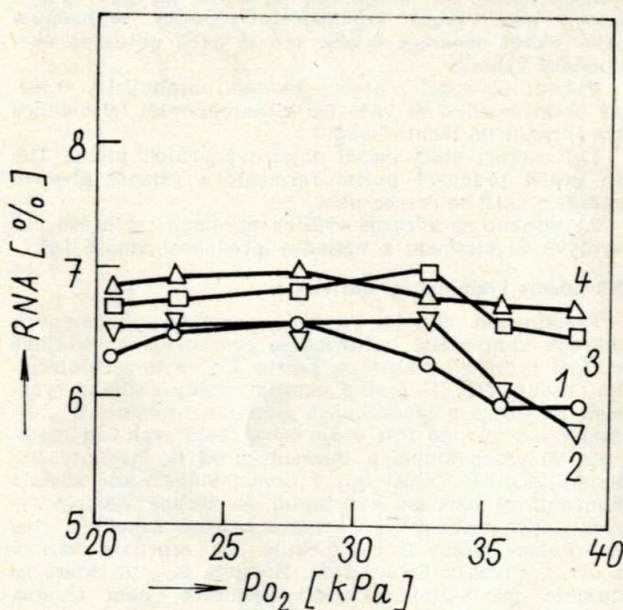
k dvojnásobné substrátové inhibici kombinací P_{O_2} a ethanolu v 1. stupni fermentoru. Inhibiční efekt kombinace vysoké koncentrace ethanolu [15—22] a vysokého P_{O_2} [23—27] byl již v literatuře popsán.

Zvýšení P_{O_2} vedlo ve vyšších stupních fermentoru k poklesu aktuální koncentrace ethanolu s výjimkou 4. stupně, kde S_4 se nezměnilo, dokud hodnota P_{O_2} nepřesáhla 28 kPa, kdy i v tomto stupni došlo k eliminaci limitace růstu kyslíkem. Pokles koncentrace ethanolu spolu s poklesem koncentrace biomasy, který se projevil při překročení horní kritické hodnoty P_{O_2} , je diskutován v dalším textu.

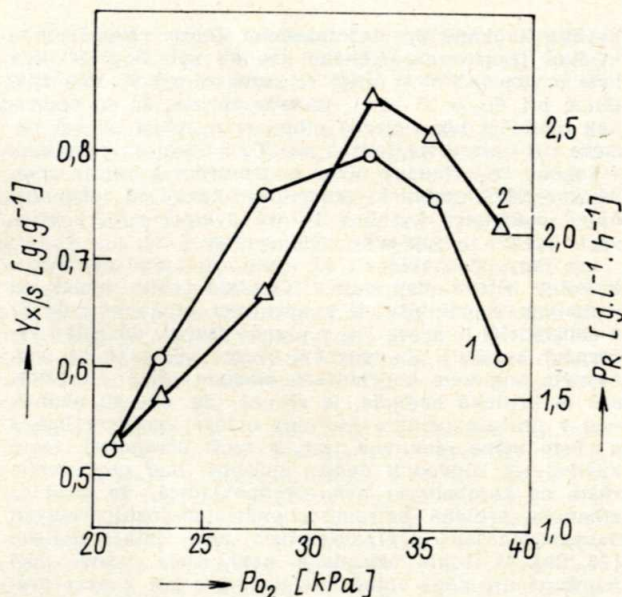
Koncentrace kyseliny octové v jednotlivých stupních fermentoru jsou uvedeny na obr. 3. Za podmínek aerace, kdy hodnota P_{O_2} byla pod kritickou hodnotou, byla tvor-



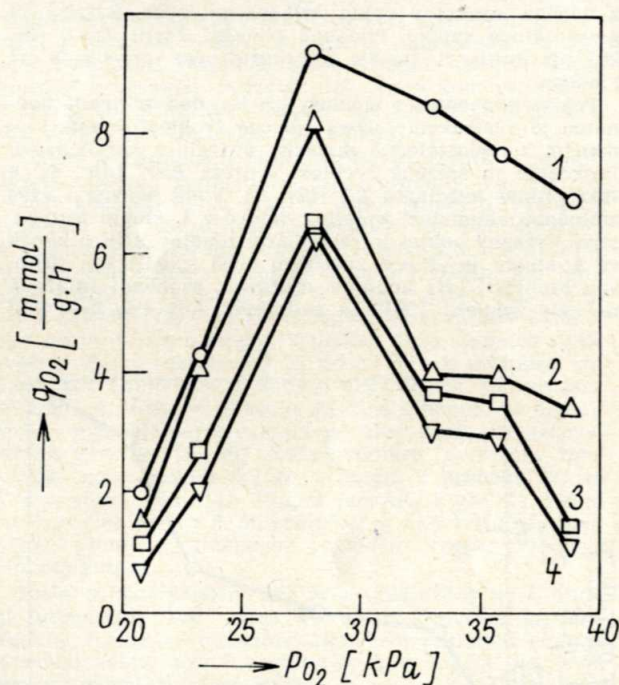
Obr. 3. Koncentrace acetátu v jednotlivých stupních jako funkce parciálního tlaku kyslíku v aeračním plynu (symboly shodné s obr. 1)



Obr. 4. Intracelulární obsah RNK v populaci buněk v jednotlivých stupních jako funkce parciálního tlaku kyslíku v aeračním plynu (symboly shodné s obr. 1)



Obr. 5. Změny výtěžnosti biomasy (1) a produktivity (2) celého systému jako funkce parciálního tlaku kyslíku v aeračním plynu



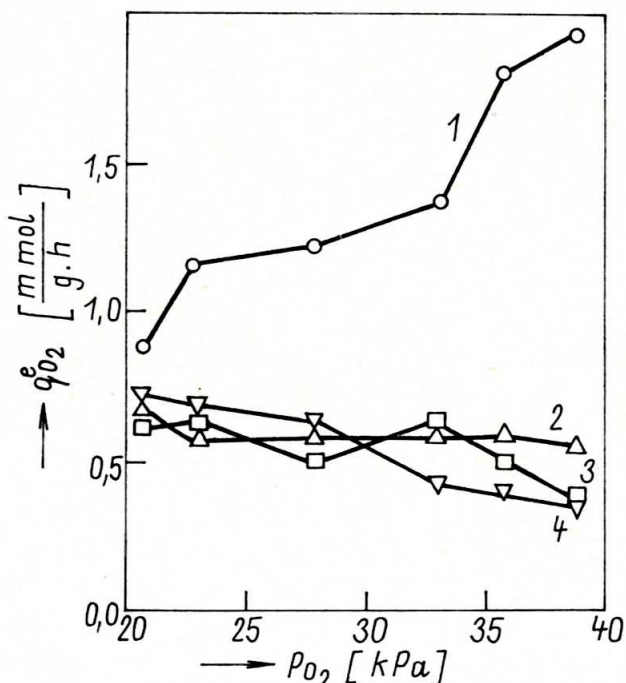
Obr. 6. Aktuální respirace v jednotlivých stupních jako funkce parciálního tlaku kyslíku v aeračním plynu (symboly shodné s obr. 1)

ba kyseliny octové malá a prakticky stejná ve všech stupních fermentoru. Z toho vyplývá, že kyselina octová vytvořená v 1. stupni nebyla ve vyšších stupních v přítomnosti ethanolu v médiu dále oxidována na vodu a CO_2 . Za podmínek, kdy P_{O_2} v aeračním plynu byl vyšší než kritická hodnota ($P_{O_2} > 33$ kPa) a kdy se projevila inhibice růstu, zjistil se v 1. stupni výrazný vzrůst koncentrace kyseliny octové v médiu. Toto zjištění potvrzuje skutečnost, že vysoká koncentrace ethanolu působící spolu s vysokým P_{O_2} inhibici růstu buněk nemá inhibiční účinek na alkoholdehydrogenasu a aldehyddehydrogenasu, nýbrž naopak stimuluje aktivitu obou těchto enzymů. Potvrzuje to i zvýšená rychlost spotřeby

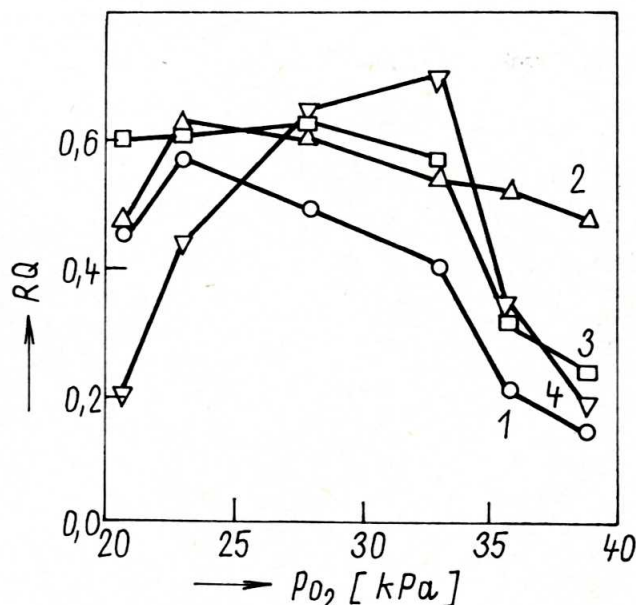
kyslíku buňkami zjištěná měření tenze rozpuštěného kyslíku (tenze rozpuštěného kyslíku při $P_{O_2} \sim 36$ kPa byla o více než 50 % nižší ve srovnání s hodnotou zjištěnou při $P_{O_2} = 33$ kPa). Je tedy zřejmé, že za podmínek inhibiční koncentrace ethanolu kyselina octová nemůže být dále disimilována na CO_2 a vodu za podmínek vysokého P_{O_2} . Naopak nízké koncentrace kyseliny octové ve vyšších stupních fermentoru ukazují na schopnost úplné disimilace kyseliny octové cyklem trikarboxylových kyselin a glyoxalátovým cyklem [28].

Lze tedy předpokládat, že schopnost úplné disimilace kyseliny octové mají buňky *Candida utilis* pouze za podmínek subinhibičních koncentrací ethanolu (obr. 2) a subkritické hodnoty P_{O_2} v plynné fázi (v důsledku vyčerpání kyslíku). Ze srovnání těchto výsledků se současným poklesem koncentrace biomasy při P_{O_2} vyšších, než je kritická hodnota, je zřejmé, že energii uvolněnou v procesu oxidace kyseliny octové využívají buňky k růstu méně efektivně (tzn. s nižší účinností). Toto zjištění lze zdůvodnit dvěma způsoby: buď odpážením růstu od katabolismu nebo předpokladem, že oxidace ethanolu probíhá extramitochondriálně lokalizovanými dehydrogenasami v glyoxysomech nebo mikrotubulech [28, 29]. V těchto případech není zcela jasné, jaké množství uvolněné volné energie může být konzervováno v energeticky bohatých sloučeninách [30, 31]. Porovnáme-li metabolismus ethanolu v 1. stupni s metabolismem, kterým je disimilován ve vyšších stupních fermentoru, je patrné, že zvýšená akumulace kyseliny octové v médiu ukazuje na to, že řídicí reakcí je buď aktivace kyseliny octové na acetyl — CoA, nebo jedna z dalších reakcí v cyklu trikarboxylových kyselin či glyoxalátové spojky. Podobné chování zjistil *Oura* [25, 26] při kultivaci buněk *Saccharomyces cerevisiae* na glukose.

Pokles koncentrace biomasy při P_{O_2} nad kritickou hodnotou je důsledkem snížení růstové rychlosti buněk plynoucím z nedostatečné dodávky energie z katabolismu. Prokazuje to snížená rychlost syntézy RNK (obr. 4) a také pokles kvocientu RQ (obr. 9), který souvisí s výše zmíněnou akumulací kyseliny octové v 1. stupni fermentoru. Výrazný pokles intracelulární hladiny RNK u buněk ve 4. stupni je zřejmě způsoben nižší specifickou růstovou rychlostí (viz hodnota zředovací rychlosti vztahovaná na celý systém) [38]. Za podmínek, kdy P_{O_2} bylo pod



Obr. 7. Endogenní respirace v jednotlivých stupních jako funkce parciálního tlaku kyslíku v aeračním plynu (symboly shodné s obr. 1)



Obr. 8. Průběhy respiračního kvocientu v jednotlivých stupních jako funkce parciálního tlaku kyslíku v aeračním plynu (symboly shodné s obr. 1)

kritickou hodnotou, byl obsah RNK ve všech stupních prakticky konstantní.

Obrázek 5 zobrazuje změny výtěžnosti biomasy a produktivity vztahované na celý věžový fermentor. S růstem P_{O_2} v aeračním plynu roste produktivita až do kritické hodnoty $P_{O_2} = 33$ kPa. Další vzrůst P_{O_2} pak vedl k poklesu obou těchto parametrů. Jak je patrné z obr. 6, lze při aeraci vzduchem obohaceným kyslíkem zvýšit výtěžnost biomasy z hodnoty $0,52$ g.g⁻¹ (při aeraci vzduchem obsahujícím 21 % O_2) na maximální hodnotu $0,80$ g.g⁻¹ (při $P_{O_2} = 33$ kPa). Aerace plynem se zvýšeným P_{O_2} zřetelně ovlivňuje koncentraci biomasy dosahovanou ve výtokovém proudu z fermentoru. Koncentrace biomasy vzrůstá z $18,5$ g.l⁻¹ získané při aeraci atmosférickým vzduchem na 37 g.l⁻¹ získané při zvýšeném P_{O_2} v aeračním plynu. Také produktivita systému úměrně roste na maximální hodnotu $2,6$ g.l⁻¹.h⁻¹. Kromě toho vysoká koncentrace biomasy zvyšuje také proces separace buněk, což je další nesporná ekonomická výhoda.

Výhody plynoucí z aerace plynem obsahujícím zvýšený obsah kyslíku ve věžovém vícestupňovém fermentoru lze shrnout do těchto bodů:

1. K aeraci stačí menší objemový průtok plynu. Tím se zvětší pracovní objem fermentoru (menší plynová zadrž) a sníží se tvorba pěny.
2. Dosáhne se výrazně vyšších parametrů procesu, což vyplývá ze srovnání s výsledky předchozí studie [4].

3.2 Změny fyziologické aktivity

Fyziologická aktivita buněčné populace v ustálených stavech kontinuální kultivace se posuzovala na základě měření rychlosti respirace, tvorby CO_2 a intracelulárního obsahu ATP. Obrázek 6 ukazuje změny aktuální rychlosti respirace v jednotlivých stupních fermentoru. Zvýšení P_{O_2} v plynné fázi vedlo ke vzrůstu rychlosti respirace ve všech stupních fermentoru až do hodnoty P_{O_2} kolem 28 kPa. Vzrůst q_{O_2} v prvním stupni, kde zůstala koncentrace biomasy konstantní, je zřejmě vyvolán fyziologickou změnou související s tvorbou kyselin s více než dvěma atomy C v molekule. Ze srovnání obr. 6 s obr. 1 plyne zajímavý fakt. Hodnota P_{O_2} , při které se dosáhlo maximální rychlosti respirace, není shodná s hodnotou P_{O_2} , při které se dosáhlo maximální koncentrace biomasy. Vysvětlení tohoto faktu je zřejmě souvisí s pozorováním *Stouthamera* [32] a *Hadjipetrou et al.* [33], že se zvýšenou sekrecí kyseliny octové do média klesá rychlost respirace buněčné populace. Ukázalo se

totíž, že sekrece kyseliny octové z buněk je mechanismem dovolujícím fakultativním mikrorganismům dosáhnout vyšší specifické růstové rychlosti [32]. S ohledem na existenci horního kritického P_{O_2} lze předpokládat, že zmíněný mechanismus působí i v opačném směru. Vzrůst q_{O_2} s růstem P_{O_2} ve vyšších stupních fermentoru odpovídá rostoucí koncentraci biomasy v médiu. Jelikož vzrůst P_{O_2} působí postupný přechod z podmínek růstu limitovaného kyslíkem na růst nelimitovaný kyslíkem, charakterizují hodnoty q_{O_2} rostoucí aktivitu oxidace ethanolu. Kromě toho vzrůst výtěžnosti $Y_{X/S}$ dovoluje vyslovit předpoklad, že vzrůstá účinnost spřažení mezi katabolickými procesy a růstem buněčné populace. Potvrzují to také téměř konstantní hodnoty endogenní respirace (obr. 7).

Při překročení hodnoty $P_{O_2} \sim 28$ kPa nastává ve všech stupních fermentoru pokles q_{O_2} . Příčinou relativně malého poklesu q_{O_2} v prvním stupni je spotřeba kyslíku na rychlejší tvorbu kyseliny octové z ethanolu. Podobná situace nastala ve 2. stupni při vysoké hodnotě P_{O_2} (od 36 do 39 kPa), kdy kyslík byl využíván jako finální akceptor elektronů i pro úplnou oxidaci kyseliny octové vytvořené v 1. stupni fermentoru (obr. 3). Skutečnost, že výrazný pokles q_{O_2} nastal dříve, než se dosáhlo maximální koncentrace biomasy, potvrzuje názor, že v některých případech se nemusí inhibice kyslíkem projevit ve změně růstové rychlosti, nýbrž v inhibici některých buněčných funkcí [27, 34, 35]. Výrazný pokles q_{O_2} při $P_{O_2} > 36$ kPa ve 3. a 4. stupni vyplývá z nízké koncentrace ethanolu a kyseliny octové v médiu (obr. 2 a 3) spolu s relativně nízkými hodnotami zředovacích rychlostí (celkové zředovací rychlosti pro tří- a čtyřstupňový systém).

Rychlosti endogenní respirace v jednotlivých stupních fermentoru jsou uvedeny na obr. 7. Protože v hodnotě endogenní respirace se odráží schopnost respirační kontroly buněk, je zřejmá významná fyziologická odlišnost mezi buněčnou populací z prvního a vyšších stupňů. S růstem P_{O_2} z 21 na 23 kPa v 1. stupni vzrůstá q^{CO_2} s poklesem koncentrace ethanolu pod kritickou koncentrací. Z hlediska růstové rychlosti byl i další vzrůst P_{O_2} až na jeho kritickou hodnotu doprovázen vzrůstem q^{CO_2} . Protože v tomto rozsahu P_{O_2} zůstala koncentrace biomasy konstantní (obr. 1), lze předpokládat, že kombinovaný efekt relativně vysoké koncentrace ethanolu spolu s rostoucím P_{O_2} vede k postupnému odpřažení růstu od katabolismu v důsledku nedostatečné respirační kontroly. Na základě analogie s pracemi, zabývajícími se touto problematikou u bakterií [27, 36] a kvasinek [25, 26,

31, 37], je zřejmé, že nedostatečná respirační kontrola souvisí se změnami hladiny induktivních enzymů trikarboxylového a glyoxalátového cyklu, cytochromů a dodatků redukcijících ekvivalentů.

Velikost endogenní respirace závisí velice zřetelně na koncentraci ethanolu v médiu. Naopak však nelze zanedbat významný vliv adaptace buněk na vyšší koncentrace ethanolu, který se při použití věžového vícestupňového fermentoru ještě značně zvýší definovaným zpětným tokem perforovanými přepážkami. Oba tyto faktory jsou příčinou toho, že hodnoty endogenní respirace ve vyšších stupních fermentoru byly zhruba o 50 % nižší ve srovnání s hodnotou q_{O_2} v 1. stupni. Jak již prokázaly výsledky předchozí práce [4], zůstává hodnota endogenní respirace konstantní v těch stupních fermentoru, kde je koncentrace ethanolu v médiu nízká.

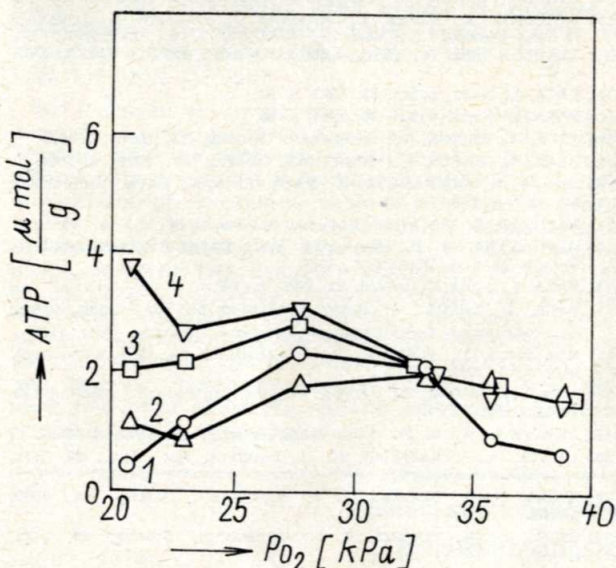
Odlíšné chování se projevilo při hodnotách P_{O_2} nad 33 kPa. Vysoký P_{O_2} inhiboval disimilaci kyseliny octové, která se počala v médiu hromadit (obr. 3). Důsledkem této inhibice bylo malé množství energie uvolněné v katabolismu pro růst buněk v 1. stupni fermentoru. To způsobilo nejen pokles výtěžnosti biomasy, ale také významné změny buněčné fyziologie. Výrazný vzrůst endogenní respirace odpovídal zvýšené aktivitě alkoholdehydrogenasy a aldehyddehydrogenasy vyvolané zřejmě inhibiční koncentrací ethanolu v médiu za podmínek přebytku kyslíku. Ve druhém stupni zůstala hodnota endogenní respirace konstantní a ve 3. a 4. stupni poněkud poklesla. Je proto zřejmé, že ve druhém a vyšších stupních, kde jak koncentrace ethanolu v médiu, tak i hodnota P_{O_2} v plynné fázi jsou pod kritickými hodnotami, je kyselina octová intenzivně disimilována a hodnoty endogenní respirace klesají. Toto zjištění dobře souhlasí s výsledky Abbotta [21], který studoval inhibici růstu po přidavku ethanolu chemostatické populaci, kde limitujícím faktorem byl ethanol.

Změny v hodnotách respiračního kvocientu v jednotlivých stupních fermentoru jsou uvedeny na obr. 8. Vzrůst hodnoty RQ v prvních dvou stupních vyvolaný zvýšením P_{O_2} lze přičíst skutečnosti, že více ethanolu je totálně disimilováno cyklem trikarboxylových kyselin, protože koncentrace ethanolu v médiu klesla pod inhibiční hladinu. Vzrůst RQ ve 3. stupni nebyl pozorován asi z důvodu fyziologicky vhodných koncentrací ethanolu v médiu v tomto stupni. V prvních dvou stupních vedlo zvýšení P_{O_2} v rozsahu od 23 do 33 kPa k určitému poklesu RQ . Tento pokles souvisí s poklesem koncentrace ethanolu v médiu a ukazuje, že více ethanolu je disimilováno glyoxalátovým cyklem na úkor cyklu trikarboxylových kyselin [39, 40]. Tuto hypotézu potvrzuje také i další menší pokles RQ ve 3. stupni a průběhy RQ ve 3. a 4. stupni při $P_{O_2} > 33$ kPa (srovnej s obr. 2). Velmi malý pokles RQ ve 2. stupni při P_{O_2} nad kritickou hodnotou plyne z intenzivní oxidace kyseliny octové v tomto stupni.

Zcela odlišné průběhy RQ byly pozorovány ve 4. stupni fermentoru. Zde vzrůst RQ až do dosažení kritické hladiny P_{O_2} nebyl způsoben zmíněnou aktivitou glyoxalátového cyklu, nýbrž postupným přechodem na plně aerobní podmínky růstu buněk.

Z kvantitativního srovnání hodnot RQ v jednotlivých stupních je zřejmé, že tato veličina citlivě odráží podmínky limitace kyslíkem ve vyšších stupních fermentoru při nižších hodnotách P_{O_2} . Kromě toho změna RQ též citlivě odráží vliv kombinovaného inhibičního účinku vysokou koncentrací ethanolu a vysokým P_{O_2} v plynné fázi. Proto se tento parametr jeví velmi výhodným pro regulaci mikrobiálního procesu na základě změn fyziologie a metabolismu buněčné populace. Podobný názor vyjádřil i Spruytenburg *et al.* [41].

Intracelulární hladinu ATP buněčné populace v jednotlivých stupních fermentoru ukazuje obr. 9. Změny hladiny ATP v populaci bakterií za různých fyziologických podmínek studovalo již více autorů. Zvláštní pozornost věnovali sledování vlivu specifické růstové rychlosti u fakultativních bakterií s ohledem na složení živného média a přítomnost nebo absenci finálního akceptoru elektronů [42—50]. Všechny tyto studie prokázaly, že neexistuje jednoduchá a přímá závislost mezi



Obr. 9. Změny intracelulární koncentrace ATP v buněčné populaci z jednotlivých stupňů jako funkce parciálního tlaku kyslíku v aeračním plynu (symboly shodné s obr. 1)

intracelulární hladinou ATP a tvorbou energie v populaci intaktních buněk. Tento závěr vyplývá ze skutečnosti, že koncentrace adenylátů mají regulační funkci jak v katabolismu, tak v anabolismu [51–53] a velikost hladiny ATP je ovlivněna také rychlostí obratu ATP a účinností procesu oxidativní fosforylace, který závisí na kultivačních podmínkách [31, 32, 49, 54]. Diskuse výsledků získaných v této práci bere v úvahu zmíněné faktory. Nízká hladina ATP v 1. stupni při $P_{O_2} \approx 21$ kPa je důsledkem spotřeby energie na růst buněk za podmínek inhibice vysokou koncentrací ethanolu (srovnej obr. 1 a 2). Hladina ATP vzrůstá s růstem P_{O_2} zřejmě v důsledku rychlejší tvorby energie, což dobře souhlasí s růstem respirační rychlosti. Přestože však současně s růstem P_{O_2} roste i endogenní respirace (obr. 7), potvrzuje to výše uvedenou hypotézu o odpřažení růstu od katabolismu. Průběh hladin ATP ve 2. stupni je podobný průběhu v 1. stupni. Poněkud nižší hodnoty ve 2. stupni odpovídají vyšší specifické růstové rychlosti, jež vyplývá z přírůstku koncentrace biomasy (obr. 1). Toto vysvětlení je v souladu s nálezem Forresta [45], že při vyšší specifické růstové rychlosti je hladina ATP v buňkách nižší. Vyšší hladiny ATP ve 3. a 4. stupni souvisí s limitací růstu kyslíkem. S růstem P_{O_2} dochází k postupné eliminaci limitace kyslíkem, vzrůstá růstová rychlost buněčné populace a hladina ATP klesá. Při použití ethanolu jako jediného zdroje uhlíku a energie mohou buňky energii nutnou pro všechny své funkce získat pouze za aerobních podmínek. Některé z enzymů participujících v cyklu trikarboxylových kyselin a glyoxalátovém cyklu jsou induktivní [39, 26, 53] a část energie uvolněná v katabolismu je spotřebována na syntézu těchto enzymů. Za podmínek bez inhibice vysokou koncentrací ethanolu a bez limitace kyslíkem ($P_{O_2} \approx 33$ kPa) byla hladina ATP v buňkách ve všech stupních fermentoru prakticky stejná.

Inhibice růstu buněk nad kritickou hodnotou P_{O_2} se projevila výrazným poklesem hladiny ATP v populaci buněk z 1. stupně fermentoru. Tento fakt je potvrzením uvedené hypotézy o nedostatečné tvorbě energie v katabolismu za těchto podmínek. Pokles hladiny ATP v buňkách z ostatních stupňů fermentoru byl podstatně nižší vzhledem k subinhibičním koncentracím ethanolu. Nižší hladina ATP souvisí zřejmě s tvorbou energie při disimilaci kyseliny octové (obr. 3), což je z hlediska výtěžnosti Y_{ATP} proces méně účinný.

4. ZÁVĚR

Cílem této studie bylo dosáhnout lepších parametrů procesu produkce biomasy prováděné ve věžovém více-stupňovém fermentoru s definovaným zpětným tokem. Jediným zdrojem uhlíku a energie k růstu byl ethanol. Kromě toho byly sledovány fyziologické změny buněčné populace s cílem získat více informací o faktorech limitujících kapacitu procesu.

Získané výsledky lze shrnout do těchto bodů:

1. Limitace růstu kyslíkem, která nastává ve vyšších stupních fermentoru, je-li použito k aeraci vzduchu, způsobuje pokles koncentrace biomasy.

2. Z důvodů eliminace limitace kyslíkem, zabránění snížení reakčního objemu fermentoru a dosažení menší tvorby pěny je výhodné použít pro aeraci vzduch obohacený kyslíkem.

3. Ve srovnání s výsledky předchozí studie [4] bylo zjištěno, že zvýšení P_{O_2} v plynné fázi dovoluje dosáhnout vyšší výtěžnosti biomasy a produktivity procesu. Bohužel, je-li veškerý ethanol přiváděn do 1. stupně fermentoru, způsobuje zvýšení P_{O_2} postupné odpřažení růstu od energetického metabolismu a tvoří se kyseliny s více než 2 atomy uhlíku v molekule.

4. Ukázalo se, že maximální rychlosti respirace se dosáhne při nižším P_{O_2} , než je hodnota, při které se dosáhne maximální koncentrace biomasy ve všech stupních fermentoru.

5. Bylo prokázáno, že buňky *Candida utilis* jsou citlivé na zvýšení P_{O_2} v plynné fázi. Lze tedy říci, že tento mikroorganismus má svůj „horní kritický“ parciální tlak kyslíku v aeračním plynu.

6. Při překročení horního kritického P_{O_2} dochází k inhibici kyslíkem. Ke změně buněčné fyziologie a meta-

bolismu dochází již při nižším P_{O_2} , než je P_{O_2} , kdy se projeví inhibice růstu buněk.

7. Inhibice kyslíkem blokuje disimilaci kyseliny octové cyklem trikarboxylových kyselin a glyoxalátovým cyklem, což vede k nedostatečné tvorbě energie a výrazné akumulaci kyseliny octové v médiu.

8. Za podmínek inhibice kyslíkem vlivem vysokého P_{O_2} vzrůstá aktivita alkoholdehydrogenasy a aldehyddehydrogenasy v buňkách.

9. Kyselina octová vytvořená v 1. stupni fermentoru je ve 2. stupni intenzivně disimilována spolu s ethanolem.

Uvedené závěry vyvolávají řadu otázek. Jednou z nich je předpoklad, že hodnota horního kritického P_{O_2} , při které dochází k inhibici kyslíkem, závisí na koncentraci ethanolu v médiu. Bude proto cílem dalších prací tuto otázku zodpovědět.

5. Použité symboly

Ac	— koncentrace kyseliny octové v médiu v ustáleném stavu [$g \cdot l^{-1}$],
ATP	— intracelulární hladina adenosintrifosfátu ($\mu mol \cdot g^{-1}$),
P_{O_2}	— parciální tlak kyslíku v aeračním plynu (kPa),
P_R	— produktivita procesu [$g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$],
q_{O_2}	— aktuální respirace ($mmol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$),
q^{CO_2}	— endogenní respirace ($mmol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$),
RNK	— intracelulární hladina kyseliny ribonukleové vztažena na sušinu buněk (%),
RQ	— respirační kvocient (—),
S	— koncentrace ethanolu v médiu v ustáleném stavu [$g \cdot l^{-1}$],
S_R	— koncentrace ethanolu v přítoku živného média [$g \cdot l^{-1}$],
X	— koncentrace sušiny buněk v ustáleném stavu [$g \cdot l^{-1}$],
Y_{ATP}	— výtěžnost biomasy vztažená na energii 1 molu ATP [$g \cdot mol^{-1}$],
$Y_{X/S}$	— výtěžnost biomasy vztažená na spotř. ethanol [$g \cdot g^{-1}$],
dolní index	— číslo stupně fermentoru (—)

Literatura

- [1] KITAI, A., OKAMOTO, R., OZAKI, A.: Proc. of the 4th IFS: Fermentation Technology Today (IFS Tokyo), 1972, s. 147.
- [2] GOTO, S., KITAI, A., OZAKI, A.: J. Ferment. Technol., **51**, 1973, s. 582.
- [3] AKIBA, T., FUKIMBARA, T.: J. Ferment. Technol. **51**, 1973, s. 134.
- [4] PÁČA, J., GRÉGR, V.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 539.
- [5] SCHÜGERL, K., LÜCKE, J., LEHMANN, J., WAGNER, F.: Advances in Biochemical Engineering, (GHOSE, T. K., FIECHTER, A., BLAKEBROUGH, N., eds.), Springer-Verlag, Berlin, Vol. **8**, 1978, s. 63.
- [6] PÁČA, J.: Kvas. prům. **28**, 1982, s. 82.
- [7] PÁČA, J.: Kvas. prům. **30**, 1984, s. 38.
- [8] PÁČA, J., GRÉGR, V.: Biotechnol. Bioeng. **18**, 1976, s. 1075.
- [9] PÁČA, J., GRÉGR, V.: Biotechnol. Bioeng. **21**, 1979, s. 1809.
- [10] UNGER, P., VOZŇÁKOVÁ, Z., PÁČA, J.: Appl. Chem. Biotechnol. **27**, 1977, s. 150.
- [11] MILITZER, E. W.: Arch. Biochem. **9**, 1946, s. 85.
- [12] BERGMAYER, H. U.: Methoden der Enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim, 1962.
- [13] PÁČA, J.: Folia Microbiol. **21**, 1976, s. 417.
- [14] PÁČA, J., GRÉGR, V.: paper presented on 7th Intern. Symp. on Continuous Cultivation of Microorg., Prague, July 1978.
- [15] HOLZBERG, I., FINN, R. K., STEINKRAUS, K. H.: Biotechnol. Bioeng. **9**, 1967, s. 413.
- [16] AIBA, S., SHODA, M., NAGATANI, M.: Biotechnol. Bioeng. **10**, 1968, s. 845.
- [17] EDWARDS, W. V. H.: Biotechnol. Bioeng. **12**, 1970, s. 679.
- [18] OMATA, S., TERASHIMA, H.: J. Ferment. Ass., Jpn., **26**, 1970, s. 317.
- [19] ZINES, D. O., ROGERS, P. L.: Biotechnol. Bioeng. **12**, 1970, s. 561.
- [20] ZINES, D. O., ROGERS, P. L.: Biotechnol. Bioeng. **13**, 1971, s. 293.
- [21] ABBOTT, B. J.: J. Gen. Microbiol. **75**, 1973, s. 383.
- [22] PROKOP, A., SOBOTKA, M., PANOŠ, J.: Paper presented on 7th International Symp. on Continuous Cultivation of Microorg., Prague, July 1978.
- [23] HARTMEIER, W., BRONN, W. K., DELLWEG, H.: Proceedings of the 2nd Symp. Technische Mikrobiologie, (DELLWEG, H. Ed.),

- Verlag Versuchs-und Lehranstalt für Spiritusfabrikation im Inst. für Gärungswerke und Biotechnologie, Berlin 1970, s. 33.
- [24] OURA, E.: Biotechnol. Bioeng. **16**, 1974, s. 1197.
- [25] OURA, E.: Biotechnol. Bioeng. **16**, 1974, s. 1213.
- [26] OURA, E.: Biotechnol. Bioeng. Symp. **4** (1), 1973, s. 117.
- [27] HARRISON, D. E. F.: The Oxygen Metabolism of Microorganisms (Meadowfield Press, Durham, 1976).
- [28] LEHNINGER, A. L.: Biochemistry, 6th ed., Worth, New York 1972, s. 356.
- [29] OSUMI, M., MIRVA, N., TERANISHI, Y., TANAKA, A., FUKUI, S.: Arch. Microbiol. **99**, 1974, s. 181.
- [30] OHNISHI, T., SOTTOCASA, G., ERNSTER, L.: Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris), **48**, 1966, s. 1189.
- [31] AIKING, H., STERNBURG, A., TEMPEST, D. W.: Arch. Microbiol. **113**, 1977, s. 65.
- [32] STOUTHAMER, A. H.: Yield Studies in Microorganisms, Meadowfield Press, Durham 1976, s. 61.
- [33] HADJIPETROU, L. P., GERRITS, J. P., TEULINGS, F. A. G., STOUTHAMER, A. H.: J. Gen. Microbiol. **36**, 1964, s. 139.
- [34] YOUNG, H. L.: J. Bacteriol. **97**, 1969, s. 1498.
- [35] POSTGATE, J.: In Microbes and Biological Productivity, (HUGHES, D. E., ROSE, A. H., eds), Cambridge 1971, s. 287.
- [36] WIMPENNY, J. W. T., NECKLEN, D. K.: Biochim. Biophys. Acta **253**, 1971, s. 352.
- [37] HARRISON, D. E. F.: Critical Reviews in Microbiology CRC Press, Cleveland 1973, s. 185.
- [38] MIAN, F. A., FENCL, Z., PROKOP, A.: Continuous Cultivation of Microorganisms, Academia, Prague 1969, s. 105.
- [39] RICKARD, P. A. D., HOGAN, C. B.: Biotechnol. Bioeng. **20**, 1978, s. 1111.
- [40] MOR, J. R., FIECHTER, A.: Biotechnol. Bioeng. **1**, 1968, s. 159.
- [41] SPRUYTENBURG, R., DUNN, I. J., BOURNE, J. R.: First European Congress on Biotechnology, Part 1, Dechema Frankfurt n/M. 1978, Vol. 1, s. 170.
- [42] COLE, H. A., WIMPENNY, W. T., HUGHES, D. E.: Biochim. Biophys. Acta **143**, 1967, s. 445.
- [43] FRANZEN, J. S., BINKLEY, S. B.: J. Biol. Chem. **236**, 1961, s. 515.
- [44] SMITH, R. C., MAALOE, O.: Biochim. Biophys. Acta **86**, 1964, s. 229.
- [45] FORREST, W. W.: J. Bacteriol. **90**, 1965, s. 1013.
- [46] DAWES, E. A., LARGE, P. J.: J. Gen. Microbiol. **60**, 1970, s. 31.
- [47] LAZDUNSKI, A., BELAICH, J. P.: J. Gen. Microbiol. **70**, 1972, s. 187.
- [48] HOBSON, P. N., SUMMERS, R.: J. Gen. Microbiol. **70**, 1972, s. 351.
- [49] HARRISON, E. D. F., MAITRA, P. K.: Biochem. J. **112**, 1969, s. 647.
- [50] DOLEŽAL, J., KAPRÁLEK, F.: Folia Microbiol. **21**, 1976, s. 188.
- [51] SOLS, A., GANCEDO, C., DELAFUENTE, G.: The Yeast (ROSE, A. H., HARRISON, J. S. eds.) AC Academia Prague 1971, Vol. 2, s. 271.
- [52] CHAPMAN, A. G., FALL, L., ATKINSON, D. E.: J. Bacteriol. **108**, 1971, s. 1072.
- [53] ATKINSON, D. E.: Ann. Rev. Microbiol. **23**, 1969, s. 47.
- [54] AIKING, H., TEMPEST, D. W.: Arch. Microbiol. **108**, 1976, s. 117.

Páca, J.: Vliv parciálního tlaku kyslíku na růstovou a fyziologickou charakteristiku buněk *Candida utilis* ve věžovém víceetapovém fermentoru. Kvas. prům. **32**, 1986, č. 7—8, s. 183—189.

Byl studován vliv zvýšeného parciálního tlaku kyslíku v aeračním plynu na růst a fyziologickou aktivitu buněk *Candida utilis* ve věžovém víceetapovém fermentoru. Měření byla prováděna v ustálených stavech kontinuální kultivace při konstantní hodnotě zředovací rychlosti, teploty a pH média ve všech stupních fermentoru a s konstantní koncentrací ethanolu v přítoku živného média. Parciální tlak kyslíku v plynné fázi se měnil od 21 do 30 kPa. Výsledky prokázaly existenci horního kritického parciálního tlaku kyslíku v plynné fázi. Prokázalo se, že hodnota horního kritického P_{O_2} ovlivňuje nejen rychlost růstu, výtěžnost biomasy a produktivitu, ale také fyziologii buněčné populace, což se projevilo změnami respirační aktivity a aktivity alkoholdehydrogenasy a aldehyddehydrogenasy.

Паца, Я.: Влияние парциального давления кислорода на ростовую и физиологическую характеристику клеток *Candida utilis* в башенном многоступенчатом ферменторе. Квас. прум. **32**, 1986, № 7—8, стр. 183—189.

Исследовалось влияние повышенного парциального давления кислорода в аэрационном газе на рост и физиологическую активность клеток *Candida utilis* в башенном многоступенчатом ферменторе. Измерения проводились в установившихся состояниях непрерывного культивирования при константной величине скорости разбавления, температуры и pH среды во всех ступенях ферментора и с константной концентрацией этанола в притоке питательной среды. Парциальное давление кислорода в газообразной фазе изменялось от 21 до 39 кПа. Результаты доказали существование верхнего критического P_{O_2} оказывает влияние не только на скорость роста, выход биомассы и производительность, а также на физиологические свойства клеток, что проявилось в изменениях дыхательной активности и активности алкогольдеhydroгеназы и альдегиддеhydroгеназы.

Páca, J.: Effect of P_{O_2} on Growth and Physiological Characteristics of *Candida utilis* in Multistage Tower Fermentor. **32**, 1986, Nr. 7—8, pp. 183—189.

The effect of increasing the partial pressure of oxygen in the aeration gas on growth and physiological activity of the yeast *Candida utilis* in a multistage tower fermentor was studied. The measurements were made at steady states of continuous culture for single values of dilution rate, temperature and pH in all stages of the fermentor and with one given ethanol concentration in the growth medium feed. The partial pressure of oxygen in the gas phase was changed in the range from 21 to 39 kPa. The results revealed the existence of the upper critical value of the partial pressure of oxygen in the gas phase. It was demonstrated that the upper critical value of P_{O_2} influences not only the growth rate, biomass yield, and productivity, but also the cell physiology resulting in changes of respiration activity and activity of alcohol and aldehyde dehydrogenases.

Páca, J.: Einfluß des partialen Sauerstoffdrucks auf die Wachstums- und physiologische Charakteristik der Zellen von *Candida utilis* in einem mehrstufigen Turmfermentor. Kvas. prům. **32**, 1986, Nr. 7—8, S. 183—189.

Es wurde der Einfluß des erhöhten partialen Sauerstoffdrucks im Aerationsgas auf das Wachstum und die physiologische Aktivität der Zellen von *Candida utilis* in einem mehrstufigen Turmfermentor studiert. Die Messungen wurden in stabilisierten Zuständen der kontinuierlichen Kultivierung bei konstanten Werten der Verdünnungsgeschwindigkeit, Temperatur und des pH des Mediums in allen Fermentorstufen und mit einer konstanten Äthanolkonzentration im Zufluß des Nährmediums durchgeführt. Der Partialdruck des Sauerstoffs in der Gasphase variierte zwischen 21 und 39 kPa. Die Ergebnisse bestätigten die Existenz des maximalen kritischen Partialdrucks des Sauerstoffs in der Gasphase. Es wurde bewiesen, daß der Wert des oberen kritischen P_{O_2} nicht nur die Wachstumsgeschwindigkeit, Biomasse-Ausbeute und Produktivität, sondern auch die Physiologie der Zellenpopulation beeinflusst, was in den Änderungen der Respirationsaktivität und der Aktivität der Alkoholdehydrogenase und Aldehyddehydrogenase zum Vorschein kam.