



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VÝVOJ MINIBIOREAKTORU PRO MIKROBIÁLNÍ BIOTECHNOLOGIE

DEVELOPMENT OF MICROBIOREACTOR FOR MICROBIAL BIOTECHNOLOGY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michaela Jakešová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Jan Krejčí, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1551/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Michaela Jakešová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Jan Krejčí, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vývoj minibioreaktoru pro mikrobiální biotechnologie

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Sestavení mikrobioreaktoru s využitím existující platformy
3. Ověření funkčnosti zařízení
4. Optimalizace pracovních protokolů pro jednotlivé dílčí operace
5. Studium vybrané biotechnologického procesu v připraveném zařízení

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Michaela Jakešová
student(ka)

RNDr. Jan Krejčí, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá vývojem minibioreaktoru pro mikrobiální biotechnologie. Výchozí jednotkou nového zařízení byl systém AlgaTox – analytický fotobioreaktor firmy BVT Technologies. Pracovní objem nového minibioreaktoru se pohybuje v rozmezí 4 až 8 ml. Minibioreaktor byl sestaven z minitermostatu, reakční nádoby, kyslíkové elektrody, teplotní a pH sondy, příslušenství pro přívod vzduchu do kapaliny a vsuvky pro transport kapaliny z/do reaktoru. Byla ověřena funkčnost sestaveného zařízení a proměřeny jeho charakteristiky. Dále byl pro vyvíjené zařízení zpracován operační postup dekontaminačního procesu využitím mlhy peroxidu vodíku. Rovněž byl sestaven operační postup pro kultivace mikroorganismů v minibioreaktoru. V připraveném zařízení byly provedeny pilotní kultivace bakterie *Halomonas halophila*. Při těchto kultivacích byly otestovány tři sestavy pro přívod vzduchu do kapaliny. Žádná ze sestav však nebyla schopna zajistit buněčné kultuře dostatečný přísun kyslíku – hodnota rozpuštěného kyslíku vždy klesla na 0 %. Pro následující vývoj byla navržena nová sestava pro přívod vzduchu do kapaliny – aerační věnec z membránové trubice.

ABSTRACT

This master thesis deals with the development of a minibioreactor for microbial biotechnologies. The AlgaTox system – an analytical photobioreactor from BVT Technologies – was the default unit of the new device. The working volume of the new minibioreactor is in the range of 4 to 8 ml. The minibioreactor was composed of a minithermostat, a reaction vessel, an oxygen electrode, a temperature and pH probe, accessories for the supply of air to the liquid and an insertion for the transport of liquid from / to the reactor. The functionality of the assembled device and its characteristics were measured. Furthermore, an operating procedure for the decontamination process using a hydrogen peroxide mist was developed for the new equipment. An operating procedure for culturing microorganisms in a minibioreactor was also set up. Pilot cultivations of *Halomonas halophila* were demonstrated in the prepared equipment. In these cultivations, three assemblies for air supply to the liquid were tested. However, none of the assemblies was able to provide a sufficient supply of oxygen to cell culture – the dissolved oxygen value always dropped to 0%. For the further development, a new assembly was designed for the supply of air to the liquid - an aeration ring from a membrane tube.

KLÍČOVÁ SLOVA

Minibioreaktor, vývoj, mikrobiální biotechnologie, polyhydroxyalkanoáty, *Halomonas halophila*

KEYWORDS

Minibioreactor, development, microbial biotechnology, polyhydroxyalkanoates, *Halomonas halophila*

JAKEŠOVÁ, Michaela. Vývoj minibioreaktoru pro mikrobiální biotechnologie. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131518>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jan Krejčí.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce RNDr. Janu Krejčímu, Ph.D. za obětavou pomoc a podnětné připomínky, které mi během práce poskytoval. Zejména bych chtěla poděkovat za možnost se již během studia dostat do praxe a významně si tím rozšířit obzory.

Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům firmy BVT Technologies. Děkuji zejména Ing. Radce Kučerové za cenné rady a členům technického oddělení za realizaci úprav vyvíjeného zařízení.

Mé poděkování patří také doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za podporu a cenné rady, které mi pomohly při zpracování předložené práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Xenii Kouřilové za pomoc při práci v laboratoři na půdě FCH VUT.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali během celého mého studia.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Mikrobiální biotechnologie	8
2.1.1	Mikrobiální bioreaktory	8
2.1.2	Minibioreaktory	9
2.2	Analytický fotobioreaktor AlgaTox	10
2.3	Teoretické základy systematického popisu bioreaktorů.....	11
2.3.1	Kompartmentová analýza.....	11
2.3.2	Lineární systémy	12
2.3.3	Nelineární systémy	12
2.3.4	Kompartmentový model funkce bioreaktoru	12
2.4	Polyhydroxyalkanoáty	14
2.4.1	Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů	15
2.4.2	Využití alternativních substrátů pro produkci polyhydroxyalkanoátů	15
2.4.3	Producent polyhydroxyalkanoátů – <i>Halomonas halophila</i>	16
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	18
3.1	Použité přístroje, chemikálie a mikroorganismy	18
3.1.1	Použité přístroje.....	18
3.1.2	Použité chemikálie	18
3.1.3	Použité mikroorganismy	19
3.2	Sestavení minibioreaktoru.....	19
3.2.1	Minitermostat	19
3.2.2	Míchadlo.....	20
3.2.3	Sondy.....	21
3.2.4	Reakční nádoba	22
3.2.5	Příslušenství pro přívod vzduchu do kapaliny	23
3.2.6	Příslušenství pro transport kapaliny z/do reaktoru	23
3.3	Sestava pro dekontaminační proces reakční nádoby pomocí mlhy peroxidu vodíku 23	
3.4	Měření pomocí osmikanálového převodníku pro měření odporových teploměrů a pro amperometrii	25
3.4.1	Kalibrace teplotních čidel.....	25
3.4.2	Funkce „Math channel“	25
3.5	Měření pH, kalibrace elektrody	25
3.6	Ověření chování pH elektrody podle Nernstovy rovnice.....	26
3.7	Stanovení otáček míchadla.....	26

3.8	Stanovení časových konstant	28
3.8.1	Metoda vyhodnocení odezvy	28
3.8.2	Stanovení časové konstanty ustálení teploty	28
3.8.3	Stanovení časové konstanty kyslíkové elektrody	29
3.8.4	Stanovení časové konstanty pH elektrody	29
3.9	Ověření vlivu míchání na odezvu kyslíkové elektrody	29
3.10	Ověření účinnosti sterilizačního procesu	29
3.11	Metody pro stanovení peroxidu vodíku	30
3.11.1	Manganometrická titrace	30
3.11.2	Amperometrie	30
3.12	Studium chování uzavřeného a otevřeného systému	31
3.13	Kultivace bakterie <i>Halomonas halophila</i>	31
3.13.1	Kultivace bakteriálního inokula	31
3.13.2	Kultivace bakterií v produkčním médiu	31
3.13.3	Uchování mikroorganismu <i>Halomonas halophila</i>	32
4	Výsledky a diskuze	33
4.1	Minitermostat	33
4.2	Míchadlo	36
4.3	Kyslíková elektroda	37
4.4	pH elektroda	39
4.5	Dekontaminační proces minibioreaktoru	39
4.5.1	Stanovení zbytkového peroxidu v reakční cele	41
4.5.2	Identifikace nedokonalého vypuzení peroxidu vodíku z reaktoru	43
4.6	Studium chování uzavřeného a otevřeného systému	43
4.7	Operační postup pro kultivace mikroorganismů ve vyvíjeném zařízení	44
4.8	Biotechnologická produkce PHB bakterií <i>Halomonas halophila</i>	45
5	ZÁVĚR	49
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	50
7	SEZNAM OBRÁZKŮ	55
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	57

1 ÚVOD

Bioreaktory jsou nádoby nebo nádrže, v nichž pomocí biologického elementu (např. mikroorganismu či enzymu) dochází k přeměně vstupní suroviny na biochemické produkty. Jsou využívány jak ve výzkumu ke studiu biotechnologických procesů, tak v průmyslu k výrobě hodnotných produktů (pro aplikace v oblastech zemědělství, potravinářství či farmacie) [1]. Efektivita biotechnologického procesu je zajišťována udržováním optimálních podmínek pro zvolený biologický element. Kromě zajištění dostatečného přísunu živin (a v případě aerobních dějů kyslíku) je monitorována např. teplota, pH či buněčná hustota. Práce s biologickými elementy klade vysoké požadavky na dekontaminaci použitého zařízení. Způsob sterilizace reaktorů (nejčastěji tepelný, popř. chemický) omezuje volbu používaných materiálů. [2].

Zatímco průmyslově používané bioreaktory běžně dosahují objemů stovek metrů krychlových (v případě zpracování odpadních vod až desítek tisíc metrů krychlových), laboratorní bioreaktory jsou konstruovány do velikosti 30 dm³ [2]. S rostoucí velikostí bioreaktorů rostou i náklady na prováděnou fermentaci – vyšší spotřeba vstupních surovin. Pro účely studia biotechnologických procesů je tedy vhodnější využívat menší bioreaktory, v nichž je navíc možné lépe sledovat a regulovat parametry ovlivňující biotechnologický proces. Pracovní objem těchto laboratorních bioreaktorů se pohybuje ve stovkách mililitrů až jednotkách litrů [3]. S měnící se velikostí bioreaktorů se mění používané materiály (reakční nádoba skleněná vs kovová), aerační sestava, způsob zajištění teploty či velikost sond [4, 5]. V případě bioreaktorů o pracovních objemech v řádu jednotek až desítek mililitrů není možné upravit velikost sond úměrně změně velikosti bioreaktoru [6]. Sondy tak zabírají v reakční nádobě mnohem větší objem, než je tomu u laboratorních bioreaktorů standardních velikostí. V případě minibioreaktorů tedy představuje vložení sond do reakční nádoby obrovský zásah, který může zásadně ovlivnit podmínky uvnitř reaktoru. Jejich přítomnost může ovlivnit např. teplotu v nádobě či charakter proudění kapaliny.

V současné době není komerčně dostupný žádný bioreaktor pracující v objemech řádově jednotek mililitrů, který by disponoval sondami pro online monitoring biotechnologického procesu. Většina z dostupných zařízení, která by mohla nahradit funkci minibioreaktoru pracuje ve vyšších objemech, a navíc často disponují příslušenstvím na jedno použití, což navyšuje cenu jejich provozu.

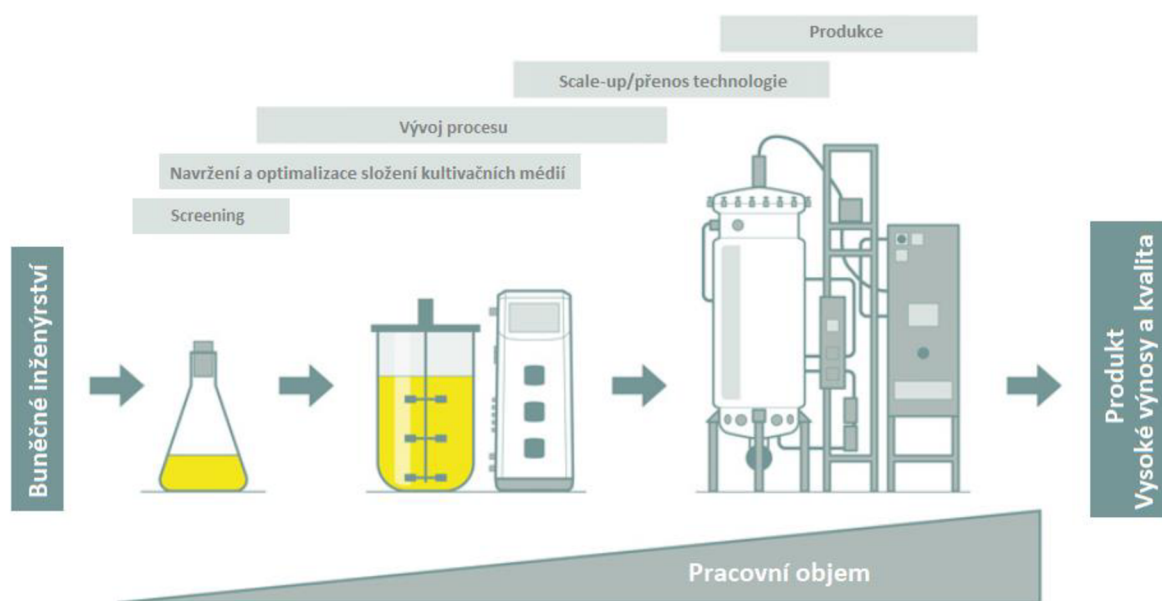
Analytický fotobioreaktor firmy BVT Technologies pracuje v požadovaných objemech a jeví se jako slibná výchozí jednotka pro konstrukci mikrobiálního minibioreaktoru. Cílem této práce je ověřit možnost využití tohoto přístroje pro studium biotechnologických procesů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikrobiální biotechnologie

Tradiční mikrobiální biotechnologie doprovázejí lidstvo již několik tisíc let. Fermentované nápoje datujeme až do raného neolitu – cca 7 000 let př. n. l. Procesy byly řízeny čistě empiricky, až s rozvojem technologií a vědy (mikroskop, elektřina, centrifugy, inkubátory, robotika...) bylo možné se na mikrobiální produkce, resp. procesy mikrobiální produkce cíleně zaměřit. Během posledních třiceti let se biotechnologie intenzivně rozvíjejí a rozšiřují své pole působnosti jak ve farmaceutickém průmyslu, tak i v odvětvích jako zemědělství a ochrana životního prostředí [7, 8].

Zaměřením na mikrobiální produkce byla vytvořena řada metodických postupů pro optimalizaci biotechnologických procesů. Obecně lze biotechnologický proces rozdělit do tří kategorií: up-stream, fermentaci a down-stream. Up-stream má za cíl vybrat vhodný mikroorganismus, kultivační média a optimalizovat průběh procesu. Optimalizace procesu probíhá nejdříve batch – v baňkách (objem řádově desítky mililitrů), poté se přechází na kultivace v bioreaktorech. Začíná se na laboratorních bioreaktorech (objem řádově jednotky litrů), dále mohou následovat čtvrt/poloprovozní bioreaktory (objem řádově desítky/stovky litrů) a teprve po optimalizacích na těchto bioreaktorech může dojít k fermentaci v provozních podmínkách. Schéma procesu je demonstruje Obrázek 1. Po samotné fermentaci následuje down-stream, během nějž je nutno mikrobiální buňky separovat, izolovat z nich produkt a purifikovat jej [9–11].



Obrázek 1 Schéma biotechnologického procesu [10]

2.1.1 Mikrobiální bioreaktory

Mikrobiální bioreaktory jsou klíčovými zařízeními pro kultivaci mikroorganismů za účelem výroby produktů jejich metabolismu nebo vlastní buněčné hmoty. Zaměříme-li se čistě na submerzní reaktory, pak mluvíme o poměrně složitých třífázových systémech (plyn-kapalina-buňky). Konstrukce zařízení pro tyto systémy je poměrně obtížná, jelikož jí předchází náročné matematické modelování. To je ztíženo např. komplikovaným reakčním

mechanismem, existencí inhibičních mechanismů, paměti mikroorganismů či silným vzájemným působením složek na výsledek biochemické reakce [11].

Materiály použité pro výrobu bioreaktoru a jeho příslušenství musí být odolné vůči korozi, aby se zabránilo kontaminaci procesu kovy. Zároveň by však použité materiály měly být netoxické, aby mírné rozpuštění materiálu neinhibovala růst kultury. V případě, že bioreaktor bude sterilizován vysokotlakou parou, musí být vedle výše zmíněných brát zřetel při výběru materiálů i na tuto skutečnost. Použité materiály musí být rovněž odolné při mechanickém namáhání, které může poškodit např. míchací systém bioreaktoru či vstupní otvory. Laboratorní bioreaktory (či jiné bioreaktory menších objemů) je zvykem vyrábět z transparentního materiálu (skla), které umožňuje vizuální kontrolu procesu [12].

Nezbytným vybavením mikrobiálních bioreaktorů jsou kromě míchadla také senzory. Typicky jsou to senzory teploty, pH a rozpuštěného kyslíku. Tyto senzory pro mikrobiální kultivace musí být schopny rozlišit i nepatrné změny v kultivačním médiu. Pokud jsou např. otáčky míchadla regulovány v závislosti na odezvě kyslíkové elektrody, jejíž rozlišovací schopnost je nízká, může dojít k limitaci kyslíkem a nevratným změnám v respiračním systému [11, 13].

2.1.2 Minibioreaktory

Optimalizace biotechnologického procesu postupuje, jak již bylo uvedeno dříve, od kultivace v baňkách přes kultivace v laboratorních bioreaktorech až po kultivace v pilotních reaktorech. Kultivace v baňkách probíhají při objemech řádově (nejčastěji) desítek mililitrů. Baňky bývají zpravidla umístěny v termostatu a v případě submerzních kultivací je pohyb kapaliny zajišťován pohybem celé kultivační nádoby. Pro zajištění stabilního pH slouží pouze pufrovací směs solí v kultivačním médiu. Z tohoto systému se přechází do laboratorních bioreaktorů (s pracovním objemem v řádu jednotek litrů), který (v závislosti na výrobci) disponuje škálou senzorů a možností řídit míchání kultivačního média. V laboratorní praxi tedy chybí krok mezi kultivacemi v baňkách a kultivacemi v řádově větších (automaticky řízených) bioreaktorech. Pro optimalizaci biotechnologických procesů by však zařízení umožňující provádět monitorované nízkoobjemové kultivace bylo ideální volbou. V případě nízkých pořizovacích nákladů těchto „minibioreaktorů“ by bylo možné provádět tyto nízkoobjemové kultivace paralelně, což by opět usnadnilo optimalizaci biotechnologických procesů.

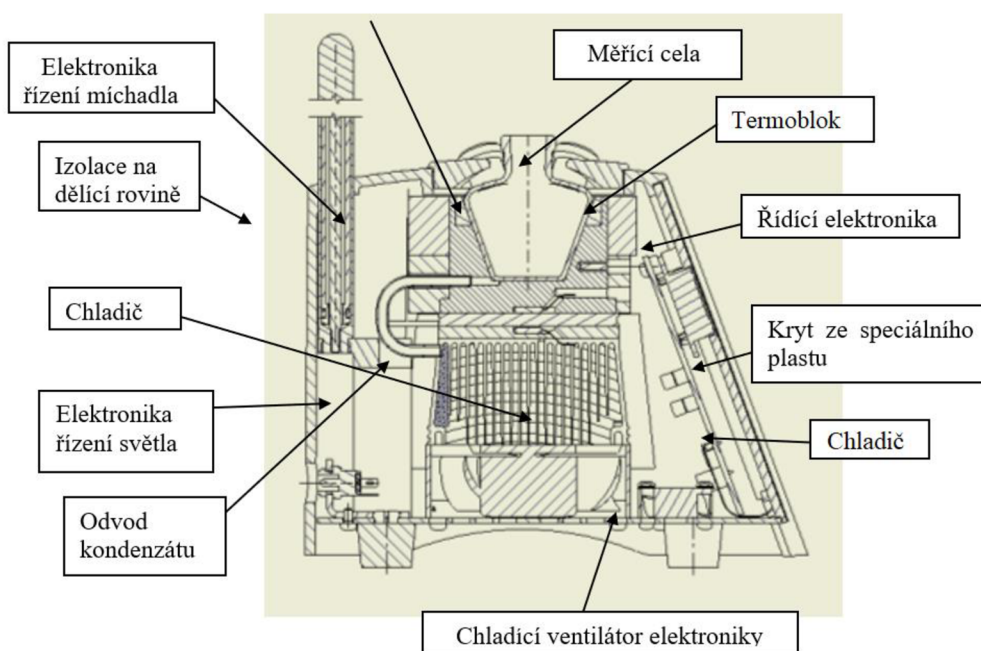
Z cenově dostupnějších systémů (pořizovací náklady do 8 000 euro), které lze na trhu nalézt, nedisponují tato zařízení dostatečným vybavením pro mikrobiální kultivace – jedná se o termostatované systémy bez možnosti měření rozpuštěného kyslíku či pH. Tatož varianta „minibioreaktoru“ doplněná o potřebné senzory výrazně navyšuje pořizovací náklady [14]. Komerčně dostupné jsou i systémy umožňující paralelní kultivace na proměření řady parametrů. Tyto systémy jsou však finančně velmi náročné – cena je srovnatelná s běžnými laboratorními bioreaktory [15, 16]. Ideální volbou (z hlediska objemů) by se mohly jevit bioreaktory CerCell. Jejich pracovní objem je 100 ml. Také je možné monitorovat pH a rozpuštěný kyslík. Senzory jsou ovšem na jedno použití, tudíž jsou nutné opakované investice do materiálu [17].

2.2 Analytický fotobioreaktor AlgaTox

V rámci projektu TA02030179 (Integrovaný systém sledování kontaminace životního prostředí dopravou) vyvinula firma BVT Technologies (Česká republika) ve spolupráci s centrem dopravního výzkumu (CDV) analytický fotobioreaktor (Obrázek 2 a Obrázek 3). Pomocí této jednotky byl prováděn ekotoxikologický test sledující inhibici růstu sladkovodních řas (→ Algae Toxicity meter). Základní jednotkou fotobioreaktoru je minitermostat o rozsahu teplot – 10 až 60 °C [18], do něž se vkládá rozebiratelná reakční nádoba TC6 [19]. Dále je součástí systému kyslíková elektroda (Clarkova elektroda) [20], míchadlo se dvěma nastavci [21] – pro měření s elektrodami a pro měření s tištěným senzorem, zdroj světla, vsuvka pro udržování standardní atmosféry nad hladinou, zátky k uzavření reakční cely. Celkový objem reakční nádoby (reakční cela s hlavicí) je ± 25 ml, přičemž pracovní objem byl volen v rozmezí 3 až 7 ml [22]. Projekt byl zakončen patentem a užitným vzorem [23, 24].



Obrázek 2 Analytický fotobioreaktor AlgaTox, pohled na celou sestavu (vlevo), pohled na rozebiratelnou reakční celu (vpravo) [22]



Obrázek 3 Technické uspořádání přístroje [22]

Zařízení AlgaTox se jeví jako ideální výchozí jednotka pro vývoj minibioreaktoru. Teplotním rozsahem minitermostatu by bylo možné pokrýt potřeby mezofilních i termofilních mikroorganismů. V případě doplnění systému o další sondy (teplotní, pH) by mohla vzniknout univerzální multifunkční jednotka pro studium biotechnologického procesu. Přítomnost několika druhů materiálů (zejména různých plastů) však představuje výzvu z hlediska vývoje dekontaminačního procesu.

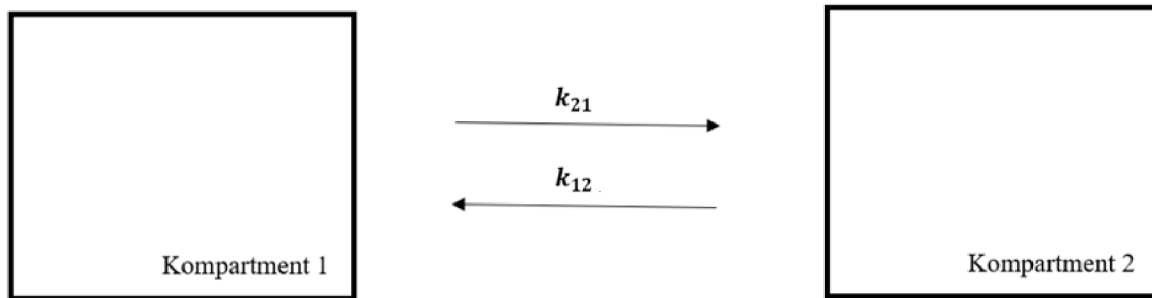
2.3 Teoretické základy systematického popisu bioreaktorů

2.3.1 Kompartmentová analýza

Pro účely lepšího pochopení reálných systémů jsou konstruovány matematické modely. Složité procesy jsou v rámci modelování zjednodušeny – např. integrací více informací do jedné proměnné. Výsledný model pak obsahuje jen několik proměnných. Pomocí správně zpracovaného modelu lze pak dopředu odhadnout chování reálného systému po změně experimentálních podmínek. Pro sestavení takového modelu může být použita kompartmentová analýza [25].

Kompartmentový systém je složen z konečného počtu subsystémů – kompartmentů. Každý Kompartment je považován za homogenní (dokonale promíchaný, rovnoměrně koncentrovaný) a jednotlivé kompartmenty mezi sebou interagují. Jako stavové proměnné vystupují koncentrace nebo látková množství chemických látek. Procesy, které jsou řízeny elektrochemickými hnacími silami a omezeny termodynamickými zákony (chemické reakce, transmembránový transport, vazebné procesy) jsou obvykle charakterizovány diferenciálními rovnicemi prvního řádu [26, 27].

Graficky se kompartmenty prezentují jako rámečky či kvádry. Interakce mezi jednotlivými kompartmenty jsou naznačovány šipkami. Indexování proměnných v kompartmentové analýze demonstruje Obrázek 4.



Obrázek 4 Kompartimentová analýza – indexování proměnných

2.3.2 Lineární systémy

Každý systém lineární systém splňuje podmínky aditivity a homogenity [28]. Je-li výstup $Y_i(n)$ vyvolán vstupem $X_i(n)$, pak dle podmínky aditivity musí platit:

$$X_i(n) + X_{i+1}(n) = Y_i(n) + Y_{i+1}(n). \quad (1)$$

Zavedeme-li konstantu α , pak může být homogenita definována jako:

$$\alpha \cdot X_i(n) = \alpha \cdot Y_i(n). \quad (2)$$

Spojením rovnic (1) a (2) získáváme obecnou rovnici linearity:

$$\sum_i \alpha \cdot X_i(n) = \sum_i \alpha \cdot Y_i(n). \quad (3)$$

Výhodou lineárních systémů je jejich snazší matematický popis. Jedná se o diferenciální rovnice prvního řádu obvykle odvozené z hlediska koncentrací nebo celkového množství molekul v každém kompartmentu [26]

2.3.3 Nelineární systémy

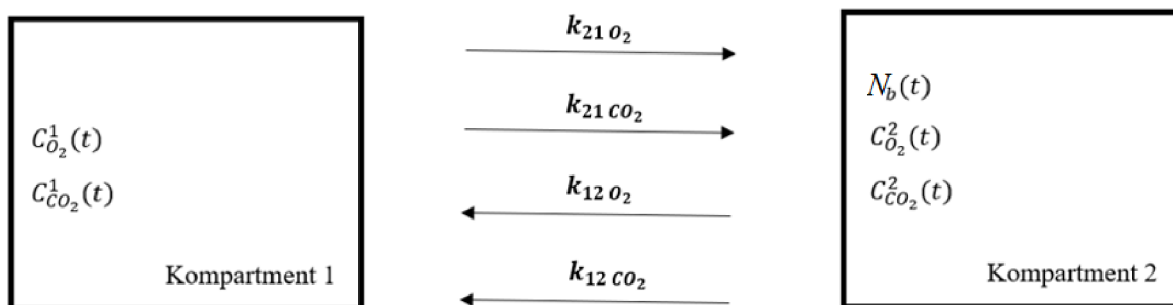
Nelineární systémy tvoří doplněk k lineárním systémům v množině všech systémů. Modely nelineárních systémů jsou náročnější jak na matematické sestavení (nevystačíme si pouze s ODR – obyčejnými diferenciálními rovnicemi jako u lineárních systémů), tak na otestování modelu a interpretaci naměřených výsledků. Nežádá se stává, že předem vytvořené představy o očekávaném průběhu reakce vedou k nechtěnému zamaskování skutečného chování systému. Další častou chybou je, že se nelineární systémy testují modely předpokládající linearitu systému, což vede k získání chybných výsledků [29].

2.3.4 Kompartimentový model funkce bioreaktoru

Pro bioreaktor byly vypracovány dva dvoukompartimentové modely. Prvním kompartmentem je oblast v reaktoru nad kapalinou, druhým kompartmentem je kapalina v reaktoru (s rozpuštěnými živinami a rozsuspendovanými buňkami mikroorganismu). Jeden model sleduje uzavřený systém, druhý model otevřený systém.

2.3.4.1 Uzavřený systém

V rámci uzavřeného systému jsou sledovány výhradně interakce mezi kompartmentem 1 a 2. Vnější prostředí do systému nijak nezasahuje. Graficky je uzavřený systém charakterizován na Obrázku 5.



Obrázek 5 Kompartimentový model funkce bioreaktoru – uzavřený systém

Význam parametrů popisující kompartimentový model na Obrázku 5:

$N_b(t)$	počet bakterií, které jsou sledovány
$C_{O_2}^1(t)$	koncentrace kyslíku v kompartimentu 1
$C_{CO_2}^1(t)$	koncentrace oxidu uhličitého v kompartimentu 1
$C_{O_2}^2(t)$	koncentrace kyslíku v kompartimentu 2
$C_{CO_2}^2(t)$	koncentrace oxidu uhličitého v kompartimentu 2
$k_{12} O_2; k_{21} O_2$	rychlostní konstanty pro přestup kyslíku
$k_{12} CO_2; k_{21} CO_2$	rychlostní konstanty pro přestup oxidu uhličitého

Tok kyslíku mezi kompartimenty 1 a 2 zobrazených na Obrázku 5 popisují rovnice (4) a (5). Parametr $n_{O_2}(t)$ popisuje látkové množství spotřebovaného kyslíku bakteriemi.

$$\frac{dC_{O_2}^1(t)}{dt} = -k_{21} O_2 \cdot C_{O_2}^1(t) + k_{12} O_2 C_{O_2}^2(t) \quad (4)$$

$$\frac{dC_{O_2}^2(t)}{dt} = k_{21} O_2 \cdot C_{O_2}^1(t) - k_{12} O_2 C_{O_2}^2(t) - n_{O_2}(t) \quad (5)$$

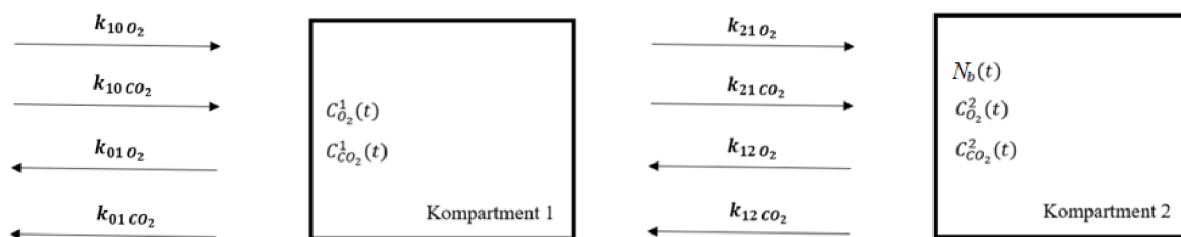
Tok oxidu uhličitého mezi kompartimenty 1 a 2 zobrazených v Obrázku 5 popisují rovnice (6) a (7). Parametr $n_{CO_2}(t)$ popisuje látkové množství vyprodukovaného oxidu uhličitého bakteriemi.

$$\frac{dC_{CO_2}^1(t)}{dt} = -k_{21} CO_2 C_{CO_2}^1(t) + k_{12} CO_2 \cdot C_{CO_2}^2(t) \quad (6)$$

$$\frac{dC_{CO_2}^2(t)}{dt} = +k_{21} CO_2 \cdot C_{CO_2}^1(t) - k_{12} CO_2 C_{CO_2}^2(t) + n_{CO_2}(t) \quad (7)$$

2.3.4.2 Otevřený systém

V modelu otevřeného systému je již zohledňován vliv okolního prostředí na reaktor – konkrétně výměna plynů mezi reaktorem a okolním prostředím. Graficky je otevřený systém charakterizován na Obrázku 6.



Obrázek 6 Kompartimentový model funkce bioreaktoru – otevřený systém

Tok kyslíku mezi kompartmenty 1 a 2 zobrazených v Obrázku 6 popisují rovnice (8) a (9). Parametr $C_{O_2}^0(t)$ popisuje koncentraci kyslíku přicházejícího do systému z vnějšího prostředí, rychlostní konstanta toku kyslíku z vnějšího prostředí do kompartmentu 1 je označena jako $k_{01 O_2}$.

$$\frac{dC_{O_2}^1(t)}{dt} = -k_{21 O_2} \cdot C_{O_2}^1(t) + k_{12 O_2} C_{O_2}^2(t) + k_{10 O_2} \cdot C_{O_2}^0(t) - k_{01 O_2} \cdot C_{O_2}^1(t) \quad (8)$$

$$\frac{dC_{O_2}^2(t)}{dt} = k_{21 O_2} \cdot C_{O_2}^1(t) - k_{12 O_2} C_{O_2}^2(t) - n_{O_2}(t) \quad (9)$$

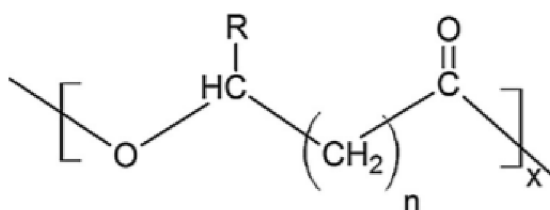
Tok oxidu uhličitého mezi kompartmenty 1 a 2 zobrazených v Obrázku 6 popisují rovnice (10) a (11). Parametr $C_{CO_2}^0(t)$ popisuje koncentraci oxidu uhličitého přicházejícího do systému z vnějšího prostředí, rychlostní konstanta toku oxidu uhličitého z vnějšího prostředí do kompartmentu 1 je označena jako $k_{01 CO_2}$.

$$\frac{dC_{CO_2}^1(t)}{dt} = -k_{21 CO_2} C_{CO_2}^1(t) + k_{12 CO_2} \cdot C_{CO_2}^2(t) + k_{10 CO_2} \cdot C_{CO_2}^0(t) - k_{01 CO_2} \cdot C_{CO_2}^1(t) \quad (10)$$

$$\frac{dC_{CO_2}^2(t)}{dt} = +k_{21 CO_2} \cdot C_{CO_2}^1(t) - k_{12 CO_2} C_{CO_2}^2(t) + n_{CO_2}(t) \quad (11)$$

2.4 Polyhydroxyalkanoáty

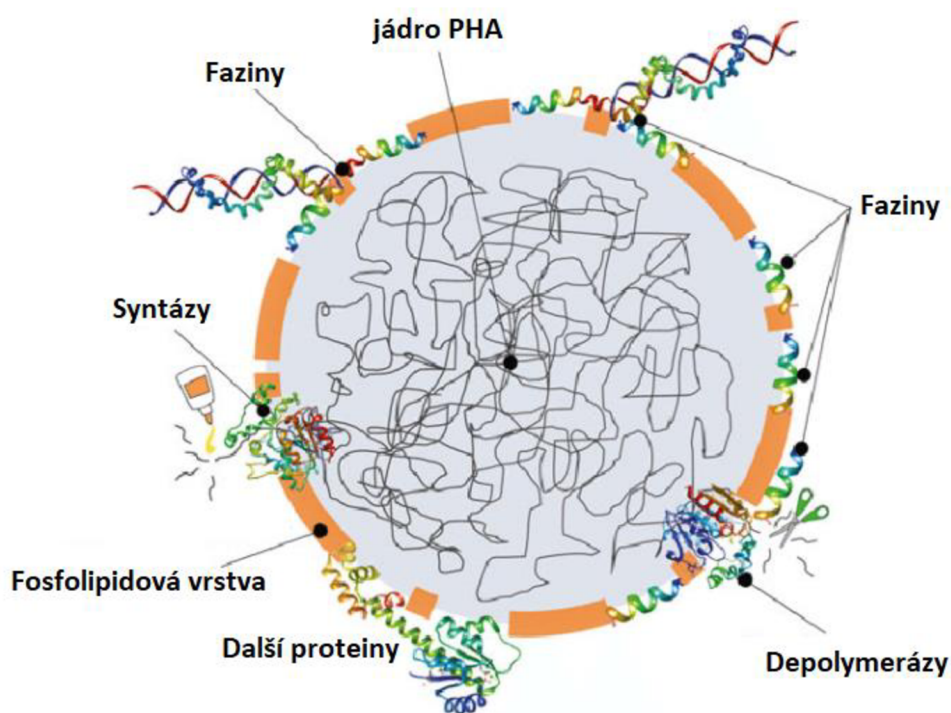
Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery (hydroxyalkanových kyselin) syntetizované některými gramnegativními a grampozitivními bakteriemi. Bakterie tento materiál akumulují intracelulárně ve formě granulí a využívají jej jako rezervní zdroj uhlíku. Velký zájem o tyto přírodní plasty byl podnícen faktem, že se jedná o biodegradabilní a biokompatibilní materiály. Základní strukturu polyhydroxyalkanoátů zobrazuje Obrázek 7. Minimální délka monomerní jednotky jsou tři uhlíky. Podle počtu atomů uhlíku v monomerní jednotce rozdělujeme PHA do tří skupin – s krátkým řetězcem (scl-PHA; 3–5 atomů uhlíku), se středně dlouhým řetězcem (mcl-PHA; 6–14 atomů uhlíku) a s dlouhým řetězcem (lcl-PHA; více než 14 atomů uhlíku) [30–32].



Obrázek 7 Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů [32]

2.4.1 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů

Jak již bylo uvedeno výše, PHA je syntetizována intracelulárně ve formě granulí, které jsou obalené vrstvou fosfolipidů a na ní lze nalézt PHA-polimerázu, PHA-depolymerázu, faziny PhaI a PhaF a řadu dalších proteinů (Obrázek 8). Syntéza těchto „plastových granulí“ probíhá pouze za určitých podmínek – v nadbytku uhlíku (často cukry či mastné kyseliny) a sníženým množství dusíku či jiných důležitých nutrientů (fosforečnany). Zásadní roli při syntéze PHA hraje enzym PHA-syntáza (kódován genem phaC). Polyesterové syntázy rozdělujeme do čtyř tříd – odlišují se svými podjednotkami, aminokyselinovým složením a odlišnou substrátovou specifitou, ale topologie všech PHA-syntáz ze všech tříd je velmi podobná. Vedle PHA-syntázy se syntézy polyhydroxyalkanoátů účastní i další enzymy. Pro každou skupinu PHA (dle délky řetězce) se však syntézy účastní jiné enzymy kódovány jinými geny. Vzhledem k tomu, že jeden mikroorganismus je schopen produkovat podle dodaného prekursoru různé polyhydroxyalkanoáty, je nutné tuto biosyntetickou dráhu znát, aby bylo možné danou biotechnologickou produkci cíleně optimalizovat [32–35].



Obrázek 8 Struktura granule PHA [36]

2.4.2 Využití alternativních substrátů pro produkci polyhydroxyalkanoátů

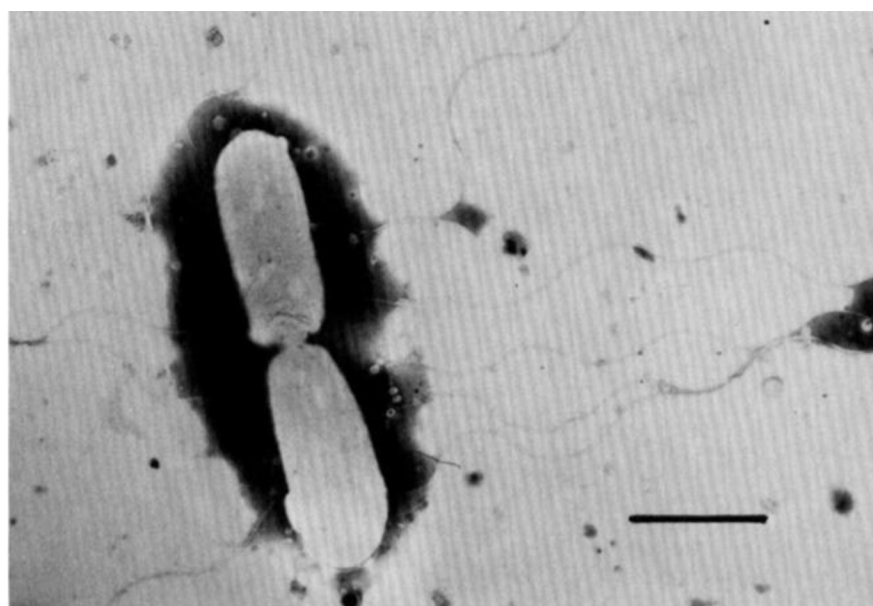
V širokém spektru polyhydroxyalkanoátů lze nalézt materiály rozličných vlastností – např. krystalický a křehký polymer poly(3-hydroxybutyrát) nebo elastický kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát). Tyto mikrobiálně produkované bioplasty se svými vlastnostmi podobají materiálům pocházejícím z petrochemického průmyslu. V důsledku celosvětového trendu ubírat se „zelenou cestou“ vzbuzují PHA vysoký zájem. Komerčnímu využívání těchto přírodních plastů však brání jejich vysoká cena. Na výsledné ceně se v konečném důsledku podílejí nejvíce cena uhlíkového zdroje a náklady na izolaci PHA

z mikrobiálních buněk. Pro snižování nákladů na používaný substrát se začaly používat odpadové materiály z různých průmyslových odvětví. Zatímco cena PHA za využití čistých látek (cukrů či olejů) jako uhlíkového zdroje je cca třikrát až patnáctkrát vyšší než syntetické plasty, v případě využití odpadových materiálů byla výsledná cena PHA srovnatelná s cenou syntetických plastů [32, 37, 38].

Na rozdíl od kultivací využívající čisté látky (např. cukry) jsou však odpadové materiály komplexními směsmi látek. Další složky přítomné v médiu mohou ovlivnit jak průběh samotné kultivace, tak složení produktu [39, 40]. Využití alternativního uhlíkového zdroje tedy klade vyšší nároky na up-stream procesu, a tedy i vyšší nároky na využívající zařízení.

2.4.3 Producent polyhydroxyalkanoátů – *Halomonas halophila*

Halomonas halophila (dříve *Deleya halophila*) je gramnegativní striktně aerobní PHA produkující bakterie (Obrázek 9). První zmínka o této bakterii pochází z roku 1984, kdy byly provedeny první fenotypové testy vzorků izolovaných poblíž Alicante v jihovýchodním Španělsku. Po charakterizaci izolované bakterie byla kultura uložena do Československé sbírky mikroorganismů v Brně jako kmen CCM 3662 [41, 42].



Obrázek 9 Snímek z elektronového mikroskopu *Halomonas halophila* [41]

Ačkoli na rozdíl od řady jiných halofilů nevyžaduje tato bakterie drahé komplexní složky produkčních médií, dokáže akumulovat ve svých buňkách velké množství poly(3-hydroxybutyrátu) – až 82 % suché hmotnosti buněk. Zajímavý je vliv salinity na produkci polymeru. Různé koncentrace chloridu sodného ovlivňují nejen výtěžky biomasy a polymeru, ale i jeho vlastnosti – molekulovou hmotnost, tepelnou stabilitu či krystalinitu. Při studiu vlivu salinity na produkci P(3HB) (poly(3-hydroxybutyrátu)) bakterií *Halomonas halophila* byly zaznamenány nejvyšší výtěžky biomasy při koncentraci NaCl v produkčním médiu $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, zatímco nejvyšší výtěžky P(3HB) při koncentraci NaCl $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Se vzrůstající salinitou roztoku rostla také molekulová hmotnost polymeru – při koncentraci NaCl $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ byla molekulová hmotnost o více jak 70 % vyšší než při koncentraci soli $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Naopak tepelná stabilita vyprodukovaného polymeru se vrůstající salinitou produkčního média klesala [42].

Halofilní bakterie jsou ideální volbou při testování nově vyvíjených zařízení. V průběhu vývoje není možné stoprocentně zajistit sterilitu požívaných komponent. Vysoké koncentrace solí (desítky gramů na litr) vyvolávají u mezofilních mikroorganismů hyperosmotický stres, který vyvolává smršťování buněk (ztráta vody). Kontaminující mikroorganismy se musejí na nové prostředí adaptovat, jejich přítomnost má tak na kultivaci halofilní kultury zanedbatelný vliv [43].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje, chemikálie a mikroorganismy

3.1.1 Použité přístroje

- Minitermostat (BVT Technologies, Česká republika)
- Minitermostat s externím řízením (BVT Technologies, Česká republika)
- Míchadlo ST1 (BVT Technologies, Česká republika)
- Řídící jednotka míchadla ST1 (BVT Technologies, Česká republika)
- Interní míchadlo (BVT Technologies, Česká republika)
- Kyslíková elektroda OE.D.ES (BVT Technologies, Česká republika)
- Teplotní sonda (BVT Technologies, Česká republika)
- pH sonda (BVT Technologies, Česká republika)
- Referentní elektroda kónická RCEc.R (BVT Technologies, Česká republika)
- Potenciostat PalmSens 3, (PalmSens, Nizozemsko)
- Potenciostat EmStat 2 Blue (PalmSens, Nizozemsko)
- Osmikanálový převodník pro měření odporových teploměrů a pro amperometrii založený na jednotce PicoLog (EGMedical, Česká republika)
- Stabilizovaný zdroj (Tesla, Československo)
- Digitální multimetr DT-830 D+ (BEN Electronic)
- Multimetr MPH 471 (Monokrystaly, Česká republika)
- Akvariijní pumpa Air 2000-1 (UnionStar, Česká republika)
- Membránová vývěva N86KN.18 (KNF, Francie)
- Kompresorový inhalátor NE2013 (LAICA, Itálie)
- Vodní lázeň Precisidig (Buch & Holm, Dánsko)
- Autokláv PS 20A, (Chirana, Československo)
- Diferenciální elektrometr (PalmSens, Nizozemsko)
- Centrifuga M415, (Chirana, Československo)
- Laminární box Fatran L-F (Pokrok, Slovenská republika)
- Očkovací box Aura Mini (BioAir, Itálie)
- Rotamixer T, (Hook & Tucker Instruments, Velká Británie)
- Váhy laboratorní DL-501 (Denver instrument, Spojené státy americké)
- Váhy analytické R160 P (Sartorius, Německo)
- Magnetická míchačka IKA color squid (IKA, Německo)
- Třepačka OS 5 control (IKA, Německo)
- Termostatovaná skříň TS 606CZ/2-Var (WTW, Rakousko)
- Orbitální třepačka s inkubací ES-20 (Biosan, Lotyšsko)
- Horkovzdušný sterilizátor (Chirana, Československo)

3.1.2 Použité chemikálie

- Agar Powder, bakteriologický (HiMedia, Indie)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (PENTA, Česká republika)
- Dodekahydrát fosforečnanu sodného (Lach-Ner, Česká republika)

- Heptahydrát síranu hořečnatého (PENTA, Česká republika)
- Ethanol (PENTA, Česká republika)
- Glukóza bezvodá (PENTA, Česká republika)
- Glycerol, bezvodý (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydroxid sodný (PENTA, Česká republika)
- Chlorid draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid sodný (Merck, Německo)
- Kalibrační koncentráty pro výrobu kalibračního roztoku (pH: 4,01; 7,00; 10,01), (Greisinger, Německo)
- Kyselina dusičná (PENTA, Česká republika)
- Kyselina sírová (PENTA, Česká republika)
- Kyselina šťavelová (PENTA, Česká republika)
- Manganistan draselný (PENTA, Česká republika)
- Nutrient Broth (HiMedia, Indie)
- Pepton, bakteriologický (HiMedia, Indie)
- Peroxid vodíku 35% (Brenntag, Německo)
- Síran amonný (Lach-Ner, Česká republika)
- Siřičitan sodný (PENTA, Česká republika)
- Tween 20 (Merck, Německo)
- Yeast extract (HiMedia, Indie)

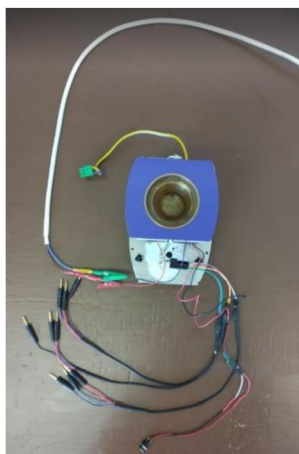
3.1.3 Použité mikroorganismy

Funkčnost vyvíjeného zařízení byla testována za využití bakterie *Halomonas halophila* (CCM 3662) z České sbírky mikroorganismů, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika.

3.2 Sestavení minibioreaktoru

3.2.1 Minitermostat

Základní jednotkou minibioreaktoru je minitermostat zajišťující stabilní teplotu v reakční nádobě. Byly testovány dva minitermostaty. Jeden ze systému AlgaTox (s nižším teplotním rozsahem a s řídicí elektronikou), druhý s širším teplotním rozsahem (bez řídicí elektroniky – Obrázek 10). Řízení druhého minitermostatu bylo zajištěno stabilizovaným zdrojem a osmikanálovým převodníkem pro měření odporových teploměrů a pro amperometrii. Přesná hodnota vkládaného napětí byla řízena digitálním multimetrem.



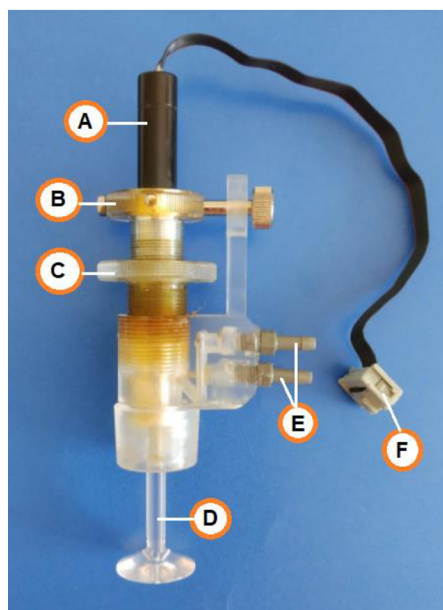
Obrázek 10 Minitermostat bez řídicí elektroniky se širším teplotním rozsahem

3.2.2 Míchadlo

Stejně jako v případě minitermostatů, tak i míchadla byla testována dvě. První bylo ze systému AlgaTox – míchadlo ST1 (Obrázek 11). Míchadlo ST1 bylo řízeno PWM (pulse width modulation) modulem. Dále bylo použito interní míchadlo BVT Technologies s přesným nastavením hydrodynamiky míchání a možností programového řízení otáček (Obrázek 12). Nové míchadlo obsahuje dva vstupy pro přívod plynů (Obrázek 13). Pomocí diferenciálního šroubu je možné přesně nastavit polohu míchadla k sondám (důležité zejména pro kyslíkovou elektrodu). Míchadlo je řízeno přes PC programem Risot (BVT Technologies).



Obrázek 11 Míchadlo ST1 (ze sestavy AlgaTox)



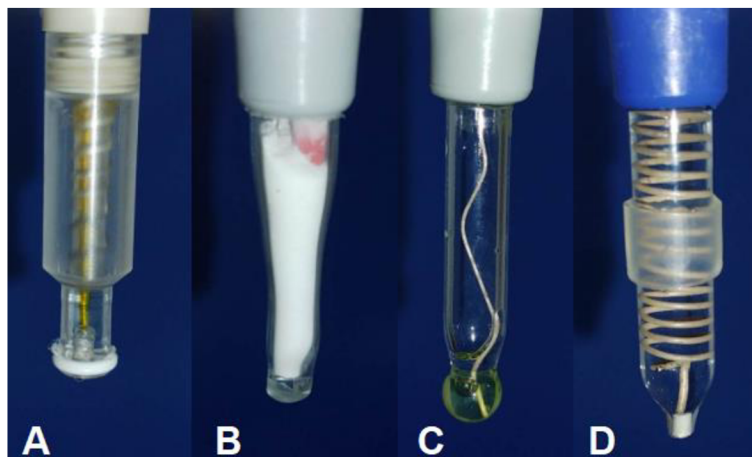
Obrázek 12 Interní míchadlo BVT Technologies (A – motor, B – hrubé nastavení polohy míchadla, C – jemné nastavení polohy míchadla, D – nástavec míchadla, E – vstupy pro přívod plynů do míchadla, F – připojení ke zdroji)



Obrázek 13 Detailní pohled na vstupy pro přívod plynů – interní míchadlo BVT Technologies

3.2.3 Sondy

Do bioreaktoru byly vloženy čtyři sondy: kyslíková elektroda, teplotní sonda, pH elektroda a referentní elektroda pro pH elektrodu (Obrázek 14). pH elektroda byla na zakázku vyrobena firmou Monokrystaly, zbylé sondy jsou výrobky firmy BVT Technologies.



Obrázek 14 Detailní pohled na použité sondy (A – kyslíková elektroda, B – teplotní sonda, C – pH elektroda, D – referentní elektroda)

Charakterizace sond:

i. Kyslíková elektroda OE.D.ES (BVT Technologies, Česká republika)

Sonda Clarkova typu, komerčně dostupný produkt

- Pracovní elektroda: platinový drátek zatavený ve skle
- Referentní elektroda: stříbrný drátek
- Držák s elektrolytem (1 mol/l KCl)
- Membrána propustná pro O₂ (teflon)
- Potenciál pro redukci kyslíku –650 mV

ii. Teplotní sonda (BVT Technologies, Česká republika)

Nový produkt

- Niklové čidlo 6180 ($R = 5\,000\ \Omega$) firmy Harlingen (Česká republika) bylo společně s práškovým Al₂O₃ zataveno ve skleněném těle
- Třída čidla: A (pro rozsah teplot 0 až 200 °C platí vztah $\Delta T [^\circ\text{C}] = \pm (0,2 + 0,0035 |t|)$) [44]

iii. pH elektroda (BVT Technologies, Česká republika)

- Komerčně dostupný produkt
- Uchovávací roztok: 3 mol/l KCl

iv. Referentní elektroda RCEc.R1 (BVT Technologies, Česká republika)

Komerčně dostupný produkt

- Skleněné tělo zakončené fritou
- Stříbrný drátek
- Plněna elektrolytem 1 mol/l KCl (otvor pro plnění je kryt gumičkou)

3.2.4 Reakční nádoba

Reakční nádoba (TC6) byla použita ze systému Algotox – skleněná cela s plastovou hlavicí. Vzhledem k počtu sond a dalšího příslušenství bylo nutné do hlavice vyvrtat další otvory a zvětšit středový otvor.

3.2.5 Příslušenství pro přívod vzduchu do kapaliny

Pro přívod vzduchu do kapaliny byly vyrobeny tři varianty – zátka s kanylou zasahující pod hladinu kapaliny, aerační věnec se čtyřmi otvory, zátka se sedmnácti úzkými kanylami (Obrázek 15).



Obrázek 15 Příslušenství pro přívod vzduchu do kapaliny

3.2.6 Příslušenství pro transport kapaliny z/do reaktoru

Pro účely sterilního přívodu/odběru kapaliny do/z reaktoru byla vyrobena zátka se septem (Obrázek 16), přes kterou je možné pomocí sterilní jehly a stříkačky manipulovat s kapalinou.

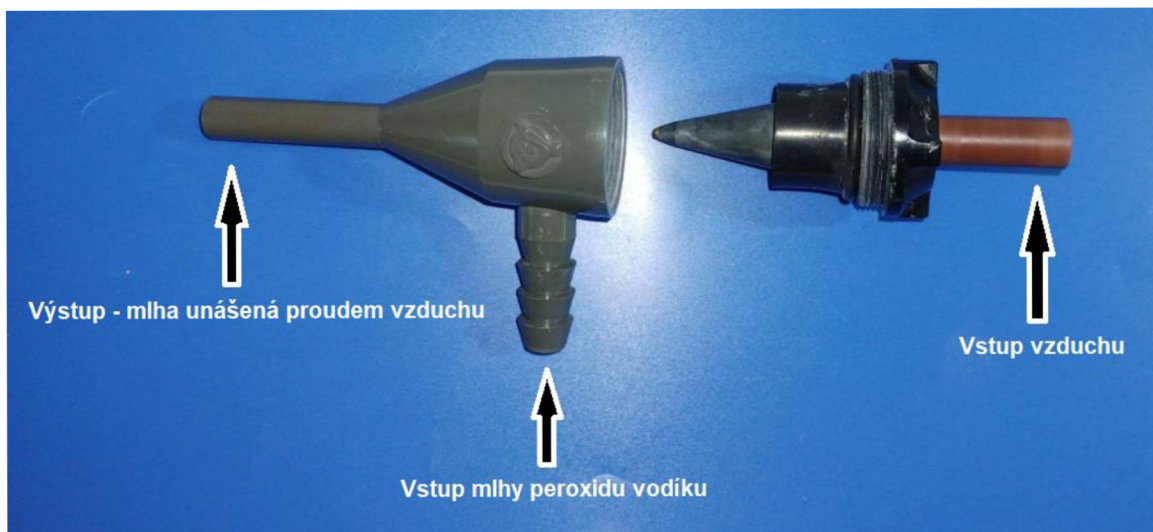


Obrázek 16 Zátka pro transport kapaliny z/do bioreaktoru

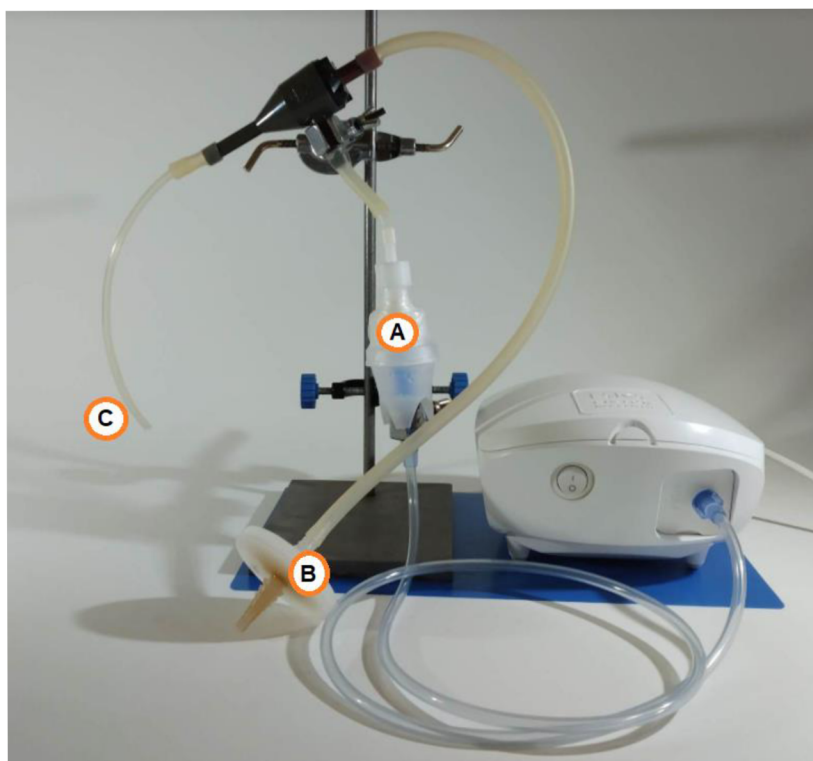
3.3 Sestava pro dekontaminační proces reakční nádoby pomocí mlhy peroxidu vodíku

První experimenty sterilizace vyvíjeného zařízení byly provedeny horkou parou v autoklávu. Tento způsob sterilizace klade vysoké požadavky na teplotní odolnost a chemickou stabilitu použitých materiálů. Splnění těchto požadavků nelze u některých dílů zajistit – např. motor či plexisklová krytka kyslíkové elektrody. Pro vyvíjené zařízení bylo tedy nutné vypracovat dekontaminační proces, který bude vhodný pro všechny použité díly a materiály. *Poznámka: mezi dekontaminační techniky jsou obecně řazeny procesy čištění, desinfekce a sterilizace* [45]. V rámci vyvinutého dekontaminačního procesu je nejdříve reakční nádoba vyčištěna (Tween, kyselina dusičná), následně je do reakční nádoby aplikován peroxid vodíku ve formě aerosolu [46–49]. Optimalizací ultrazvukové nebulizace lze dosáhnout kapiček o velikosti desítek nanometrů [50]. V předložené diplomové práci byla použita jednodušší tlaková nebulizace umožňující dosáhnout průměru kapiček cca 1 μm . Mlha peroxidu vodíku je generována kompresorovým inhalátorem o nebulizačním výkonu 0,35 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Pro převedení mlhy peroxidu do proudu vzduchu byla jako mezikus použita vodní vývěva (Obrázek 17) V místě

napojení trysky, již je vháněn vzduch, vzniká podtlak, který způsobuje nasávání aerosolu peroxidu vodíku. Koncentraci aerosolu (tj. počet kapek na cm^3) lze řídit průtokem vzduchu a průtokem vzduchu do nebulizační jednotky. Pohled na celou sestavu pro sterilizaci reakční cely zobrazuje Obrázek 18.



Obrázek 17 Vodní vývěva – zdroj vzduchu obohaceného o mlhu peroxidu vodíku



Obrázek 18 Sestava pro sterilizaci minibioreaktoru mlhou peroxidu vodíku (A – generátor mlhy peroxidu vodíku, B – vstup pro vzduch do vývěvy, C – výstup z vývěvy – mlha peroxidu vodíku unášena v proudu vzduchu)

3.4 Měření pomocí osmikanálového převodníku pro měření odporových teploměrů a pro amperometrii

Teplotní sonda a kyslíková elektroda byly při (většině) měřeních zapojeny do osmikanálového převodníku (EGMedical pro BVT Technologies, Česká republika). Nastavený potenciál pro kyslíkovou elektrodu: -650 mV.

Standardní blok minitermostatu byl připojen k externímu stabilizovanému zdroji. Teplota byla řízena změnou napětí. Vzhledem k tomu, že Peltierův článek pracuje jako „teplé čerpadlo“, vztahovala se vždy teplota měděného termostatovaného bloku (pro reakční nádobu) k laboratorní teplotě.

3.4.1 Kalibrace teplotních čidel

Při měřeních s externě řízeným minitermostatem je používáno celkem pět teplotních čidel (Ni 6180, třída A). Vstupní parametry každého čidla se však liší \Rightarrow každé čidlo při stejné teplotě naměří odlišnou hodnotu \Rightarrow nutná kalibrace (výchozí hodnota musí být u každého čidla stejná). Teplotní čidla byla kalibrována na interní etalon – rtuťový teploměr.

Postup

Do reakční nádoby bylo napipetováno 10 ml destilované vody, do níž byla zasunuta teplotní sonda a rtuťový teploměr. Minitermostat byl odpojen od zdroje napětí a celá sestava byla temperována 12 h při laboratorní teplotě. Po 12 h byly změřeny odezvy pro všechna teplotní čidla.

3.4.2 Funkce „Math channel“

Odezvy všech sond zapojených v osmikanálovém převodníku jsou uváděny ve voltech (napětí). Pomocí převodníkových tabulek a vzorců (definovaných výrobcem) je možné tuto hodnotu převést na ampéry (v případě kyslíkové elektrody) či na ohmy (v případě teplotních čidel). Pro praktické používání přístroje jsou praktičtější veličiny: množství rozpuštěného kyslíku [%] a teplota [$^{\circ}\text{C}$]. Pro tyto účely byla v softwaru využita funkce „Math channel“. Pro každé čidlo byl sestaven vzorec, který přepočítal naměřené napětí na teplotu či DO – dissolved oxygen.

3.5 Měření pH, kalibrace elektrody

pH bylo měřeno novým multimetrem firmy Monokrystaly (Obrázek 19). pH sonda byla zapojena do konektorů SENSE, referentní elektroda do konektoru REF. Sondy byly zasunuty do reakční nádoby. Kalibrace pH sondy byla prováděna dvoubodově. První bod kalibrace byla hodnota blízká hodnotě očekávané (pufr 7,00), druhý pufr byl o vyšší hodnotě pH (10,01) – postup doporučený výrobcem sondy. Po aplikaci 5 ml pufru o pH 7,00 byla po ustálení odezvy uloženo naměřené napětí ve funkci *Calibrate*. Reakční cela byla důkladně promyta destilovanou vodou a obdobně byla provedena kalibrace s druhým pufrům.



Obrázek 19 Multimetr MPH471 (Monokrystaly)

3.6 Ověření chování pH elektrody podle Nernstovy rovnice

Pro ověření, zda se pH elektroda chová podle Nernstovy rovnice byl měřen potenciál elektrody v pufrch. Do reakční nádoby bylo napipetováno 10 ml pufru (pH 4,01; 10,01). pH elektroda a referentní elektroda byly zasunuty do hlavice reakční nádoby. Teplota v nádobě byla udržována na 25 °C. Měření bylo provedeno pomocí potenciostatu PalmSens 3 a diferenciálního elektrometru.

3.7 Stanovení otáček míchadla

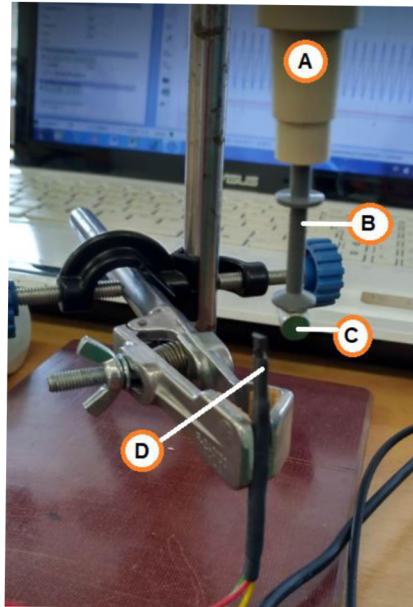
Pro míchadlo ST1 byla vyrobena řídicí jednotka (Obrázek 20), na níž je možné nastavit hodnoty v rozmezí 0–100 %. Kalibrace sestavy míchadlo–řízení míchadla byla provedena pomocí Hallovy sondy (Obrázek 21).



Obrázek 20 Řídicí jednotka míchadla ST1

Postup

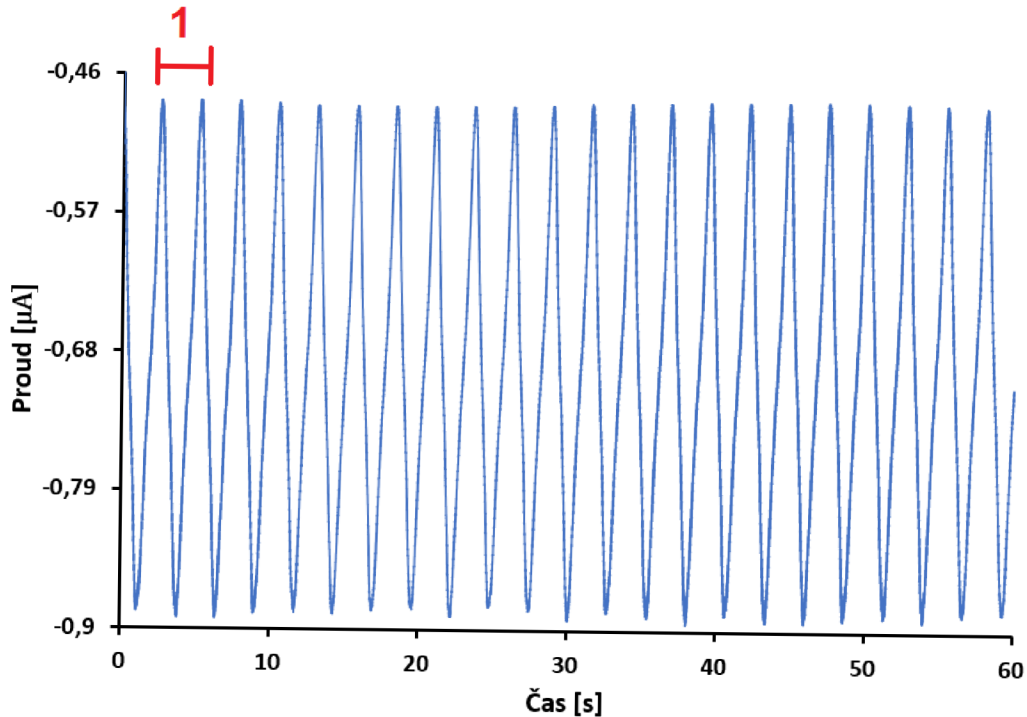
Do těla míchadla byl zasazen nástavec pro kalibrace. K nastavci míchadla byl přichycen magnet. Hallova sonda byla připojena ke zdroji napětí 5 V (poznámka: metoda měření je součástí interních metod BVT Technologies). Pomocí potenciostatu EmStat 2 Blue byla měřena změna proudu v čase – chronoamperometrie. Řízení otáček míchadla bylo proměřeno v rozmezí 20–60 % (při nižších hodnotách se míchadlo netočí, při vyšších by se mohlo poškodit).



Obrázek 21 Sestava pro stanovení otáček míchadla (A – tělo míchadla ST1, B – nástavec míchadla pro kalibrace, C – magnet, D – Hallova sonda)

Metoda vyhodnocení kalibrace míchadla

Spolu s míchadlem se v průběhu měření otáčel i magnet přichycený na nástavci míchadla. Přiblížení pólu magnetu k Hallově sondě se projeví naměřením amplitudy. Mezi každými dvěma amplitudami (v jednom směru) se tedy míchadlo otočilo o jednu otáčku (Obrázek 22). Počet otáček za minutu je tedy počet amplitud mínus jedna.



Obrázek 22 Metoda vyhodnocení kalibrace míchadla

3.8 Stanovení časových konstant

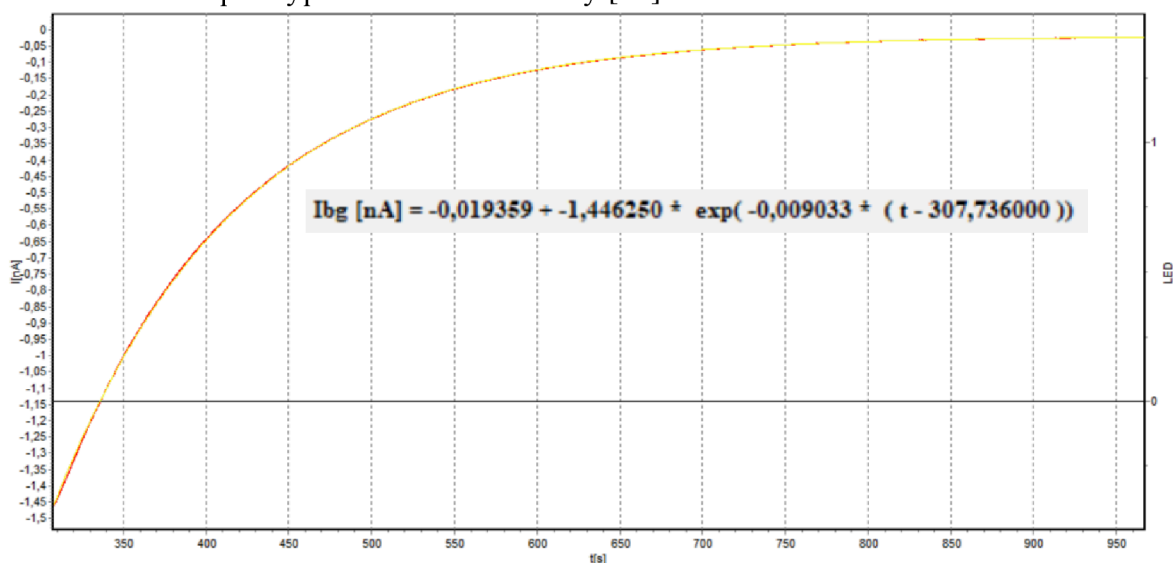
Při skokové změně teploty, koncentrace kyslíku, hodnoty pH lze naměřenou odezvu popsat rovnicí:

$$y = A + B \cdot e^{C \cdot t}. \quad (12)$$

Nechť je hodnota $\frac{1}{C}$ definována jako časová konstanta, která představuje čas, v němž dosáhla odezva 63,21 % své hodnoty $\left(100 \cdot 1 - \frac{1}{e}\right)$.

3.8.1 Metoda vyhodnocení odezvy

Odezvy sond byly vyhodnoceny v programu *Bioanalyzer* (BVT Technologies). Naměřená data (Obrázek 23 – červená křivka) byla proložena exponenciálou (žlutá křivka). Z programu byla odečtena hodnota pro výpočet časové konstanty [26].



Obrázek 23 Vyhodnocení naměřených dat v programu *Bioanalyzer*

3.8.2 Stanovení časové konstanty ustálení teploty

Časová konstanta ustálení teploty byla stanovována pro oba minitermostaty.

i. Stanovení časové konstanty teplotní sondy při měření bez reakční nádoby

Do bloku minitermostatu (určeného pro vložení reakční cely) bylo napipetováno 10 ml destilované vody. Na blok byl nasazen nástavec pro ukotvení teplotní sondy a rtuťového teploměru (Obrázek 24). Teplota byla měněna skokem 8 °C (pro minitermostat se zabudovaným řízením) či se skokem 1 V (pro minitermostat s externím řízením).



Obrázek 24 Nástavec pro ukotvení teplotní sondy a rtuťového teploměru

ii. *Stanovení časové konstanty teplotní sondy při měření s reakční nádobou*

Do bloku minitermostatu byla zasazena reakční nádoba, do níž byly vsunuty teplotní sonda a rtuťový teploměr. Další postup je shodný s bodem i.

3.8.3 Stanovení časové konstanty kyslíkové elektrody

Časová konstanta kyslíkové elektrody je závislá na otáčkách míchadla a pracovním objemu reaktoru. Byly zvoleny tři pracovní objemy reaktoru (4, 6 a 10 ml) – minimální, optimální a maximální.

Postup

Do hlavice reakční cely bylo zavedeno interní míchadlo, rtuťový teploměr a kyslíková elektroda (další otvory byly zaslepeny zátkami). Kyslíková elektroda byla nastavena tak, aby vzdálenost membrány elektrody od disku míchadla byla cca 1 mm. Teplota kapaliny byla udržována na 30 °C. Vzduch/dusík byl vháněn do cely pomocí vstupu pro plyny u míchadla. Měření bylo provedeno pomocí potencistatu PalmSens 3, metoda: chronoamperometrie, při potenciálu – 650 mV.

Do cely byla napipetována destilovaná voda a do reaktoru byl vháněn vzduch o průtoku 2,8 l/min. Po ustálení odezvy kyslíkové elektrody (100 % saturace vody kyslíkem) byl do reaktoru vháněn dusík o průtoku 2,4 l/min. Po vypuzení kyslíku dusíkem byl do reaktoru znovu vháněn vzduch o průtoku 2,4 l/min.

3.8.4 Stanovení časové konstanty pH elektrody

Ustálení odezvy pH elektrody je závislé na otáčkách míchadla. Proto byla při různých otáčkách míchadla studována reakce pH elektrody na skokovou změnu pH.

Postup

Do hlavice reakční cely bylo zavedeno interní míchadlo, pH elektroda a referentní elektroda. Míchadlo bylo spuštěno na zvolené množství otáček a na multimetru (Monokrystaly) byl spuštěn Data logging. Do cely bylo napipetováno 5 ml pufru o pH 7,00. Měření bylo spuštěno do ustálení odezvy.

3.9 Ověření vlivu míchání na odezvu kyslíkové elektrody

V programu Rizot řídicím nové míchadlo byl vytvořen program měnící po každých deseti minutách otáčky míchadla (25; 50; 75; 100; 125; 250; 500; 1000; 1500; 2000; 2500 ot·min⁻¹). Do reakční nádoby bylo napipetováno 7 ml destilované vody a nad hladinu byl přes míchadlo přiváděn vzduch.

Vyhodnocení

Z naměřených dat byla v programu *Bioanalyzer* vyhodnocena ustálená hodnota proudu (proložením naměřených dat přímkou) a velikost šumu pro dané otáčky míchadla.

3.10 Ověření účinnosti sterilizačního procesu

Pro účely ověření účinnosti sterilizačního procesu bioreaktoru bylo do reaktoru aplikováno 5 ml sterilního komplexního média Nutrient Broth (pepton : kvasničný extrakt : NaCl = 2 : 2 : 1) o koncentraci 25 g·l⁻¹. Médium bylo provzdušňováno a inkubováno při 30 °C 48 h. Poté byl pomocí sterilní stříkačky a jehly proveden odběr média. Na agarovou plotnu (25 g·l⁻¹

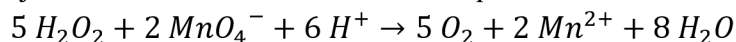
Nutrient Broth + 17 g·l⁻¹ agaru) bylo kličkou rozetřeno 0,1 ml média. Agarová plotna byla inkubována při 30 °C 48 h. Jako reference k inkubaci v minibioreaktoru sloužilo stejně připravené médium v Erlenmeyerově baňce inkubované při 30 °C 48 h při 170 rpm.

3.11 Metody pro stanovení peroxidu vodíku

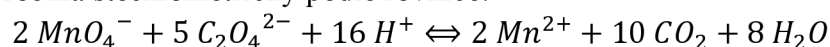
3.11.1 Manganometrická titrace

Princip metody:

Peroxid vodíku je titrován odměrným roztokem manganistanu draselného, který v kyselém prostředí vystupuje jako silné oxidační činidlo. Reakce probíhá stechiometricky podle rovnice:



Z důvodu pozvolného rozkladu manganistanu na kyslík a oxid manganičitý je nutné stanovit přesnou koncentraci roztoku KMnO₄ titrací na odměrný standard – dihydrát kyseliny šťavelové [51]. Reakce probíhá stechiometricky podle rovnice:



Postup:

i. Standardizace odměrného roztoku manganistanu draselného

Do titrační baňky bylo napipetováno 20 ml 0,03 mol/l roztoku kyseliny šťavelové a 10 ml 4 mol/l roztoku kyseliny sírové. Z byrety byl přidán 1 ml roztoku manganistanu draselného (o koncentraci ± 0,02 mol/l). Směs byla zahřáta na 60 °C (do odbarvení roztoku), poté se pokračovalo v titraci. V bodu ekvivalence je titrovaná směs trvale zbarvena do slabě růžova [51].

ii. Stanovení koncentrace peroxidu vodíku

Do titrační baňky bylo napipetováno 10 ml vzorku peroxidu vodíku, 30 ml destilované vody a 10 ml 4 mol/l kyseliny sírové. Směs byla titrována za studena odměrným roztokem manganistanu draselného do trvalého růžového zbarvení titrované směsi [51].

3.11.2 Amperometrie

Princip

Manganometrická titrace popsaná v kapitole 3.11.1 detekuje řádově desetiny mmol peroxidu vodíku. Pro detekci nižších množství peroxidu vodíku (v reakční cele minibioreaktoru po sterilizaci mlhou peroxidu) byla zvolena amperometrie. Při reakci manganistanu s peroxidem se uvolňuje kyslík, který může být detekován kyslíkovou elektrodou.

Postup

i. Ověření účinnosti metody

Do hlavice minibioreaktoru byla zasazena míchadlo a kyslíková elektroda. Další otvory byla ucpány zátkami (pozn. jedna zátko byla pro účely pipetování do reakční cely oddělována). Míchadlo se otáčelo rychlostí 500 ot·min⁻¹, vstupy vzduchování přes míchadlo byly zaslepeny. Do reakční cely bylo napipetováno 5 ml destilované vody. Po ustálení odezvy bylo do cely postupně napipetováno 50 µl 4 mol·l⁻¹ kyseliny sírové, 50 µl 0,02 mol·l⁻¹ manganistanu draselného a 25 µl vzorku peroxidu vodíku. Měření bylo provedeno při laboratorní teplotě (26 °C).

ii. Stanovení přítomnosti zbytkového peroxidu vodíku v reakční cele po sterilizaci

Do reakční cely bylo napipetováno 10 ml destilované vody. Po ustálení odezvy bylo do cely postupně napipetováno 50 μl 4 mol/l kyseliny sírové a 50 μl 0,02 mol/l manganistanu draselného. Další podmínky a uspořádání experimentu byly shodné s postupem viz výše. Přítomnost peroxidu je prokázána, jestliže se zvýší odezva kyslíkové elektrody. Poznámka: po přidavku manganistanu draselného do cely se odezva kyslíkové elektrody mírně zvýší i bez přítomnosti peroxidu. Proto je nutné si toto zvýšení odezvy od ustáleného stavu předem naměřit.

3.12 Studium chování uzavřeného a otevřeného systému

Uzavřený a otevřený systém byly studovány z hlediska ustálení koncentrace kyslíku v kapalině. Do reakční nádoby bylo napipetováno 6 ml destilované vody (ponechané 24 h při laboratorní teplotě přístupné vzduchu). Do reakční nádoby byla zasunuta kyslíková elektroda, otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 500 min^{-1} . Do reakční nádoby byly (vždy až po ustálení odezvy) postupně napipetovány tři přídávky 60 μl 2M siřičitanu sodného, který reaguje s kyslíkem na síran sodný. Měření bylo prováděno nejdříve v uzavřeném systému – do reaktoru byl zamezen přístup vzduchu. Měření v otevřeném systému bylo provedeno:

- i. Přívodem vzduchu přes míchadlo (průtok vzduchu vstupujícího do míchadla: 150 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)
- ii. Přívodem vzduchu přes míchadlo (viz bod i.) a přívodem vzduchu do kapaliny zátkou se sedmnácti úzkými kanylami (o průtoku 22,9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

3.13 Kultivace bakterie *Halomonas halophila*

3.13.1 Kultivace bakteriálního inokula

Do 100 ml Erlenmeyerové baňky bylo připraveno 50 ml živného média CNM (Complex Nutrient Medium) o složení viz Tabulka 1. Sterilní médium bylo naočkováno 0,75 ml kultury z kryozkumavky (Příprava viz kapitola 3.13.3). Inokula byla kultivována 24 h při 30 °C a otáčkách 190 rpm. Uchovávání mikroorganismu *Cupriavidus necator* H16

Tabulka 1 Složení živného média

Složka	Koncentrace [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
Pepton	15
Yeast extract	3
Glukóza	1
NaCl	66

3.13.2 Kultivace bakterií v produkčním médiu

Do láhve se šroubovacím uzávěrem bylo připraveno 20 ml produkčního média o složení viz Tabulka 2 (glukóza a roztok mikroelementů MES byly do produkčního média přidány až po sterilizaci). Roztok mikroelementů byl připraven rozpuštěním složek (Tabulka 3) v 0,1 mol/l HCl. Pomocí sterilní stříkačky a jehly bylo do reakční cely minibioreaktoru převedeno přes zátku se septem 5,8 ml produkčního média. Po ustálení odezvy všech sond bylo stejným způsobem produkční médium naočkováno 0,2 ml (přibližně 3 obj. procenty produkčního média) bakteriálního inokula. Kultivace byly provedeny v minitermostatu

se zabudovaným řízením. Teplota kultivace 30 °C byla zajištěna nastavením minitermostatu na 31,5 °C a vodní lázně s láhvemi pro vlhčení vzduchu na 32,9 °C (hodnoty byly stanoveny experimentálně).

Tabulka 2 Složení produkčního média

Složka	Koncentrace [g·l⁻¹]
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
KH ₂ PO ₄	1
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
NaCl	60
glukóza	20
MES	1 ml/l

Tabulka 3 Složení roztoku mikroelementů

Složka	Koncentrace [g·l⁻¹]
FeCl ₃	9,7
CaCl ₂	7,8
CuSO ₄	0,156
CoCl ₂	0,119
NiCl ₂	0,118
CrCl ₂	0,062

3.13.3 Uchování mikroorganismu *Halomonas halophila*

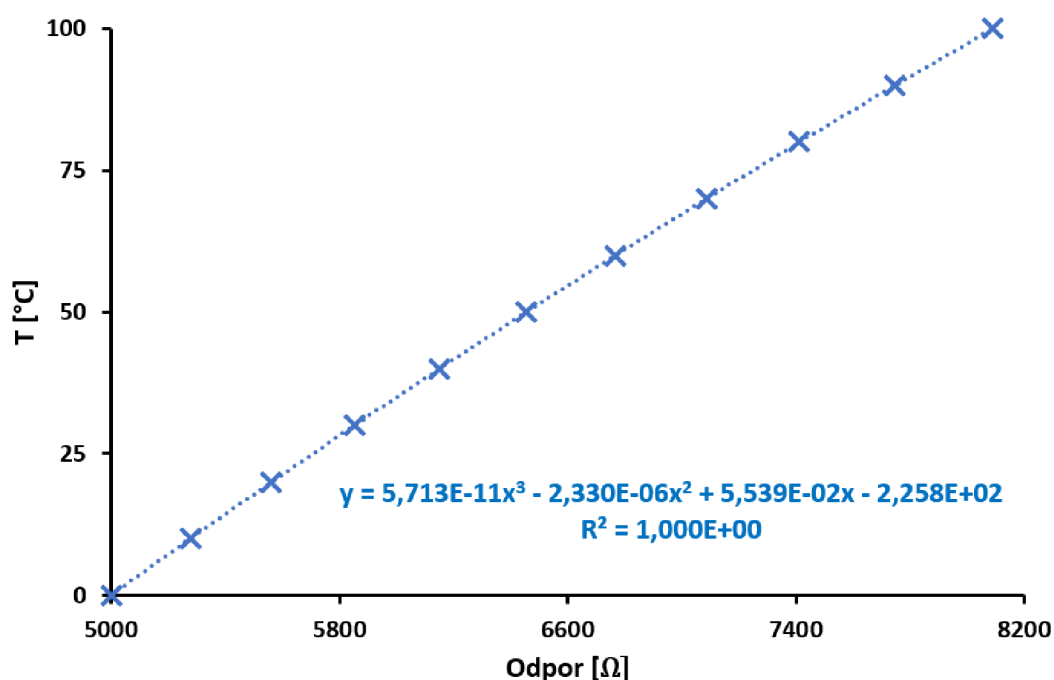
Bakterie byly uchovány v mrazu. Vysterilizované kryozkumavky obsahující 0,5 ml 30% roztoku (v/v) glycerolu byly naplněny 1 ml 24 hodin rostlého inokula, ihned po přípravě byly zkumavky zmrazeny na –80 °C. Dlouhodobě pak byly skladovány při teplotě –20 °C.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Minitermostat

V průběhu biotechnologického procesu je nutné mikroorganismům zajistit stabilní teplotu, protože fluktuace teploty v reaktoru mohou způsobit destabilizaci fermentace [52]. Teplotu v sestavovaném minibioreaktoru zajišťuje minitermostat, do nějž je vkládána reakční nádoba. Minitermostat ze systému AlgaTox je schopen pracovat do teploty 60 °C. V rámci prvního konceptu vyvíjeného zařízení bylo jako desinfekční proces navrženo odpařování 70% ethanolu z reakční nádoby. To by však vyžadovalo zvýšit teplotní rozsah minitermostatu na 80 °C (teplota varu 70% ethanolu). Proto byl zhotoven druhý minitermostat (s Peltierovým článkem umožňující ohřev až do 80 °C). Výrobce elektroniky však nebyl schopen pro nový minitermostat v zadaném čase vyrobit spolehlivou řídicí elektroniku. Nový minitermostat tedy bylo nutné řídit externě pomocí stabilizovaného zdroje napětí.

Všechny monitorované teploty (teplota bloku, dolního a horního Peltierova článku, teplota v reaktoru a laboratorní teplota) byly měřeny pomocí odporových teploměrů. Odporové teploměry bylo nutné zkalibrovat. Kalibrace byla provedena na interní etalon – rtuťový teploměr. Z údajů katalogového listu výrobce čidla teploty [44] byla sestrojena závislost teploty na naměřeném odporu. (Obrázek 25). Sestrojená rovnice byla zadána do softwaru EGMedical (funkce *Math channel*), proto aby se při měření na obrazovce PC vykreslovala naměřená teplota [°C] a ne odpor [Ω]. Tato funkce byla navíc pro každé teplotní čidlo korelována konstantou získanou při kalibraci teplotních čidel na etalon.



Obrázek 25 Závislost teploty na naměřeném odporu

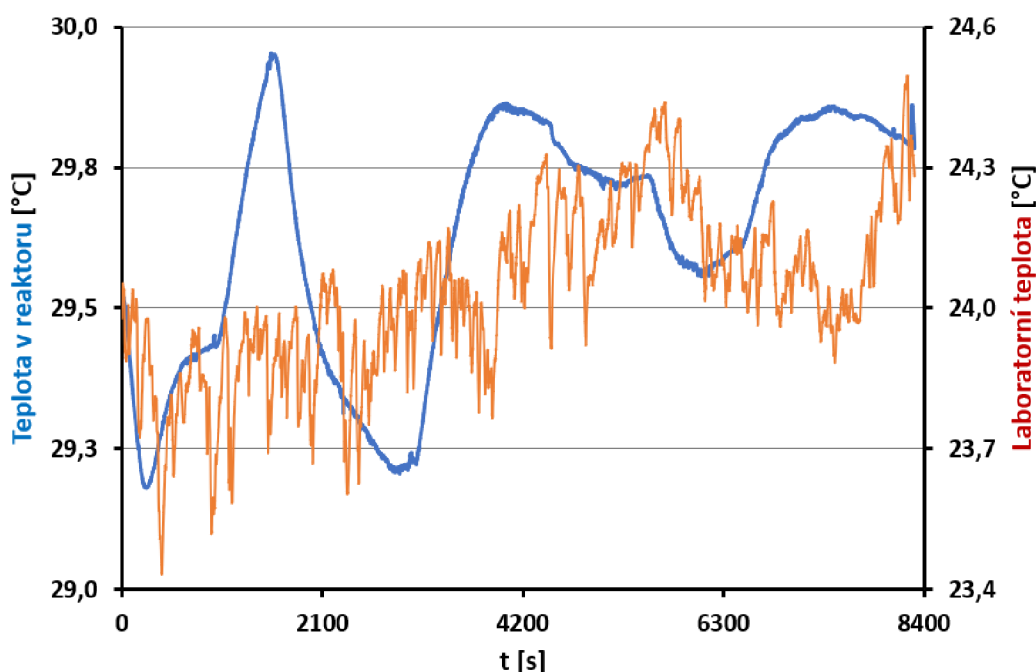
V rámci testování minitermostů bylo nutné stanovit časovou konstantu ustálení teploty. Ustalování teploty bylo měřeno novou teplotní sondou. Pro každý minitermostat byla stanovena časová konstanta ustálení odezvy při ohřevu a chlazení. Také byl sledován rozdíl mezi časovými konstantami naměřenými bez reakční nádoby (destilovaná voda byla napipetována

přímo do bloku minitermostatu) a s reakční nádobou. Časové konstanty ustálení teploty zobrazuje Tabulka 4, časové konstanty pro chlazení byly vyšší než pro ohřev. Je patrné, že přítomnost reakční nádoby významně navyšuje hodnotu časové konstanty.

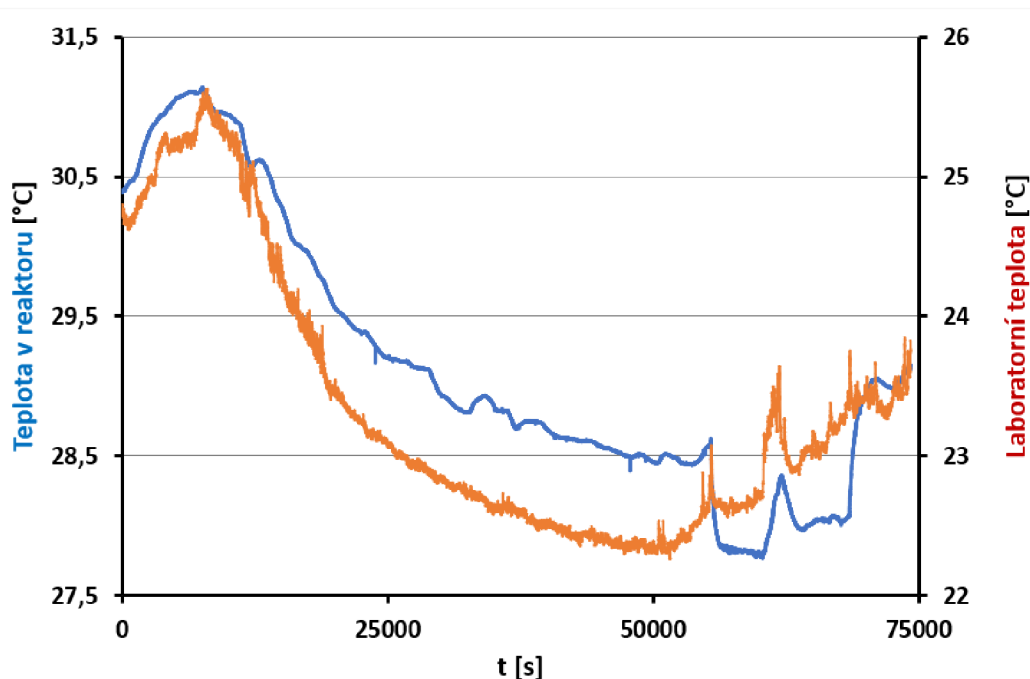
Tabulka 4 Časové konstanty ustálení teploty

	Časová konstanta [min]			
	měření bez reakční nádoby		měření s reakční nádobou	
	ohřev	chlazení	ohřev	chlazení
Minitermostat se zabudovaným řízením	6,4 ± 0,6	9,1 ± 0,4	10,0 ± 0,6	10,9 ± 0,4
Minitermostat s externím řízením	7,1 ± 0,9	8,8 ± 0,3	10,7 ± 0,8	13,0 ± 0,8

Vzhledem k tomu, že Peltiérův článek pracuje jako „tepelné čerpadlo“. Měla by změna teploty v reaktoru kopírovat trend změny teploty v laboratoři. Jak ukazuje Obrázek 26, minitermostat se zabudovaným řízením výše zmíněné nesplňuje → chyba v elektronice přístroje. Naproti tomu teplota v minitermostatu s externím řízením (Obrázek 27) kopíruje trend změny teploty v laboratoři. Nicméně s ohledem na chybějící elektroniku nedokáže změnu teploty v laboratoři dostatečně regulovat.

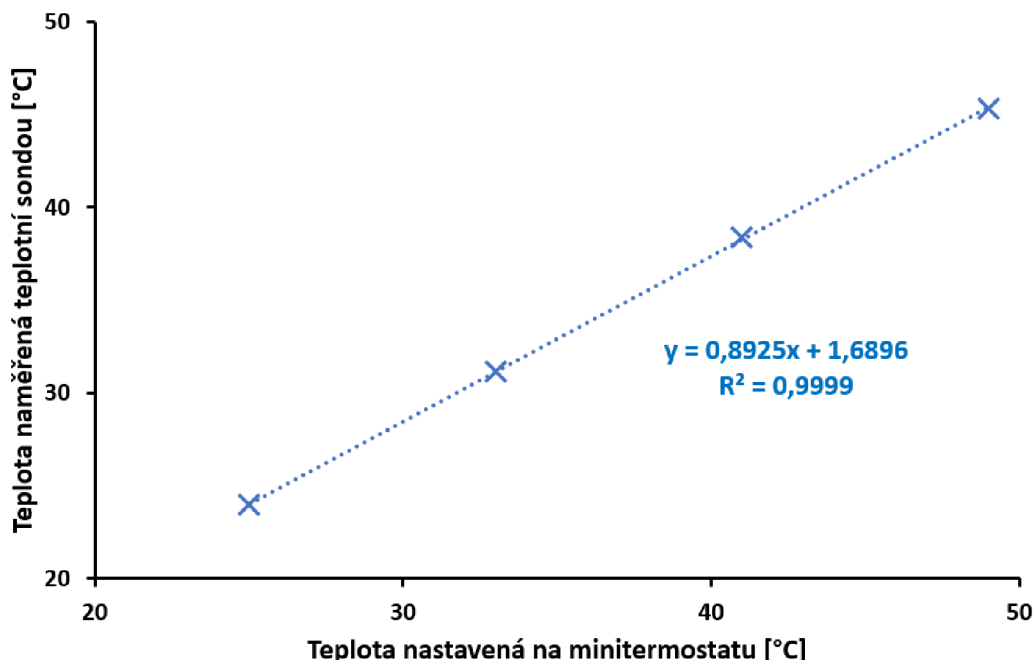


Obrázek 26 Minitermostat s vlastním řízením – uzavřený systém



Obrázek 27 Minitermostat s externím řízením – srovnání teploty v reaktoru s laboratorní teplotou – otevřený systém (vzduchování nad hladinu, průtok vzduchu $35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$)

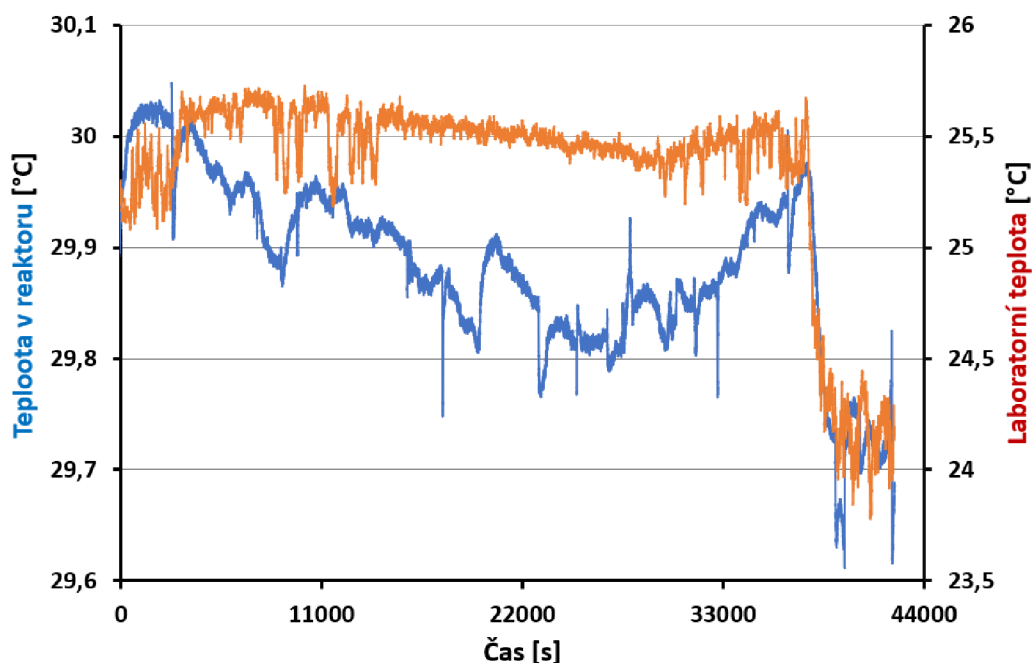
U minitermostatu se zabudovaným řízením bylo sledováno, jak nastavit teplotu bloku, aby bylo docíleno požadované teploty v reaktoru. Jak ukazuje Obrázek 28, teplota v reaktoru je vždy nižší jak nastavená teplota bloku. Teplota minitermostatu je pro měření nastavena dle sestrojené rovnice.



Obrázek 28 Závislost teploty naměřené teplotní sondou v reaktoru na teplotě nastavené na minitermostatu

Při testování minitermostatů bylo zjištěno, že v otevřeném systému (při vhánění vzduchu do reakční nádoby) dochází ke snížení objemu provzdušňované kapaliny. Ke snižování objemu

média docházelo i při vzdušnění nad kapalinu při nízkých průtocích vzduchu. Z tohoto důvodu byl přiváděný vzduch do reaktoru nejdříve probublán přes láhev s destilovanou vodou umístěnou ve vodní lázni. Díky tomuto systému bylo zamezeno objemovým ztrátám a také jím byla zajištěna stabilnější teplota v reaktoru (Obrázek 29).



Obrázek 29 Minitermostat se zabudovaným řízením – srovnání teploty v reaktoru s laboratorní teplotou při přivádění vlhkého ohřátého vzduchu – otevřený systém

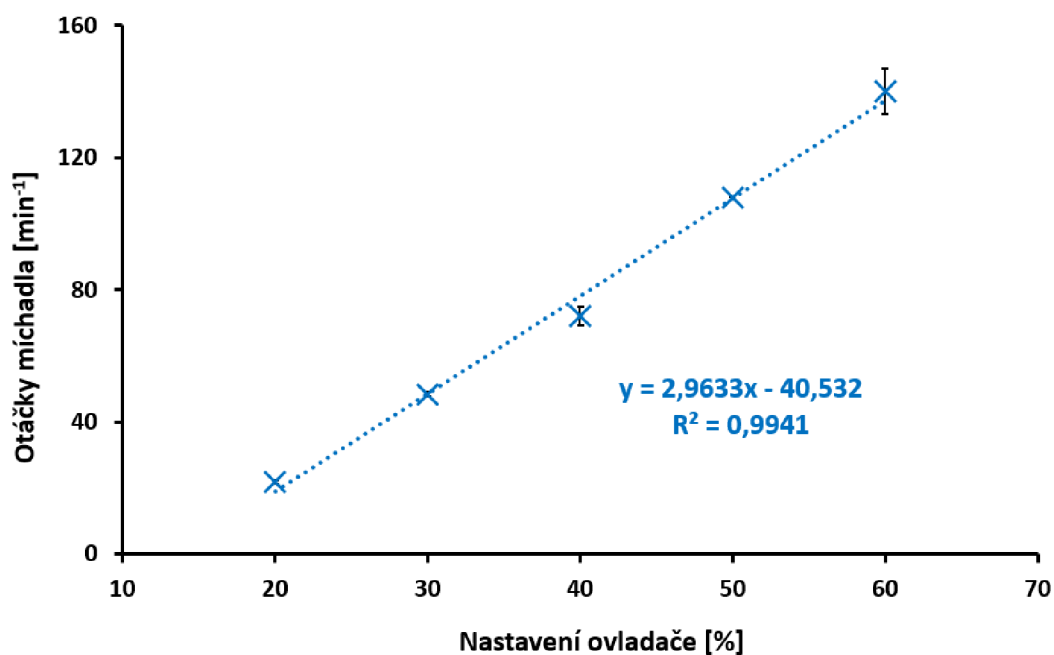
4.2 Míchadlo

Míchání kapaliny v reaktoru bylo testováno na dvou míchadlech. Prvním bylo míchadlo ST1 ze systému AlgaTox. Vzhledem k zamýšlenému konceptu desinfekce reakční nádoby parami 70% ethanolu bylo nutné již toto míchadlo konstrukčně změnit. Byl zvolen nový motor míchadla, který vzhledem ke své konstrukci předchází pronikání par ethanolu do motoru. I přes tuto konstrukční změnu zvolený způsob desinfekce reaktoru významně zkracoval životnost míchadla (na řádově jednotky měření). Navíc v průběhu biotechnologického procesu dochází v bioreaktorech k tvorbě nezanedbatelného množství pěny – může dojít až k tzv. přepěnění bioreaktoru. Konstrukce míchadla by měla cíleně předcházet vniknutí pěny do motoru. Z těchto důvodů bylo použito interní míchadlo BVT Technologies, které je vhodné pro měření vyžadující vysokou citlivost a definovanou hydrodynamiku. Toto míchadlo navíc disponuje dvěma vstupy pro přívod plynů – vháněním vzduchu do reaktoru přes tyto vstupy (namísto vzduchovací zátky) je zajištěna ochrana motoru míchadla před parami či pěnou, která by jej mohla nevratně poškodit.

Míchadlo ST1 bylo řízeno PWM modulem. Pomocí Hallovy sondy byla proměřena závislost otáček míchadla na nastavení ovladače (Obrázek 30). Interní přesné míchadlo bylo řízeno přes PC programem Rizot-P, který v současné době umožňuje:

- i. nastavit konstantní hodnotu otáček po celou dobu měření

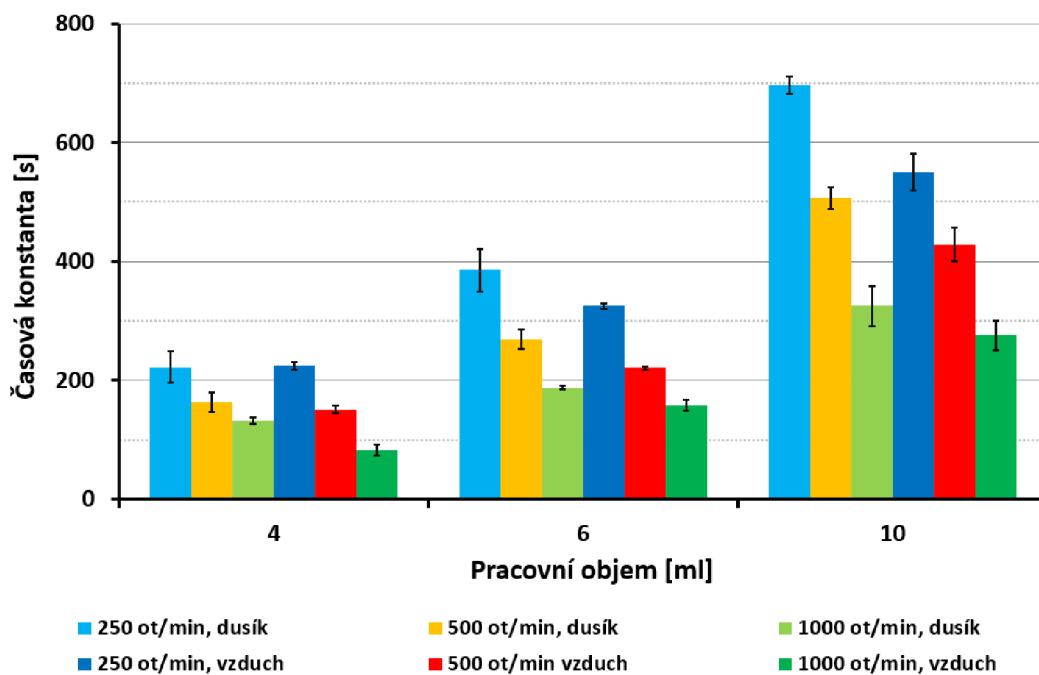
- ii. přednastavit změnu otáček v čase (např. každou hodinu zvýšit hodnotu otáček o 10 % aktuální hodnoty).



Obrázek 30 Kalibrace míchadla – závislost otáček míchadla na nastavení ovladače

4.3 Kyslíková elektroda

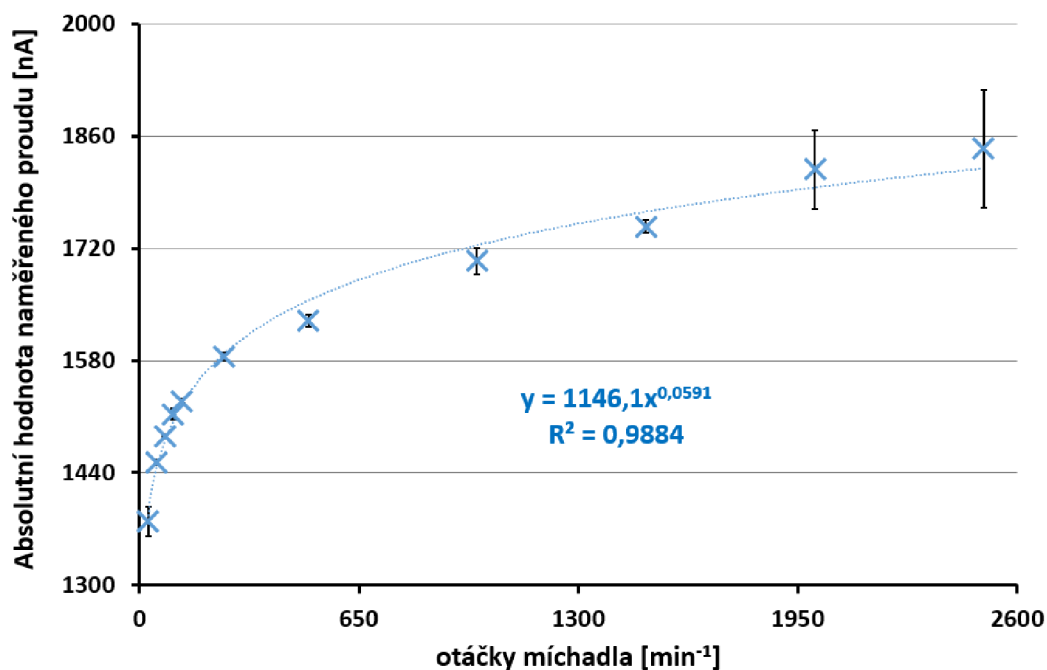
Hodnoty časových konstant pro kyslíkovou elektrodu byly stanoveny při otáčkách míchadla 250, 500 a 1000 [min⁻¹], při pracovních objemech 4, 6 a 10 ml. Časová konstanta byla stanovována jednak při vypuzování kyslíku dusíkem, jednak při sycení roztoku kyslíkem ze vzduchu. Výsledky analýzy časových konstant kyslíkové elektrody shrnuje Obrázek 31. Z naměřených dat lze vyčíst, že se zvyšujícím se pracovním objemem se významně zvyšuje časová konstanta kyslíkové elektrody. Naopak se vrůstajícími otáčkami míchadla se časová konstanta snižuje. Hodnotu časové konstanty rovněž ovlivňuje průtok plynu. Časové konstanty při vypuzování kyslíku dusíkem jsou vyšší než při sycení roztoku kyslíkem, protože průtok vzduchu byl asi o 16 % vyšší než průtok dusíku.



Obrázek 31 Závislost časové konstanty kyslíkové elektrody na pracovním objemu reaktoru při různých otáčkách míchadla

Významný vliv na hodnotu časové konstanty kyslíkové elektrody má vzdálenost membrány elektrody od disku míchadla.

Vedle časových konstant byl sledován i vliv míchání na odezvu kyslíkové elektrody. S rostoucí intenzitou míchání se zvyšuje odezva kyslíkové elektrody (Obrázek 32).



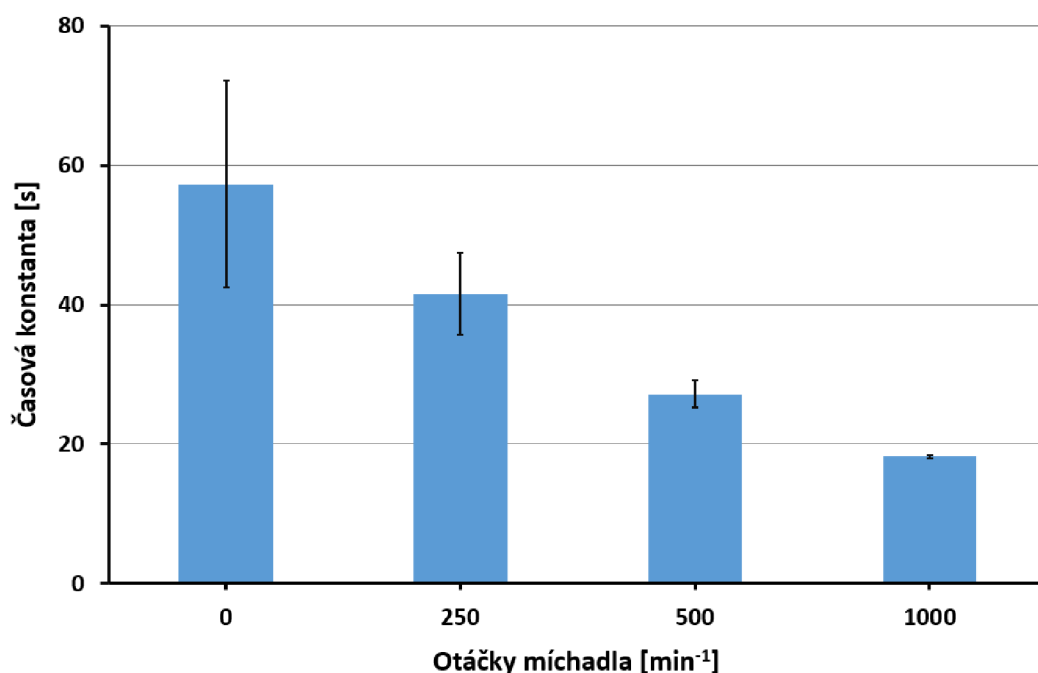
Obrázek 32 Závislost naměřeného proudu na volbě otáček míchadla

4.4 pH elektroda

Po kalibraci pH elektrody podle návodu popsaného v kapitole 3.5 bylo nutné ověřit, zda se pH elektroda chová podle Nernstovy rovnice (Rovnice 14). Dle teorie by měla být změna pH o jednu jednotku doprovázena změnou potenciálu o 59 mV. Při změně pH o šest jednotek byla naměřena změna o $333,5 \pm 1,5$ mV. Což pro změnu pH o jednu jednotku představuje 55,6 mV. Reálná hodnota se tedy od teoretické liší o 5,8 %.

$$E = \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln a_{H^+} = \frac{8,314 \cdot 298,15}{1 \cdot 96\,485} \cdot 2,3 \cdot \log a_{H^+} = 0,059 \text{ pH} \quad (13)$$

Dále byla studována časová konstanta odezvy pH elektrody v závislosti na otáčkách míchadla. Jak demonstruje Obrázek 33, časová konstanta pH elektrody se významně snižuje s rostoucími otáčkami míchadla. V nemíchaném systému má na hodnotu časové konstanty významný vliv i způsob pipetování pufru do cely. Roli v tom hraje sklon pipety, rychlost vypouštění pipety či vzdálenost špičky pipety od sondy. To je také důvod, proč nabývá v nemíchaném systému směrodatná odchylka nejvyšších hodnot. Při vysokých otáčkách míchadla (1 000 ot/min) již má způsob pipetování pufru do cely zanedbatelný vliv.



Obrázek 33 Závislost časové konstanty pH elektrody na otáčkách míchadla

4.5 Dekontaminační proces minibioreaktoru

Jak bylo uvedeno výše, v původním konceptu vyvíjeného minibioreaktoru měl být dekontaminační proces zajištěn odpařováním 70% ethanolu z reakční nádoby. Zejména kvůli životnosti míchadla není možné tento proces provádět. Proto bylo nutné vypracovat novou technologii dekontaminačního procesu vyvíjeného zařízení. Vzhledem k množství přítomných plastů bylo nutné vyloučit veškeré technologie pracující za vyšších teplot. Z tohoto důvodu byl zvolen znovu způsob chemický, a to pomocí mlhy 33% peroxidu vodíku (*poznámka: koncentrace peroxidu vodíku ze zásobní láhve 35% H₂O₂ byla stanovena manganometrickou titrací na hodnotu 32,99%*). Ta je v první fázi vháněna do reaktoru přes vstup pro plyny míchadla, v druhé fázi je tato mlha vypuzována z reaktoru velkým množstvím sterilního

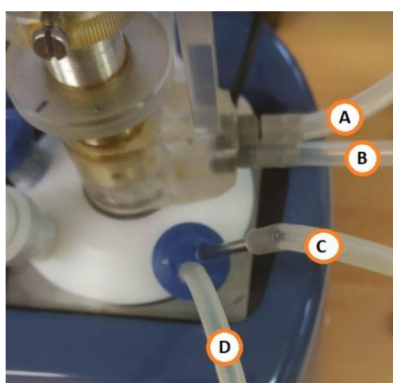
vzduchu. Do dekontaminačního procesu byla zařazena i *fáze 0* – čištění reakční nádoby a elektrod. Úspěšnost dekontaminačního procesu byla ověřena inkubováním komplexního sterilního média Nutrient Broth v reakční nádobě (48 h) a následnými roztěry na agarové plotny. Podrobný popis vyvinutého dekontaminačního procesu je uveden níže:

i. Fáze 0 – čištění reakční nádoby

Po zasazení veškerého příslušenství do hlavice reakční nádoby je reakční cela čištěna nejdříve 0,5% roztokem Tween 20 a poté 1,5% roztokem kyseliny. V obou případech je do reakční nádoby aplikováno 6 ml roztoku. Reakční nádoba je promývána pět minut při nastavení míchadla $2\,000\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$. Roztoky jsou z cely odsávány pomocí kanyly, která je přes promývačku napojena na membránovou vývěvu. Po každém čistícím roztoku je reakční nádoba třikrát promyta destilovanou vodou.

ii. Fáze 1 – vhánění mlhy peroxidu vodíku

Po vyčištění reaktoru jsou na míchadlo a zátku zajišťující přívod vzduchu do kapaliny připojeny vysterilizované hadičky (Obrázek 34). Hadička A přivádí přes míchadlo do reaktoru vzduch, hadička B přivádí přes míchadlo mlhu peroxidu vodíku, hadička C je napojena na kanylu, která přivádí vzduch do kapaliny v reaktoru, hadička D je napojena na kanylu, která slouží pro odvod plynů z reakční nádoby. Konce hadiček jsou před napojením na míchadlo a kanyly ponořeny do 33% peroxidu vodíku. Hadičky A a C jsou napojeny na zásobní láhve s bublačkou naplněné destilovanou vodou, do kterých je přes sterilní filtr vháněn vzduch (systém pro vlhčení přiváděného vzduchu). Systém pro vlhčení přiváděného vzduchu (Obrázek 35) je předem sterilizován v autoklávu. Před započatím vhánění mlhy peroxidu vodíku do reaktoru je nutné zaškrtnit tlačkou hadičky A, C a D. Míchadlo je nastaveno na otáčky $500\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota minitermostatu je nastavena na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Přes hadičku B je do reaktoru 10 minut vháněna mlha peroxidu vodíku proudem nosného plynu (sterilního vzduchu) o průtoku $320\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.



Obrázek 34 Napojení hadiček na sestavený minibioreaktor



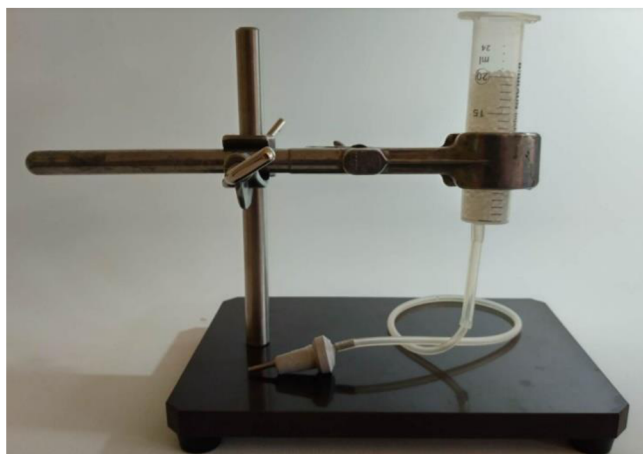
Obrázek 35 Systém pro vlhčení přiváděného vzduchu (vlevo: zásobní láhev s bublačkou a destilovanou vodou – uzavřena pro účely sterilizace horkou parou, vpravo: vysterilizovaná sestava připravená k napojení na minibioreaktor

- iii. Fáze 2 – vypuzení peroxidu vodíku z reaktoru
 Hadička B je zaškrčena tlačkou. Z hadičky A, C a D je tlačka odstraněna. Hadičkami A a C je vháněn do reaktoru vlhký vzduch (láhve s destilovanou vodou jsou umístěny ve vodní lázni o teplotě 32,9 °C) o průtoku 150 ml·min⁻¹. Konec hadičky D je zasunut do zkumavky s malým množstvím destilované vody. Další podmínky jsou shodné s fází 1. Po ukončení fáze 2 (40 minut je hadička D zaškrčena tlačkou.

4.5.1 Stanovení zbytkového peroxidu v reakční cele

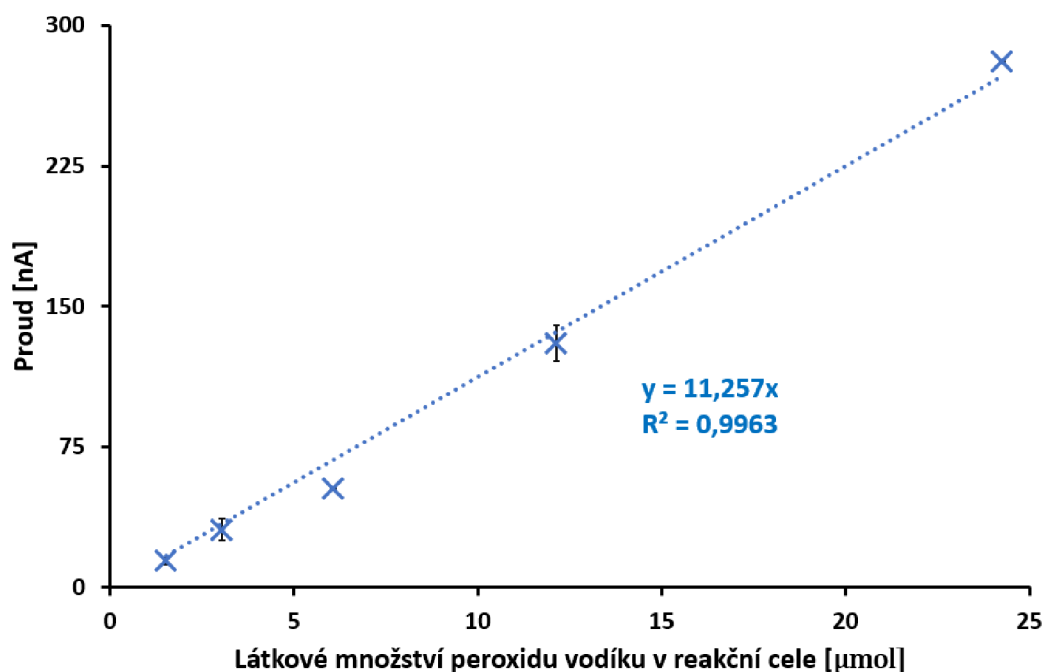
Jak bylo uvedeno výše, sterilizační proces probíhá ve dvou fázích – vhánění mlhy peroxidu vodíku do reaktoru a jeho následné odstranění vyfoukáním sterilním vzduchem. Nedostatečná délka druhé fáze sterilizačního procesu by významně ovlivnila následný fermentační proces – peroxid vodíku by způsoboval usmrcení buněk kultivovaného mikroorganismu. Navíc přítomnost peroxidu vodíku v reakční nádobě by znehodnotila testy ověřování účinnosti dekontaminačního procesu. Bylo tedy nutné ověřit, zda je v reakční cele po sterilizačním procesu přítomen zbytkový peroxid.

Jednou z testovaných variant bylo probublávání destilované vody vzduchem vystupujícím z reaktoru, popř. prohánění tohoto vzduchu přes kuličky silikagelu (na kanylu v zátce byla napojen hadička, která přiváděla vzduch do stříkačky naplněné 20 ml silikagelu – Obrázek 36 Aparatura pro absorpci vlhkého vzduchu vycházejícího z reakční cely). Tyto vzorky (probubláná destilovaná voda a kuličky silikagelu – rozsuspendované v destilované vodě) byly podrobeny manganometrické titraci. Koncentrace peroxidu vodíku ve vzorcích však byly příliš nízké na to, aby bylo možné je titračně stanovit.



Obrázek 36 Aparatura pro absorpci vlhkého vzduchu vycházejícího z reakční cely

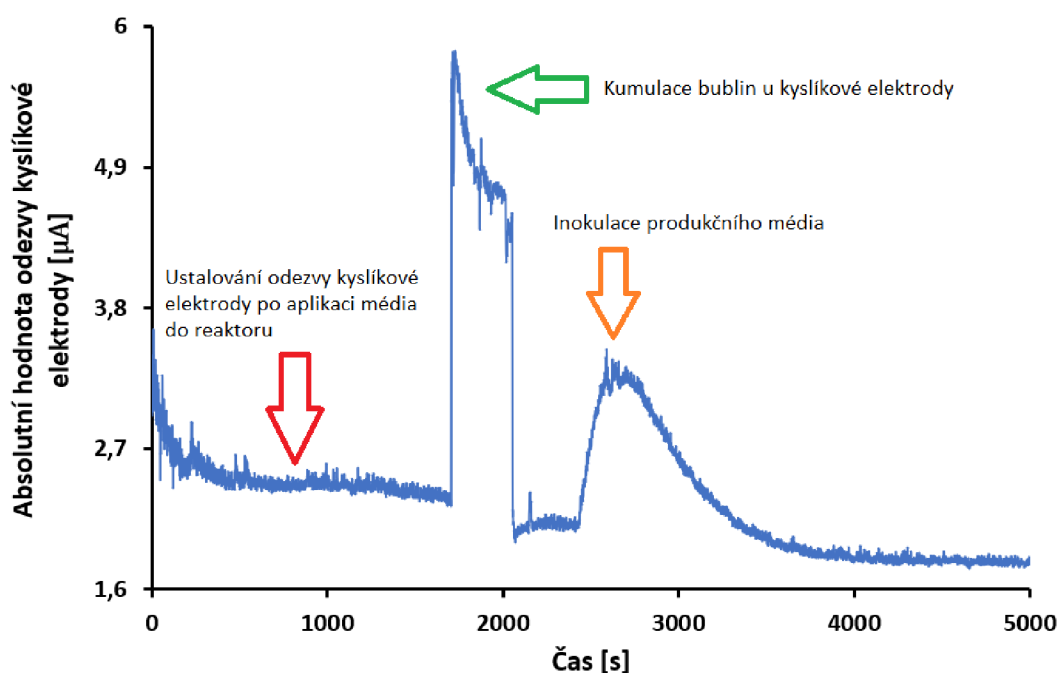
Přítomnost peroxidu vodíku tedy byla stanovena amperometricky – detekcí uvolněného kyslíku po reakci peroxidu vodíku s manganistanem draselným v kyselém prostředí (viz kapitola 3.11.2). Jak demonstruje Obrázek 37, bylo ověřeno, že pomocí předložené metody je možné detekovat peroxid vodíku až do jednotek μmol . *Poznámka: pokud byl do cely aplikován vzorek o koncentraci 0 μmol peroxidu vodíku (destilovaná voda), nebyla zaznamenána žádná změna na odezvě kyslíkové elektrody byla 0 nA. Tuto skutečnost je rovněž možné interpretovat tak, že změna pracovního objemu reaktoru o 0,49 % se nepromítne na odezvě kyslíkové elektrody.* Přítomnost peroxidu vodíku po dekontaminaci zařízení byla ověřována pouze kvalitativně (z důvodu dlouhého ustalování rovnováh).



Obrázek 37 Závislost naměřeného proudu kyslíkové elektrody na látkovém množství peroxidu vodíku v reakční cele (při teplotě 26 °C)

4.5.2 Identifikace nedokonalého vypuzení peroxidu vodíku z reaktoru

Nedokonalé vypuzení peroxidu vodíku je možné identifikovat i podle odezvy kyslíkové elektrody. Po ukončení dekontaminačního procesu je do reakční nádoby aplikováno produkční médium. Ustálená hodnota odezvy kyslíkové elektrody v produkčním médiu musí být nižší, než ustálená hodnota odezvy kyslíkové elektrody v destilované vodě (naměřeno před provedením dekontaminačního procesu). Dále se přítomnost peroxidu vodíku může projevit zvýšeným množstvím bublin v reakční nádobě, které se přichytávají na kyslíkovou elektrodu (Obrázek 38). Bubliny shromážděné na membráně kyslíkové elektrody lze odstranit mírným povytažením sondy. V neposlední řadě lze přítomnost peroxidu vodíku zaznamenat při inokulaci produkčního média, kdy se po reakci peroxidu s buňkami mikroorganismu uvolňuje kyslík (Obrázek 38).

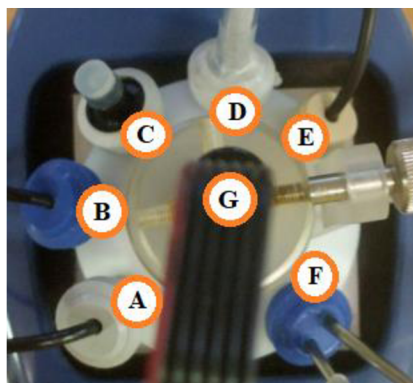


Obrázek 38 Odezva kyslíkové elektrody po nedokonalém vypuzení peroxidu vodíku z reaktoru

4.6 Studium chování uzavřeného a otevřeného systému

V průběhu biotechnologického procesu je do reaktoru přiváděn vzduch, jedná se o tzv. otevřený systém. Je-li vzduch vháněn nad hladinu, lze jeden kompartment nastavit jako chemostat. Uzavřený systém umožňuje díky látkové bilanci stanovit první integrály pro kompartmentovou analýzu. Porovnání uzavřeného a otevřeného systému bylo studováno na ustálení odezvy kyslíkové elektrody po přidavku $2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ siřičitanu sodného do reaktoru, který reaguje s přítomným kyslíkem. Jak demonstruje Obrázek 39, ustálení odezvy po přidavcích siřičitanu se při provzdušňování reaktoru prodlužuje. Čím intenzivněji je kapalina v reaktoru provzdušňována, tím se odezva ustaluje pomaleji. Pokud je systém uzavřený (modrá křivka) či pokud je vzduch přiváděn pouze nad kapalinu, je většina kyslíku v roztoku spotřebována již po prvním přidavku siřičitanu. Je-li však přiváděn vzduch i do kapaliny reaktoru (zelená

- vi. Aplikace minerálního produkčního média do reaktoru, jeho vytemperování na požadovanou hodnotu, nastavení vzdušnění a otáček míchadla, proměření hodnoty 100 % DO.
- vii. Inokulace produkčního média (*poznámka: transport kapaliny do reaktoru je prováděn pomocí zátky se septem*)



Obrázek 40 Osazení reakční nádoby příslušenstvím (A – pH sonda, B – referenční elektroda, C – zátka pro transport kapaliny z/do reaktoru, D – teplotní sonda, E – kyslíková elektroda, F – zátka pro přívod vzduchu do kapaliny, G – míchadlo)

4.8 Biotechnologická produkce PHB bakterií *Halomonas halophila*

Jak bylo uvedeno v kapitole 2.4.3, salinita produkčního média bakterie *Halomonas halophila* významně ovlivňuje výstup fermentačního procesu. Vliv salinity produkčního média na výtěžnost procesu a vlastnosti izolovaného polymeru byl ve zmíněné publikaci studován v Erlenmeyerových baňkách. Cílem fermentační části práce bylo ověřit vliv salinity produkčního média na produkci PHB v připraveném minibioreaktoru.

Hlavní výzvou se ukázalo zajištění dostatečného přísunu kyslíku mikrobiálním buňkám. Dle původně zamýšleného konceptu sestavovaného minibioreaktoru měl být přísun kyslíku zajištěn provzdušňováním prostoru nad kapalinou vysokým průtokem vzduchu. Tato varianta by přinesla několik benefitů:

- i. nižší šum – zejména v případě kyslíkové elektrody
- ii. menší náchylnost k objemovým ztrátám (při probublávání kapaliny v reaktoru můžou bublinky plynu snadněji odnášet vlhkost)
- iii. prevence tvorby pěny.

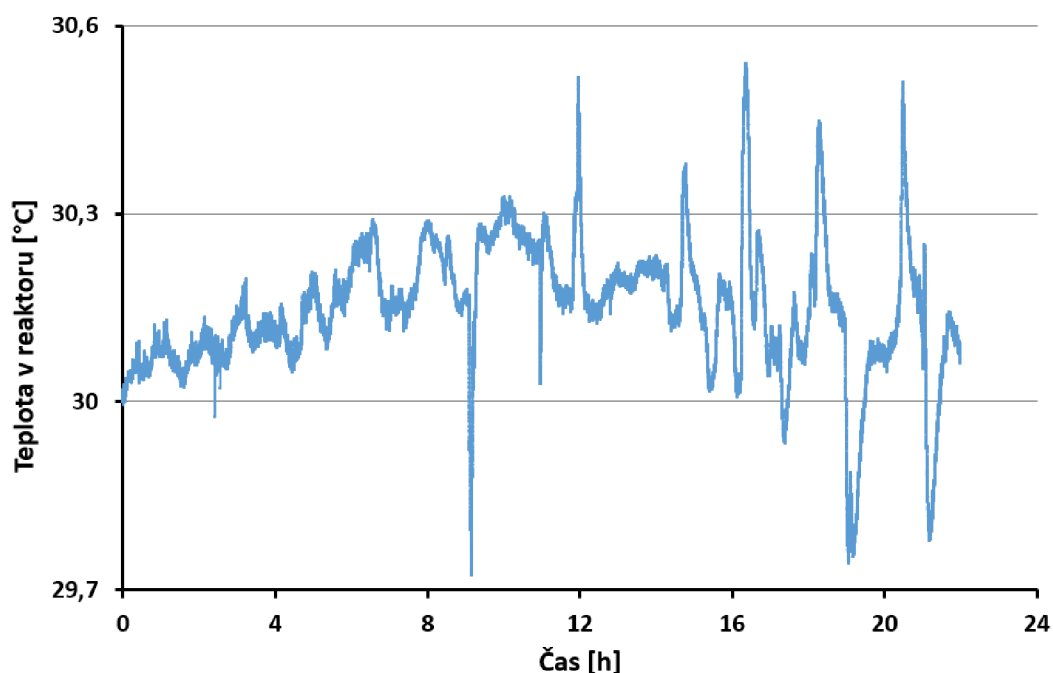
Konstrukce minibioreaktoru neumožňuje vhánět nad kapalinu takový proud vzduchu, který by byl schopen dopravit do kapaliny dostatečné množství kyslíku (kultura zcela vydýchá kyslík v médiu do sedmi hodin od inokulace). Přístup vzduchu přímo do kapaliny v reaktoru byl realizován:

- i. zátkou s kanylou zasahující pod hladinu kapaliny až k disku míchadla
- ii. aeračním věncem (se čtyřmi otvory pro únik vzduchových bublin)
- iii. zátkou se sedmnácti drobnými kanylami zasazenými do vějířovitého tvaru a zasahujícími až k disku míchadla

Při standardních kultivacích v laboratorních bioreaktorech je dostatečná koncentrace rozpuštěného kyslíku zajišťována softwarem, který reguluje otáčky míchadla pro udržení

konstantní DO. Vyvíjený systém s přesným měřením kyslíku sleduje procesy v kultuře. Z principu měření by se otáčky míchadla a průtok vzduchu neměly během kultivace měnit.

Prvním způsobem provzdušňování kapaliny je zátka se zabudovanou kanylou. Vzhledem k průměru kanyly (2 mm) bylo nutné při kultivacích volit nižší průtoky vzduchu. Vysoký průtok velkých bublin vzduchu by mohl snadno zapříčinit vypěnění média z reaktoru. Pilotní měření definovala pro tento typ vzdušnění oblast maximálních průtoků vzduchu v rozmezí 20 až 60 ml·min⁻¹. Ačkoli byly při pilotních kultivacích voleny vysoké otáčky míchadla (až 2 500 ot·min⁻¹). Rychlost sycení média kyslíkem nebyla dostačující – hodnota DO klesla na 0 %. Pozitivním výsledkem pilotních kultivací bylo udržení stabilní teploty v reakční nádobě v rozmezí ± 0,5 °C (Obrázek 41). Teplotní pulzy však znovu ukazují na chyby v elektronice minitermostatu.

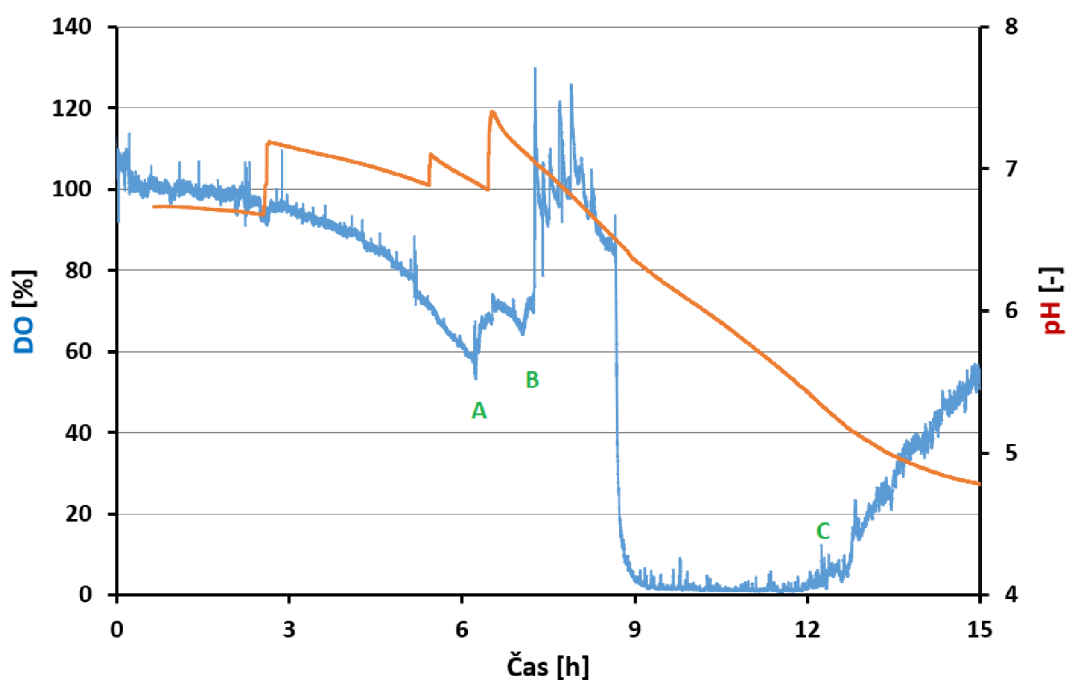


Obrázek 41 Teplotní záznam z pilotní kultivace

Pro zvýšení hodnoty DO je nutné probublávat kapalinu v reaktoru větším množstvím malých bublin vzduchu. Proto byla další kultivace provedena s aeračním věncem (se čtyřmi otvory pro únik bublin). Pilotní měření definovala pro tento typ vzdušnění oblast maximálních průtoků vzduchu v rozmezí 60 až 100 ml·min⁻¹. Přes míchadlo byl do reaktoru vháněn vzduch o průtoku 150 ml·min⁻¹. Záznam z kultivace za využití tohoto systému vzdušnění zobrazuje Obrázek 42. V průběhu fermentace byla třikrát upravena hodnota pH 20% roztokem NaOH. Data z pH elektrody nebyla na začátku kultivace logována. Otáčky míchadla byly na začátku kultivace nastaveny na hodnotu 1 000 ot·min⁻¹. Ze záznamu měření je možné pozorovat tři oblasti, kdy došlo ke zvýšení hodnoty DO. V bodě A byla tato změna způsobena zvýšením otáček míchadla na hodnotu 1 250 ot·min⁻¹. V bodě B byl zvýšen průtok vzduchu do kapaliny na hodnotu 94,6 ml·min⁻¹. Po devíti hodinách kultivace klesla hodnota DO na 0 %. Po dvanácti hodinách (bod C) došlo k tvorbě velkého množství pěny a snižování objemu kapaliny v reaktoru.

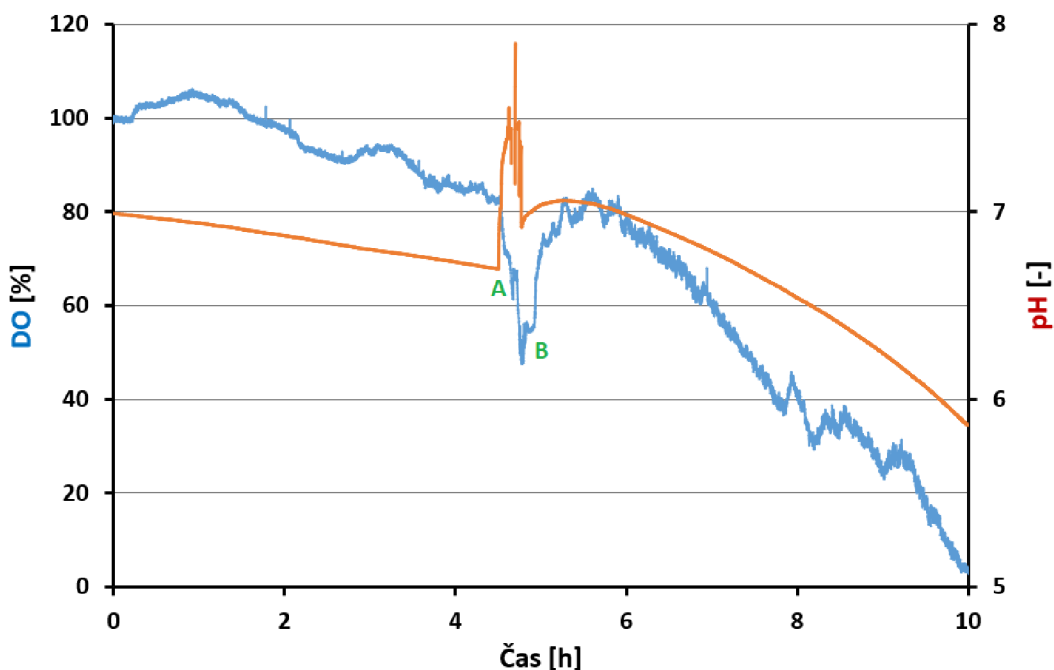
Ačkoli zhotovený aerační věnec disponoval čtyřmi otvory pro únik vzduchových bublin, v oblasti zvolených průtoků vzduchu unikaly bubliny pouze prvními dvěma otvory (jeden otvor

byl v úrovni disku míchadla, druhý otvor ležel již nad diskem míchadla). Provozdušňování kapaliny zhotoveným aeračním věncem se ukázalo méně účinné než přivádění velkých bublin kanylou na disk míchadla.



Obrázek 42 Záznam z kultivace 1 – provzdušňování kapaliny pomocí aeračního věnce

Třetí systém pro vhánění kyslíku do kapaliny byla zátka se sedmnácti úzkými kanylami. Kanyly byly umístěny do tvaru vějíře, tak aby přiváděly bubliny vzduchu na disk míchadla od jeho středu až po okraj. Pilotní měření s destilovanou vodou definovala pro tento typ vzdušnění oblast maximálních průtoků vzduchu v rozmezí 20 až 40 ml·min⁻¹. Při vyšších průtocích se bubliny vzduchu táhnou po okraji reakční nádoby a vyplavují kapalinu z reaktoru. Přes míchadlo byl do reaktoru vháněn vzduch o průtoku 150 ml·min⁻¹. Před zahájením fermentace bylo nastaveno otáčení míchadla na hodnotu 500 ot·min⁻¹. Kapalina v reaktoru byla provzdušňována vzduchem o průtoku 22,9 ml·min⁻¹. V průběhu kultivace byly otáčky každou hodinu zvyšovány o 10 % výchozí hodnoty až na hodnotu 1 000 ot·min⁻¹ (zvyšování otáček bylo řízeno softwarem). Záznam z kultivace zobrazuje Obrázek 43. V bodě A bylo upraveno pH média pomocí 20% NaOH a 0,5 mol·l⁻¹ HCl (po nadměrném zvýšení pH vzrostla spotřeba kyslíku). V bodě B byl zvýšen průtok vzduchu do kapaliny na hodnotu 36,8 ml·min⁻¹. Po deseti hodinách kultivace byla hodnota DO prakticky nulová. Ačkoli byl při této kultivaci použit nižší průtok vzduchu a nižší hodnoty otáček míchadla než při kultivaci s prvním systémem pro vhánění vzduchu do kapaliny, kapalina v reaktoru se sytila kyslíkem účinněji. Z většího množství malých bublin vzduchu mohlo snáze docházet k rozpouštění kyslíku v kapalině (větší množství malých bublin má v součtu větší povrch než menší množství velkých bublin).



Obrázek 43 Záznam z kultivace 3 – provzdušňování kapaliny pomocí zátky se sedmnácti kanylami

Záznamy z kultivací dokládají, že zhotovená příslušenství minibioreaktoru zajišťující probublávání kapaliny v reakční nádobě vzduchem nejsou schopna zajistit dostatečnou saturaci kapaliny kyslíkem (při zvoleném biotechnologickém procesu). Ačkoli byly voleny vysoké průtoky vzduchu, výška kapaliny (cca 1,5 cm) a typ míchadla znemožnily rozpuštění dostatečného množství kyslíku v provzdušňované kapalině.

Pro vyvíjený minibioreaktor bude nutné sestavit nový aerační mechanismus, který by byl schopen zajistit dostatečný přísun kyslíku buněčné kultuře. Nový mechanismus by měl být schopen generovat obrovské množství velmi malých bublin vzduchu. Tento systém by mohl mít vzor v aeračním věnci, ale místo kovové spirály by byl vyroben z membránové trubice. Výzvou u tohoto mechanismu bude tlakový spád – přes většinu membrán bude problém vzduch pumpou protlačit. Dále bude problém s čištěním membrány po fermentačním procesu – je možné, že membránu nebude možné vyčistit a opakovaně použít.

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala vývojem nového přístroje – minibioreaktoru pro mikrobiální biotechnologie. Výchozí jednotkou pro sestavení minibioreaktoru bylo zařízení AlgaTox firmy BVT Technologies.

Základem sestaveného minibioreaktoru je minitermostat pro reakční nádobu. V rámci této práce byly testovány dva minitermostaty. Jeden ze systému AlgaTox (se zabudovaným řízením teploty o pracovním rozsahu -10 až 60 °C), druhý s externím řízením teploty (se zvýšením pracovního rozsahu do 80 °C). Pro sestavení minibioreaktoru byl použit minitermostat ze sestavy AlgaTox. Byl schopen lépe regulovat teplotu – teplota v minitermostatu se zabudovaným řízením se v průběhu 24 h pohybovala v rozmezí $\pm 0,5$ °C od nastavené teploty.

Dále bylo nutné zajistit v minibioreaktoru míchání. Míchadlo ze systému AlgaTox nebylo možné použít (nebylo konstrukčně uzpůsobeno vyvinutému sterilizačnímu procesu). Míchání v reaktoru bylo zajištěno interním míchadlem BVT Technologies. Toto míchadlo disponuje dvěma vývody pro přívod plynů do reaktoru. V rámci této práce byl jeden vývod použit pro vhánění vzduchu do reaktoru, druhý vývod pro vhánění mlhy peroxidu vodíku do reaktoru při dekontaminačním procesu.

Vyvinutý minibioreaktor disponuje třemi sondami, pomocí nichž je možné monitorovat stav uvnitř reaktoru – teplotní, pH a kyslíkovou. Pro tyto sondy byly stanoveny hodnoty časových konstant ustálení odezvy.

Dále byl vyvinut dekontaminační proces pro vyvinutý minibioreaktor. Dekontaminace je sestavena z *fáze 0* – čištění reaktoru, *fáze 1* – vhánění mlhy 33% peroxidu vodíku přes míchadlo do reaktoru a *fáze 2* – vypuzení zbytků peroxidu vodíku z reaktoru proudem vzduchu. Při vyvíjení dekontaminačního procesu bylo nutné ověřit, zda po dekontaminačním procesu nebylo v reaktoru přítomno zbytkové množství peroxidu vodíku. Proto byl zpracován postup na kvalitativní stanovení peroxidu vodíku v reaktoru. Účinnost dekontaminačního procesu byla ověřena pomocí inkubace komplexního živného média Nutrient Broth v reaktoru a následným roztěrem na agarové plotny.

Také byl sestaven operační postup pro kultivace mikroorganismů ve vyvíjeném zařízení. Transport kapaliny z/do reaktoru je prováděn přes zátku se septem, pomocí sterilní jehly a stříkačky.

Vyvinuté zařízení (o pracovním objemu 4 až 8 ml) bylo testováno na biotechnologickém procesu syntézy poly(3-hydroxybutyrátu) bakterií *Halomonas halophila*, kdy měl být sledován vliv salinity na produkci polymeru. Pro přívod vzduchu do kapaliny byly testovány tři sestavy. Vzduch byl do kapaliny vháněn kanylou (o průměru 2 mm), aeračním věncem a sedmnácti drobnými kanylami. Jak se ukázalo, ani jedna ze zhotovených sestav nebyla schopna buněčné kultury zajistit dostatečný přísun kyslíku. Při následujícím vývoji zařízení bude nutné zhotovit novou sestavu pro přívod vzduchu do kapaliny v reaktoru. Jako jedna ze slibných variant se jeví aerační věnec zhotovený z membránové trubice, který by do kapaliny uvolňoval velké množství malých bublin vzduchu.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ERICKSON, Larry E. Bioreactors. In: Thomas M. SCHMIDT, ed. *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)* [online]. Oxford: Academic Press, 2019 [vid. 2021-07-30], s. 536–541. ISBN 978-0-12-811737-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20813-3
- [2] PÁČA, J. Bioreactors. I. Classification of reactors. *Kvasny Prumysl* [online]. 1987, **33**(1), 20–21. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp1987006
- [3] *Laboratory Bioreactors / Fermentors | Major Science Lab Tools Manufacturers* [online]. [vid. 2021-07-28]. Dostupné z: <https://www.majorsci.com/lab-bioreactors-fermentors.html>
- [4] SERIOUS, Mostly. Stainless Steel Bioreactors, Fermentation Vessels, and Batch Reactors. *Holloway America* [online]. [vid. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://hollowayamerica.com/products/stainless-steel-tanks/bioreactors/>
- [5] *DASbox® Mini Bioreactor - Nádoby, Bioprocess - Eppendorf Česká republika* [online]. [vid. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://online-shop.eppendorf.cz/CZ-cs/Bioprocess-44559/Nadoby-66270/DASbox-Mini-Bioreactor-PF-60967.html>
- [6] KIRK, Timothy V a Nicolas SZITA. Oxygen Transfer Characteristics of Miniaturized Bioreactor Systems. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2013, **110**(4), 1005–1019. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.24824
- [7] CHEN, Zhu, Hong-Guang WANG, Zhao-Jun WEN a Yihuang WANG. Life sciences and biotechnology in China. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2007, **362**(1482), 947–957. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2007.2025
- [8] MODAK, Harendra, Chidanand RABINAL, Madhuri BIRADAR, Nalina M. a Chandrashekara K.N. Tools and Techniques in Biotechnology. In: *Basic Concept of Biotechnology* [online]. 1st vyd. B.m.: Laxmi Book Publication, nedatováno [vid. 2020-06-21], s. 346–416. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/271908784_Basic_Concept_of_Biotechnol ogy
- [9] KENNEDY, M. J., S. L. READER, D. KROUSE a S. HINKLEY. Process Optimization Strategies for Biotechnology Products: From Discovery to Production. nedatováno, **VOL. IV**.
- [10] *It's Not Just About Size: Talking about Shake Flasks and Bioreactors - Eppendorf Handling Solutions* [online]. [vid. 2020-06-22]. Dostupné z: <https://handling-solutions.eppendorf.com/cell-handling/bioprocess/processes-and-applications/detailview/news/its-not-just-about-size-talking-about-shake-flasks-and-bioreactors/>
- [11] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2001. ISBN 978-80-200-0768-1.

- [12] SMITH, John E. *Biotechnology*. Cambridge, UK; New York: Cambridge University Press, 2009. Fifth edition. ISBN 978-0-511-46394-5.
- [13] *Přenos kyslíku v biotechnologii* [online]. B.m.: Masarykova univerzita. 2017 [vid. 2020-06-21]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2017/C9320/um/Prenos_kysliku.pdf
- [14] Biosan - Products. *Biosan* [online]. [vid. 2020-06-22]. Dostupné z: <https://biosan.lv/products/>
- [15] *Laboratorní bioreaktory / Fermentory | Reaktory* [online]. [vid. 2020-06-22]. Dostupné z: https://donaulab.cz/Produkty/Product-Line/productgroup12/1074/productgroup/1068?gclid=CjwKCAjwnK36BRBVEiwAsMT8WHKJh7q7_UrcW0CBzCqu1fWnrXC9S3CQBb-IRs1qx56ZFqWCYsFLbBoC7OgQAvD_BwE
- [16] Ambr® 15 fermentation - High Throughput Automated System. *Sartorius* [online]. [vid. 2020-06-22]. Dostupné z: <https://www.sartorius.com/en/products/fermentation-bioreactors/ambr-multi-parallel-bioreactors/ambr-15-fermentation>
- [17] *Small CellVessel standard SUB* [online]. [vid. 2020-06-22]. Dostupné z: <https://cercell.com/products/single-use-bioreactors/cellvessel-0-5-liter/>
- [18] *MT-1 Minithermostat* [online]. [vid. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://bvt.cz/produkt/mt-1/>
- [19] *TC6 Electrochemical Glass Cell* [online]. [vid. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://bvt.cz/produkt/tc6/>
- [20] *OE.D*.E** Oxygen Electrode* [online]. [vid. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://bvt.cz/produkt/oe/>
- [21] *ST1.* Universal Stirrer for screen printed and classical electrodes* [online]. [vid. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://bvt.cz/produkt/universal-stirrer-for-screen-printed-and-classical-electrodes-st1/>
- [22] LIČBINSKÝ, Roman, Martina BUCKOVÁ, Jiří HUZLÍK, Jan KREJČÍ, Blanka ŠEBESTOVÁ, Robert PLIČKA, Iva VENTRUBOVÁ a Jana POSPÍCHALOVÁ. *Indikace znečištění životního prostředí přístrojem na principu biosenzoru - METODIKA uplatnění výsledku výzkumu*. 2015
- [23] KREJČÍ, Jan, Lucie JEŽOVÁ, Blanka ŠEBESTOVÁ, Robert PLIČKA, Lenka KLUSÁKOVÁ, Iva VENTRUBOVÁ, Martina BUCKOVÁ a Roman LIČBINSKÝ. Analytický fotobioreaktor. PV. CZ 305687. 23. prosinec 2015.
- [24] KREJČÍ, Jan, Lucie JEŽOVÁ, Blanka ŠEBESTOVÁ, Robert PLIČKA, Lenka KLUSÁKOVÁ, Iva VENTRUBOVÁ, Martina BUCKOVÁ a Roman LIČBINSKÝ. Analytický fotobioreaktor. PUV. CZ 27636. 7. leden 2015.
- [25] HOLČÍK, Jiří a Otakar FOJT. *Modelování biologických systémů: (vybrané kapitoly)*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta elektrotechniky a informatiky, 2001. ISBN 978-80-214-2023-6.

- [26] JACQUEZ, John A. *Compartmental Analysis in Biology and Medicine*. 1972.
- [27] BASSINGTHWAIGHTE, James, Erik BUTTERWORTH, Bartholomew JARDINE a Gary RAYMOND. Compartmental modeling in the analysis of biological systems. *Methods in Molecular Biology* [online]. 2012, **929**, 391–438. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-50-2_17
- [28] DORF, Richard C. a Robert H. BISHOP. *Modern control systems*. Internat. ed., 12. ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson/Prentice Hall, 2011. ISBN 978-0-13-138310-4.
- [29] HADDOW, A. TESTING, NONLINEAR SYSTEM. In: S. BRAUN, ed. *Encyclopedia of Vibration* [online]. Oxford: Elsevier, 2001 [vid. 2021-07-22], s. 1285–1289. ISBN 978-0-12-227085-7. Dostupné z: doi:10.1006/rwvb.2001.0040
- [30] ZAPLETAL, M. a J. TREJBAL. Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy. *Chemické listy*. 2016, **110**(12), 860–867. ISSN 1213-7103.
- [31] KOLLER, Martin. A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. *Fermentation* [online]. 2018, **4**(2), 30. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation4020030
- [32] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research* [online]. 2016, **192**, 271–282. ISSN 0944-5013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2016.07.010
- [33] CIESIELSKI, Slawomir, Justyna MOZEJKO a Grzegorz PRZYBYŁEK. The influence of nitrogen limitation on mcl-PHA synthesis by two newly isolated strains of *Pseudomonas* sp. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2010, **37**(5), 511–520. ISSN 1476-5535. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-010-0698-5
- [34] SHANG, L. G., S. C. YIM, H. G. PARK a H. N. CHANG. Sequential feeding of glucose and valerate in a fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for production of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with high 3-hydroxyvalerate fraction. *Biotechnology Progress* [online]. 2004, **20**(1), 140–144. ISSN 8756-7938. Dostupné z: doi:10.1021/bp034232o
- [35] DOI, Yoshiharu, Masao KUNIOKA, Yoshiyuki NAKAMURA a Kazuo SOGA. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from carbon-13 labeled acetate and propionate. *Macromolecules* [online]. 1987, **20**(12), 2988–2991. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma00178a006
- [36] MAESTRO, Beatriz a Jesús M. SANZ. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology* [online]. 2017, **10**(6), 1323–1337. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.12718
- [37] AL-BATTASHI, Huda Sultan, Neelamegam ANNAMALAI, Nallusamy SIVAKUMAR, Saif AL-BAHRY, Bhumi Nath TRIPATHI, Quang D. NGUYEN a Vijai Kumar GUPTA. Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [online]. 2019, **18**(1), 183–205. ISSN 1572-9826. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-018-09488-4

- [38] OBRUČA, Stanislav. *Controlled production and degradation of selected biomaterials | Request PDF* [online]. B.m., 2010 [vid. 2020-06-23]. Doctoral thesis. Brno University of Technologies. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/206071918_Controlled_production_and_degradation_of_selected_biomaterials
- [39] CHAN, Siew Yin, Benjamin Qi Yu CHAN, Zengping LIU, Bhav Harshad PARIKH, Kangyi ZHANG, Qianyu LIN, Xinyi SU, Dan KAI, Wee Sim CHOO, David James YOUNG a Xian Jun LOH. Electrospun Pectin-Polyhydroxybutyrate Nanofibers for Retinal Tissue Engineering. *ACS Omega* [online]. 2017, **2**(12), 8959–8968. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.7b01604
- [40] KOVALCIK, Adriana, Stanislav OBRUCA, Michal KALINA, Michal MACHOVSKY, Vojtech ENEV, Michaela JAKESOVA, Marketa SOBKOVA a Ivana MAROVA. Enzymatic Hydrolysis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Scaffolds. *Materials* [online]. 2020, **13**(13) [vid. 2020-08-15]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma13132992
- [41] QUESADA, E., A. VENTOSA, F. RUIZ-BERRAQUERO a A. RAMOS-CORMENZANA. *Deleya halophila*, a New Species of Moderately Halophilic Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1984, **34**(3), 287–292. ISSN 0020-7713, 1465-2102. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-34-3-287
- [42] KUCERA, Dan, Iva PERNICOVÁ, Adriana KOVALCIK, Martin KOLLER, Lucie MULLEROVA, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, Jana NEBESAROVA, Michal KALINA, Ivana MAROVA, Vladislav KRZYZANEK a Stanislav OBRUCA. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology* [online]. 2018, **256**, 552–556. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2018.02.062
- [43] BREMER, Erhard a Reinhard KRÄMER. Responses of Microorganisms to Osmotic Stress. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2019, **73**(1), 313–334. ISSN 0066-4227, 1545-3251. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-micro-020518-115504
- [44] *Niklová čidla teploty - Ni 6180. Technický list* [online]. B.m.: Harlingen. Dostupné z: https://www.harlingen.cz/images/stories/HS%2020/CZ/Ni_6180.pdf
- [45] ŠVR, Í, Petr KA a Antonín MARHOUL. DEKONTAMINAČNÍ TECHNOLOGIE VYUŽÍVAJÍCÍ PÁRY PEROXIDU VODÍKU. *Chem. Listy*. 2010, 9.
- [46] BĚLUŠOVÁ, Anna. *ústní sdělení návrhu*. erven 2021
- [47] KREJČÍ, Jan. *Interní projekt BVT Technologies. Měření koncentrace peroxidu vodíku pro sterilizaci aerosolem peroxidu vodíku. Financováno firmou Nanosonic*. B.m.: BVT Technologies, a.s. 2010
- [48] KURE, Cathrine Finne, Solveig LANGSRUD a Trond MØRETRØ. Efficient Reduction of Food Related Mould Spores on Surfaces by Hydrogen Peroxide Mist. *Foods* [online]. 2020, **10**(1), 55. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10010055

- [49] MØRETRØ, Trond, Helge FANEUST, Annette FAGERLUND a Solveig LANGSRUD. Whole room disinfection with hydrogen peroxide mist to control *Listeria monocytogenes* in food industry related environments. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2019, **292**, 118–125. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.015
- [50] *trophon®2* [online]. [vid. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://www.nanosonics.us/products/trophon-2/>
- [51] KOMENDOVIÁ, Renata. *Praktikum z analytické chemie I* [online]. B.m.: VUT FCH. Dostupné z: [Dostupné z: https://www.vutbr.cz/elearning/](https://www.vutbr.cz/elearning/)
- [52] HOLODNIOK, Martin, Alois KLÍČ, Milan KUBÍČEK a Miloš MAREK. *Metody analýzy nelineárních dynamických modelů*. 1. Praha: ČSAV, 1986.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Schéma biotechnologického procesu [10]	8
Obrázek 2	Analytický fotobioreaktor AlgaTox, pohled na celou sestavu (vlevo), pohled na rozebíratelnou reakční celu (vpravo) [22].....	10
Obrázek 3	Technické uspořádání přístroje [22]	11
Obrázek 4	Kompartmentová analýza – indexování proměnných	12
Obrázek 5	Kompartmentový model funkce bioreaktoru – uzavřený systém	13
Obrázek 6	Kompartmentový model funkce bioreaktoru – otevřený systém.....	14
Obrázek 7	Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů [32]	14
Obrázek 8	Struktura granule PHA [36].....	15
Obrázek 9	Snímek z elektronového mikroskopu Halomonas halophila [41].....	16
Obrázek 10	Minitermostat bez řídicí elektroniky se širším teplotním rozsahem.....	20
Obrázek 11	Míchadlo ST1 (ze sestavy AlgaTox)	20
Obrázek 12	Interní míchadlo BVT Technologies (A – motor, B –hrubé nastavení polohy míchadla, C – jemné nastavení polohy míchadla, D – nástavec míchadla, E – vstupy pro přívod plynů do míchadla, F – připojení ke zdroji).....	21
Obrázek 13	Detailní pohled na vstupy pro přívod plynů – interní míchadlo BVT Technologies.....	21
Obrázek 14	Detailní pohled na použité sondy (A – kyslíková elektroda, B – teplotní sonda, C – pH elektroda, D – referentní elektroda).....	22
Obrázek 15	Příslušenství pro přívod vzduchu do kapaliny	23
Obrázek 16	Zátka pro transport kapaliny z/do bioreaktoru.....	23
Obrázek 17	Vodní vývěva – zdroj vzduchu obohaceného o mlhu peroxidu vodíku	24
Obrázek 18	Sestava pro sterilizaci minibioreaktoru mlhou peroxidu vodíku (A – generátor mlhy peroxidu vodíku, B – vstup pro vzduch do vývěvy, C – výstup z vývěvy – mlha peroxidu vodíku unášena v proudu vzduchu).....	24
Obrázek 19	Multimetr MPH471 (Monokrystaly)	26
Obrázek 20	Řídicí jednotka míchadla ST1	26
Obrázek 21	Sestava pro stanovení otáček míchadla (A – tělo míchadla ST1, B – nástavec míchadla pro kalibrace, C – magnet, D – Hallova sonda).....	27
Obrázek 22	Metoda vyhodnocení kalibrace míchadla	27
Obrázek 23	Vyhodnocení naměřených dat v programu Bioanalyzer	28
Obrázek 24	Nástavec pro ukotvení teplotní sondy a rtuťového teploměru.....	28
Obrázek 25	Závislost teploty na naměřeném odporu.....	33
Obrázek 26	Minitermostat s vlastním řízením – uzavřený systém	34
Obrázek 27	Minitermostat s externím řízením – srovnání teploty v reaktoru s laboratorní teplotou – otevřený systém (vzduchování nad hladinu, průtok vzduchu 35 ml·min ⁻¹)	35

Obrázek 28	Závislost teploty naměřené teplotní sondou v reaktoru na teplotě nastavené na minitermostatu	35
Obrázek 29	Minitermostat se zabudovaným řízením – srovnání teploty v reaktoru s laboratorní teplotou při přivádění vlhkého ohřátého vzduchu – otevřený systém	36
Obrázek 30	Kalibrace míchadla – závislost otáček míchadla na nastavení ovladače	37
Obrázek 31	Závislost časové konstanty kyslíkové elektrody na pracovním objemu reaktoru při různých otáčkách míchadla	38
Obrázek 32	Závislost naměřeného proudu na volbě otáček míchadla	38
Obrázek 33	Závislost časové konstanty pH elektrody na otáčkách míchadla.....	39
Obrázek 34	Napojení hadiček na sestavený minibioreaktor	40
Obrázek 35	System pro vlhčení přiváděného vzduchu (vlevo: zásobní láhev s bublačkou a destilovanou vodou – uzavřena pro účely sterilizace horkou parou, vpravo: vysterilizovaná sestava připravená k napojení na minibioreaktor.....	41
Obrázek 36	Aparatura pro absorpci vlhkého vzduchu vycházejícího z reakční cely.....	42
Obrázek 37	Závislost naměřeného proudu kyslíkové elektrody na látkovém množství peroxidu vodíku v reakční cele (při teplotě 26 °C)	42
Obrázek 38	Odezva kyslíkové elektrody po nedokonalém vypuzení peroxidu vodíku z reaktoru	43
Obrázek 39	Porovnání uzavřeného a otevřeného systému.....	44
Obrázek 40	Osazení reakční nádoby příslušenstvím (A – pH sonda, B – referentní elektroda, C – zátka pro transport kapaliny z/do reaktoru, D – teplotní sonda, E – kyslíková elektroda, F – zátka pro přívod vzduchu do kapaliny, G – míchadlo)	45
Obrázek 41	Teplotní záznam z pilotní kultivace.....	46
Obrázek 42	Záznam z kultivace 1 – provzdušňování kapaliny pomocí aeračního věnce.....	47
Obrázek 43	Záznam z kultivace 3 – provzdušňování kapaliny pomocí zátky se sedmnácti kanylami	48

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CCM	Czech Collection of Microorganisms
CNM	Complex Nutrient Medium
lcl	long-chain lenght
mcl	medium-chain lenght
NB	Nutrient broth
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
PHA	polyhydroxyalkanoát(y)
PWM	pulse width modulation
scl	short-chain lenght