

Speciální fermentační procesy

Určení kinetických konstant z experimentálních dat jednorázových kultivací

579

Ing. JAN PÁČA, CSc.

Vysoká škola chemicko-technologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha

ÚVOD

Zvyšování produktivity mikrobiálních výrob a jejich převod na velkokapacitní jednotky vyžaduje nejen měření a regulaci značného počtu veličin v průběhu kultivace mikroorganismů, ale současně i jejich rychlé vyhodnocování. Vzhledem ke specifčnosti mikrobiálních procesů, zvláště s přihlédnutím ke „stáří“ a „historii“ buněčné populace, tedy faktorům ovlivňujícím fyziologický stav inokula, je nutné pro návrh technologie a bioreaktoru zvládnout kinetiku těchto dějů a na základě kinetických dat zvolit vhodný matematický model, který je předpokladem optimalizace či provádění „scale-up“ výrobního procesu. V současné době je stále u mnoha druhů mikrobiálních výrob kinetika procesu známa pouze neúplně. Kromě toho mnoho nejasností zůstává i ve způsobu vyhodnocování kinetických dat.

Proto cílem této studie je porovnání několika matematických modelů s ohledem na vyhodnocení zkoumaného procesu. Těžištěm práce je analýza experimentálně získaných dat na číslicovém počítači s uplatněním objektivních kritérií při určování specifické růstové rychlosti v exponenciální fázi růstové křivky a rozbor jednotlivých způsobů simulace. Pro výpočet specifické růstové rychlosti byly použity tyto metody: model podle Kona [1], metoda aproximační přímky, metoda objektivního stanovení exponenciální fáze růstu a proložení logistickou funkcí [2]. Výpočetní algoritmy uvažovaných modelů jsou koncipovány s ohledem na zmenšování vlivu subjektivních chyb při vyhodnocování průběhu jednorázových kultivací.

1. TEORETICKÝ ROZBOR JEDNOTLIVÝCH MODELŮ

1.1 Model Kono

Kono [1] použil k popisu růstové křivky obecné rovnice reakční kinetiky ve tvaru rov. (1)

$$\frac{dX}{dt} = k_D C_M^m C_S^s - k_1 C_R \quad (1)$$

Rozdělil růstovou křivku na jednotlivé fáze pomocí mezních bodů představujících kritické koncentrace, ve kterých se mění řád reakce vztahovaný na koncentraci limitující živiny. Tímto způsobem odvodil autor z obecné rovnice (1) vztahy

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2)$$

$$X = X_C \cdot \exp[\mu(t - t_C)] \quad (3)$$

popisující exponenciální fázi růstu (obr. 1). Je tedy zřejmé, že při aplikaci tohoto modelu je nutno experimentálně zjištěné hodnoty růstové křivky rozdělit volbou mezních bodů na jednotlivé fáze. Tento postup však s sebou přináší subjektivní chyby do výsledků.

Postup určení specifické růstové rychlosti v exponenciální fázi růstu vychází z rov. (3). Linearizací obdržíme

$$\ln \frac{X}{X_C} = \mu(t - t_C) \quad (4)$$

Aplikace metody nejmenších čtverců odchylek na rov. (4) vede k minimalizaci výrazu

$$S = \sum_{i=L}^{i=C} [\mu(t_i - t_C) - \ln \frac{X_i}{X_C}]^2 \quad (5)$$

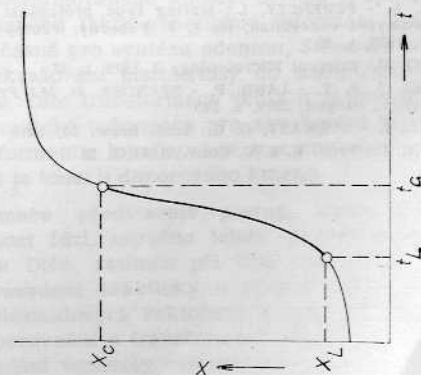
Z nutné podmínky pro minimum této funkce

$$\frac{\partial S}{\partial \mu} = 0 \quad (6)$$

určíme vztah pro výpočet hodnoty μ ve tvaru

$$\mu = \frac{\sum_{i=L}^{i=C} (t_i - t_C) \ln \frac{X_i}{X_C}}{\sum_{i=L}^{i=C} (t_i - t_C)^2} \quad (7)$$

Obě sumy jsou pro posloupnost experimentálních hodnot $(t_i; X_i)$ v rozsahu mezních bodů L a C omezujících exponenciální fázi růstu (obr. 1).



Obr. 1. Vymezení exponenciální fáze růstové křivky.

1.2 Přímé stanovení specifické růstové rychlosti v exponenciální fázi růstu (aproximační přímkou)

Exponenciální fáze růstu je definována rov. (2), ze které plyne, že

$$\mu = \frac{d \ln X}{dt} \quad (8)$$

Jelikož jde o exponenciální fázi, je závislost $\ln X_i = f(t_i)$ lineární a hodnotu μ je možno určit jako směrnici přímky aproximující danou posloupnost bodů $(\ln X_i; t_i)$ v rozsahu mezních bodů L a C . Metodou nejmenších čtverců odchylek se tedy určují konstanty regresní přímky

$$y = \alpha + \mu t \quad (9)$$

aproximující hodnoty $(\ln X_i; t_i)$ v daném intervalu.

Stejně jako při aplikaci modelu podle Kona se i zde zavádí subjektivní chyba při určování mezních bodů exponenciální fáze. Aproximace je však lepší, neboť aproximační funkce má dvě proměnné oproti jedné určované konstantně modelu Kono. U modelu podle Kona je snížena stupeň volnosti podmínkou proložení fixní (zvolené) hodnotou X_C .

1.3 Metoda objektivního stanovení intervalu exponenciální fáze a lag fáze

U předchozích obou metod při určování specifické růstové rychlosti se musí mezní body exponenciální fáze subjektivně odhadnout. Jelikož tento odhad může být zatížen subjektivní chybou, je zřejmě vhodné zabývat se možností strojového vymezení bodů spadajících do exponenciální fáze. Dalším důvodem pro nezbytnost tohoto postupu je rychlé vyhodnocení výsledků bez zásahu lidského faktoru, respektive využití takto získaných výsledků pro řízení procesu počítačem.

Z teoretického rozboru vyplývá nutnost určit lineární oblast závislosti $\ln X_i = f(t_i)$. Obecně se tedy hledají lineární úseky funkce

$$y(t) = \ln X(t) \quad (10)$$

Lineární závislost určené posloupnosti m hodnot byla testována pomocí korelačního koeficientu definovaného rov. (11)

$$R_{ty} = \frac{\sum ty - \frac{\sum t \sum y}{m}}{[(\sum t^2 - \frac{(\sum t)^2}{m})(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{m})]^{1/2}} \quad (11)$$

Hodnota $|R_{ty}|$ se pohybuje v rozsahu 0 až 1 a v případě lineární závislosti hodnot y a t je rovna 1.

Uvažovaný případ je naznačen na obr. 2. Výpočetní algoritmus může být tvořen těmito kroky:

a) Volíme $K = 1$ a počet testovaných bodů m se postupně zvětšuje na $m = 2, 3, \dots$. V případě, že koeficient korelace klesne pod danou hodnotu KR , bylo dosaženo konce prvního lineárního úseku (tzn. lag fáze).

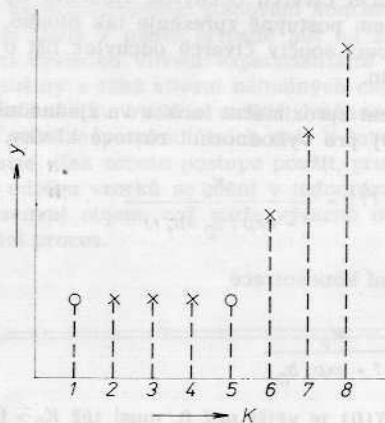
b) Položí se $K = K + m - 1$ a $m = 4$. Postupně se zvětšuje K o 1. V případě, že koeficient korelace vzroste nad KR , bylo dosaženo konce přechodové oblasti (fáze zrychleného růstu).

c) Ponechat dále $K = \text{konst.}$ a zvětšovat m až do hodnoty, při které koeficient korelace klesne pod KR . Tím je nalezena druhá lineární část (exponenciální fáze).

Uvažovaný algoritmus předpokládá vhodnou volbu mezního koeficientu korelace. V některých případech je tato volba dosti kritická a proto je nutno výpočet opakovat. Z toho důvodu je vhodné sestavit program pro konverzační způsob řešení.

Problematika tohoto způsobu řešení závisí ve volbě vhodné hodnoty mezního koeficientu korelace. Je-li tento koeficient zvolen příliš vysoký, ukončí program oblast exponenciálního růstu předčasně bodem, jehož hodnota je zatížena větší nahodilou chybou a vymezí se tedy pouze oblast začátku exponenciální fáze růstu. Naopak, je-li mezní koeficient korelace příliš nízký, nerozliší program dostatečně spolehlivě oblast exponenciálního růstu a může do ní zahrnout i jeden či více bodů z fáze zrychleného a zpomaleného růstu, čímž se zkresluje hodnota μ (menší než skutečná).

Na základě výsledků se ukázalo, že pro dosažení dostatečně přesných výsledků specifické růstové rychlosti je vhodné volit KR v rozsahu 0,984 až 0,996.



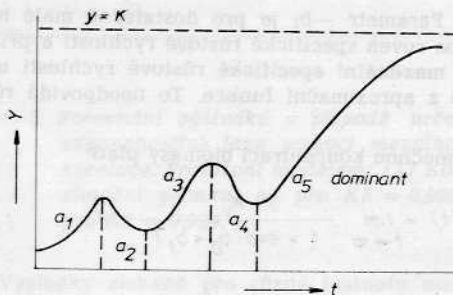
Obr. 2. Určení přímkových úseků dané funkce.

1.4 Aplikace logistické funkce

Růstová křivka a mnoho dalších biologických dějů vykazuje sigmoidální charakter. Zobecněná logistická funkce rov. (12)

$$X(t) = \frac{K_V}{1 + \exp [b_0 + b_1 t + b_2 t^2 + \dots + b_n t^n]} \quad (12)$$

je schopna popsat mnoho typů průběhů sigmoidálního charakteru [3–5]. Problémem tohoto způsobu proložení je však otázka fyzikálního či biologického významu jednotlivých konstant funkce (obr. 3). Nemají-li konstanty fyzikální nebo biologický význam, nelze hovořit o modelu, ale pouze o empirických (aproximačních) funkcích. Jejich využití spočívá v možnosti určení aktuální derivací průběhů sledovaných závislostí [nebo plochy pod křivkou], které jsou nutné pro stanovení rychlosti růstu, spotřeby substrátu [6] a tvorby produktu.



Obr. 3. Průběh obecné logistické funkce s polynomem n -tého stupně.

V předchozích případech určování specifické růstové rychlosti bylo nutno nejprve vymezit fázi exponenciálního růstu, a to z důvodu, že se prováděla pouze aproximační hodnot ležících v tomto intervalu. Edwards a Wilke [2] využívají logistické funkce poněkud jinak. Nejprve se provádí aproximace všech experimentálních dat [celé růstové křivky] funkcí daného tvaru. Tím se zajistí částečná eliminace nahodilých chyb experimentálního stanovení. Aproximační funkce se potom využije pro určení hledaných kinetických konstant.

Jsou-li $(X_i; t_i)$, pro $i = 1, 2, \dots, m$ experimentální hodnoty, je možno metodou nejmenších čtverců odchylek určit konstanty aproximační funkce. Program postupně volí hodnoty K_v a v linearizované funkci určuje hodnoty b_0, b_1, \dots, b_n . Jako kritérium správnosti aproximace se uvažuje součet čtverců odchylek. Hodnota K_v se iterativním způsobem postupně zpřesňuje tak dlouho, až se dva po sobě jdoucí součty čtverců odchylek liší o méně než zvolené číslo.

Zhodnocení aproximační funkce ve zjednodušeném tvaru (rov. 13) pro vyhodnocení růstové křivky.

$$X(t) = \frac{K_v}{1 + \exp(b_0 + b_1 t)} \quad (13)$$

a) Počáteční koncentrace

$$X(0) = \frac{K_v}{1 + \exp b_0} \quad (14)$$

Protože $X(0)$ je větší než 0, musí též $K_v > 0$.

b)

$$X'(t) = \frac{-K_v b_1 \exp(b_0 + b_1 t)}{[1 + \exp(b_0 + b_1 t)]^2} \quad (15)$$

Jelikož se jedná o růstovou křivku, je $X'(t) > 0$ a potom tedy je $b_1 < 0$. Pro žádnou hodnotu t není $X'(t) = 0$. Funkce tedy nemůže dobře aproximovat lag fázi ani stacionární fázi růstu. Pro $t = 0$ má tečna k aproximační funkci směrnici

$$X'(0) = -\frac{K_v b_1 \exp b_0}{[1 + \exp b_0]^2} \quad (16)$$

c) Pro specifickou růstovou rychlost platí

$$\mu = \frac{1}{X(t)} \cdot X'(t) = -\frac{b_1 \exp(b_0 + b_1 t)}{1 + \exp(b_0 + b_1 t)} \quad (17)$$

Pro $(b_0 + b_1 t) > 2$, tj. $b_1 < 0, t < \frac{2 - b_0}{b_1}$ je přibližně $\mu = -b_1$. Parametr $-b_1$ je pro dostatečně malé hodnoty t zhruba roven specifické růstové rychlosti a přibližně se rovná maximální specifické růstové rychlosti určené pro $t = 0$ z aproximační funkce. To neodpovídá růstové křivce.

d) Pro konečnou koncentraci biomasy platí

$$\lim_{t \rightarrow \infty} X(t) = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{K_v}{1 + \exp(b_0 + b_1 t)} = K_v \quad (18)$$

pro $b_1 < 0$.

Hodnota parametru K_v reprezentuje v limitě konečnou koncentraci buněk.

e) Význam parametru b_0

$$X(0) = \frac{K_v}{1 + \exp b_0} \quad (14)$$

$X(\infty) = K_v$, plyne z rov. (18)

Vyjádřením b_0 z rov. (14) a (18) dostaneme

$$b_0 = \ln \left[\frac{X(\infty)}{X(0)} - 1 \right] \quad (19)$$

Z matematického rozboru plyne, že uvedený model (rov. 13) neaproximuje dostatečně přesně růstovou křivku, neboť charakter aproximační funkce se poněkud liší od tvaru růstové křivky. Aproximační funkce má monotónní charakter bez extrémů. Zkreslení se projeví zvláště při aproximaci lag fáze a fáze zpomaleného růstu. Z provedeného rozboru modelu s ohledem na charakter růstové křivky plyne tato interpretace konstant aproximační funkce:

a) Parametr K_v udává limitu funkce $X(t)$ pro $t \rightarrow \infty$ a tedy koncentraci buněk ve stacionární fázi. Při menším počtu naměřených dat může být rozdíl mezi vypočtenou hodnotou K_v a hodnotou experimentálně zjištěnou až 10 %.

b) Hodnota $-b_1$ je přibližně rovna hodnotě μ určené modelem v čase $t < (2 - b_0) / b_1$.

c) Parametr b_0 je závislý na poměru koncentrace buněk ve stacionární fázi vůči počáteční koncentraci buněk při startu kultivace.

Zhodnocení obecné aproximační funkce podle rov. (12) pro vyhodnocení růstové křivky:

a) Počáteční koncentrace je dána opět rov. (14).

Opět platí, že $X(0) > 0$, musí být též $K_v > 0$.

b)

$$X'(t) = \frac{-K_v [b_1 + b_2 t + \dots + n b_n t^{n-1}] \exp(b_1 + b_2 t + \dots + n b_n t^{n-1})}{[1 + \exp(b_1 + b_2 t + \dots + n b_n t^{n-1})]^2} \quad (20)$$

Jelikož se jedná o růstovou křivku je $X'(t) > 0$, z čehož plyne $[b_1 + b_2 t + \dots + n b_n t^{n-1}] < 0$. Extrémy funkce nastávají pro $b_1 + b_2 t + \dots + n b_n t^{n-1} = 0$. Funkce má $(n - 1)$ extrémů, nikoli však pro $t = 0$. Proto nelze lag fázi dostatečně dobře aproximovat. Stacionární fázi je však možno aproximovat poměrně dobře.

c) Pro specifickou růstovou rychlost platí

$$\mu = \frac{1}{X(t)} \cdot X'(t) = -\frac{[b_1 + b_2 t + \dots + n b_n t^{n-1}] \exp(b_1 + b_2 t + \dots + n b_n t^{n-1})}{1 + \exp(b_1 + b_2 t + \dots + n b_n t^{n-1})} \quad (21)$$

Pro $b_0 + b_1 t + \dots + b_n t^n > 2$ je přibližně

$$\mu(t) = -(b_1 + b_2 t + \dots + n b_n t^{n-1}) \quad (22)$$

$$\mu(0) = -b_1$$

Hodnota $-b_1$ tedy přibližně udává okamžitou hodnotu specifické růstové rychlosti v čase $t = 0$, a to pouze za podmínky, je-li konstanta $b_0 > 2$.

d) Pro konečnou koncentraci buněk platí

$$\lim_{t \rightarrow \infty} X(t) = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{K_v}{1 + \exp(b_0 + b_1 t + \dots + b_n t^n)} = \begin{cases} K_v, & \text{pro } b_n < 0 \\ 0 & \text{pro } b_n > 0 \end{cases} \quad (23)$$

Parametr K_v může udávat konečnou koncentraci buněk ve stacionární fázi. Pokud je však stacionární fáze aproximována extrémem funkce $X(t)$, ztrácí parametr K_v biologický význam.

e) Význam parametru b_0

V případě, kdy konstanta K_p udává hodnotu koncentrace buněk ve stacionární fázi, pak konstanta b_0 je přibližně závislá na poměru buněk ve stacionární fázi a po inokulaci (stejně jako v rov. 19). Neplatí-li tato podmínka — bez interpretace.

Obecná aproximační funkce, která obsahuje polynom stupně $n \geq 2$, umožňuje relativně dobré proložení růstové křivky. Průběh aproximační funkce však nemusí být v závislosti na charakteru aproximovaných hodnot monotonní a může vykazovat extrémy, které pak vedou k nesprávnému určení specifické růstové rychlosti v některých oblastech růstové křivky, v nichž může derivace funkce $X(t)$ a tedy i hodnota μ nabývat záporné hodnoty.

Z matematického rozboru modelu aproximační funkce s ohledem na charakter růstové křivky vyplývá tato interpretace konstant:

a) Parametr K_p může, ale nemusí udávat koncentraci buněk ve stacionární fázi růstu.

b) Hodnota $-b_1$ je přibližně rovna μ určené modelem v čase $t = 0$ a je-li $b_0 > 2$. Nemá tedy prakticky žádný biologický význam.

c) Parametr b_0 může, ale nemusí být závislý na poměru koncentrace buněk ve stacionární fázi a na počátku kultivace.

Biologická interpretace konstant modelu je tedy značně problematická. Aproximace růstové křivky obecnou logistickou funkcí (rov. 12) je lepší než při použití funkce v rov. (13).

Ani tento model neumožňuje jednoznačně vymezit exponenciální fázi, což ovlivňuje hodnotu hledané specifické růstové rychlosti. Proto je možno kombinovat logistickou funkcí s některým z předcházejících postupů pro stanovení exponenciální fáze růstu.

2. EXPERIMENTÁLNÍ HODNOTY POUŽITÉ PRO MODELOVÁNÍ

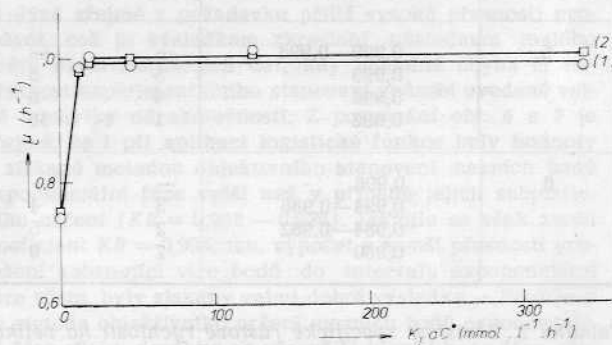
Experimentální hodnoty pro modelování byly získány z jednorázových kultivací prováděných v jednodstupňovém fermentoru. Při kultivacích bylo použito mikroorganismu *Klebsiella aerogenes* CCM 2318 z Československé sbírky mikroorganismů v Brně. Jako kultivačního média bylo použito minimální syntetické půdy podle Holmeho a Lindholma [7]. Zdrojem uhlíku a energie byla glukosa o koncentraci $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Kultivace se prováděly ve fermentoru v pracovním objemu 1700 ml při konstantní teplotě $30 \pm 0,2^\circ\text{C}$ a pH $7,0 \pm 0,1$ v závislosti na velikosti dodávky kyslíku rostoucí kultuře. Dodávka kyslíku byla regulována na základě změny koeficientu K_{La} změnami frekvence otáčení míchadla a velikostí aerace. Schéma zapojení fermentoru včetně popisu měření a regulace a provedení kultivací je uvedeno v předchozí práci [8]. Velikost dodávky kyslíku byla měřena sířičitanovou metodou [9, 10] a byla vyjádřena sířičitanovým číslem vzhledem ke změnám v hodnotách koeficientu K_{La} , které nastávají v průběhu jednorázové kultivace [11]. Velikosti dodávky kyslíku jako proměnné veličiny se využilo z těchto důvodů: 1. limitace kyslíkem je častým případem při kultivaci mikroorganismů, 2. vliv limitace růstu kyslíkem u fakultativních mikroorganismů je zajímavý z hlediska změny metabolismu z procesu aerobní respirace na fermentaci, 3. vliv limitace kyslíkem je z hlediska limitace růstu jinými živinami nejméně prozkoumána.

3. POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ A DISKUSE

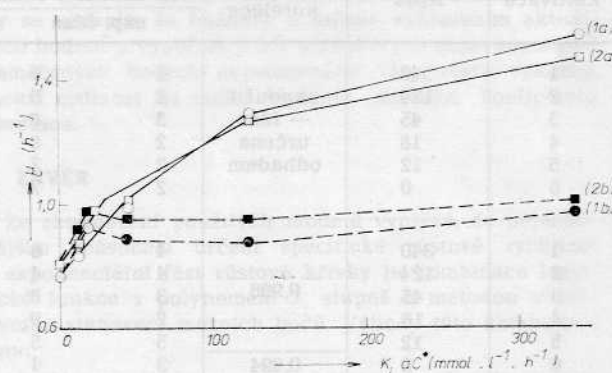
Určení hodnoty specifické růstové rychlosti, která je charakteristickým parametrem exponenciální fáze, je významně ovlivněno volbou mezních bodů. Proto byla

volbě délky intervalu věnována značná pozornost. Výsledky získané při různé volbě mezních bodů jsou pro jednotlivé kultivace a matematické modely uvedeny v tab. 1.

Z výsledků získaných podle modelu Kono bylo zjištěno, že v rozsahu mezního koeficientu korelace 0,999 až 0,988 vznikají největší rozdíly v hodnotách specifické růstové rychlosti za podmínek kultivace v přebytku kyslíku. Za podmínek limitace růstu kyslíkem jsou rozdíly podstatně menší (obr. 4 a 5). Lze tedy říci, že za podmínek kultivace v přebytku kyslíku je správná volba mezního koeficientu korelace, tzn. intervalu exponenciální fáze, obtížnější. Výsledky také ukázaly, že příliš vysoký požadavek přesnosti proložení je doprovázen malou šířkou intervalu, tedy malým počtem experimentálních bodů zahrnutých do výpočtu. S přihlédnutím k přesnosti metody experimentálního stanovení koncentrace buněčné sušiny je třeba v tomto případě mít na zřeteli výrazné zkreslení výsledku vlivem experimentální chyby ve stanovení sušiny a také vlivem náhodných chyb. Odstranění tohoto nedostatku by bylo možné dosáhnout stanovením většího počtu experimentálních dat. V laboratorním měřítku nelze však tohoto postupu použít, protože s velkým počtem odběru vzorků se mění v jednorázových kultivacích pracovní objem, což může výrazně ovlivnit vlastní kultivační proces.



Obr. 4. Porovnání výsledků v případě subjektivního odhadu intervalu exponenciální fáze. Proložení modelem: (1) Kono, (2) aproximační přímka.



Obr. 5. Porovnání výsledků v případě určení intervalu exponenciální fáze pomocí koeficientu korelace. Proložení modelem: (1) Kono, (2) aproximační přímka; a) pro $KR = 0,998 - 0,996$; b) pro $KR = 0,994$.

Výsledky získané pro různé hodnoty mezního koeficientu korelace aplikací aproximační přímky pro stanovení μ jsou v porovnání s výsledky z modelu Kono u všech kultivací celkově poněkud vyšší (tab. 1). Také při tomto

Tabulka 1. Porovnání hodnot specifické růstové rychlosti v exponenciální fázi určené různými metodami pro odlišné koeficienty korelace

Číslo kultivace	Mezní koeficient korelace	Index poč. bodu	Počet bodů	Hodnota μ				
				model KONO	aprox. přímkou	model Edwards		
						$n = 1$	$n = 3$	$n = 5$
1	0,999	6	4	1,188	1,202	0,866	1,038	1,059
	0,998—0,996	4	6	1,155	1,148	0,946	1,043	1,045
	0,994	4	7	0,982	1,071	0,882	0,979	0,980
	0,992	3	8	0,975	1,039	0,914	0,956	0,948
	0,990—0,986	2	11	0,822	0,918	0,820	0,797	0,785
	0,984	2	12	0,693	0,857	0,763	0,736	0,725
2	0,999	—	—	—	—	—	—	—
	0,998—0,996	4	4	1,129	1,128	1,031	1,093	0,986
	0,994—0,992	3	9	0,863	0,957	0,823	0,868	0,860
3	0,990—0,988	2	10	0,871	0,954	0,856	0,847	0,867
	0,999—0,998	—	—	—	—	—	—	—
	0,996	3	8	0,984	1,005	0,873	0,923	0,927
4	0,994	3	9	0,867	0,953	0,812	0,857	0,848
	0,992—0,988	4	8	0,849	0,940	0,775	0,856	0,848
	0,999	2	6	0,989	0,979	1,086	1,001	0,964
5	0,998—0,992	2	9	0,920	0,983	0,887	0,799	0,801
	0,990—0,988	2	10	0,788	0,915	0,817	0,734	0,724
	0,999—0,998	—	—	—	—	—	—	—
6	0,996	5	5	0,834	0,868	0,663	0,677	0,669
	0,994	4	6	0,871	0,916	0,700	0,702	0,683
	0,992	1	10	0,806	0,868	0,710	0,677	0,709
	0,998—0,996	3	4	0,768	0,800	0,873	0,824	0,764
7	0,984—0,982	2	5	0,728	0,730	0,881	0,816	0,792
	0,980	2	9	0,618	0,670	0,687	0,670	0,664

Tabulka 2. Závislost specifické růstové rychlosti na velikosti dodávky kyslíku pro empiricky a strojově stanovený interval exponenciální fáze

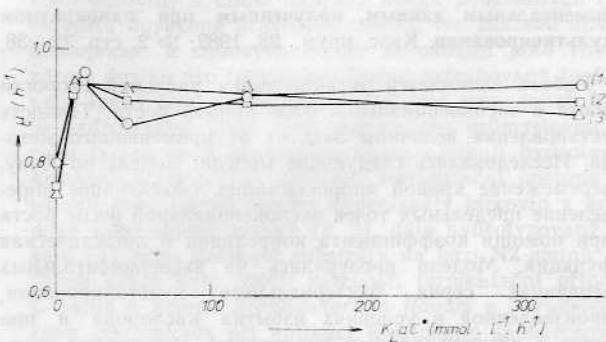
Číslo kultivace	Určení exponenciální fáze			Hodnota μ					
	Hodnota $K_{La}C$	Mezní koef. korelace	Index poč. bodu	Počet bodů	model KONO	aprox. přímkou	model Edwards		
							$n = 1$	$n = 3$	$n = 5$
1	340	nepoužit — fáze určena odhadem	2	9	0,965	1,010	0,941	0,909	0,897
				9	1,026	0,998	0,918	0,906	0,948
				8	0,984	1,005	0,873	0,923	0,927
				8	1,010	1,010	0,958	0,943	0,960
				7	0,970	0,960	0,937	0,928	0,943
				7	0,746	0,752	0,811	0,772	0,766
2	340	0,996	4	6	1,155	1,148	0,946	1,043	1,045
				4	1,129	1,128	1,031	1,093	0,990
				8	0,984	1,005	0,873	0,923	0,927
				9	0,920	0,983	0,887	0,799	0,801
				5	0,834	0,868	0,663	0,677	0,667
				4	0,768	0,800	0,873	0,824	0,764

způsobu stanovení specifické růstové rychlosti se projeví větší citlivost výsledku na volbě hodnoty KR za podmínek růstu v přebytku kyslíku. Z hlediska shody proložení experimentálních dat se jeví metoda aproximační přímkou v porovnání s modelem Kono jako vhodnější, což vyplývá z většího stupně volnosti při prokládání, jak je zřejmé ze srovnání rov. [7] a [9].

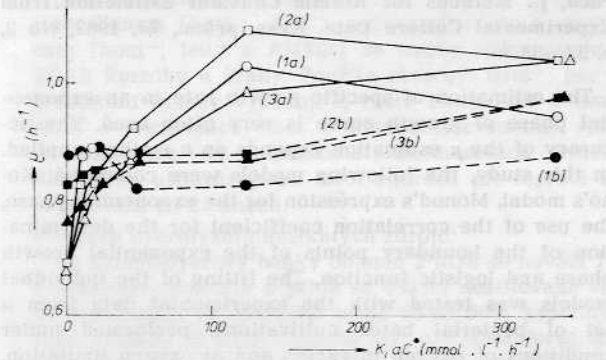
Dále byla k proložení experimentálních dat použita lo-

gistická funkce s polynomy prvního, třetího a pátého řádu. Na základě vypočtených konstant modelu se prokázalo, že použitím polynomu 1. stupně nelze dosáhnout dostatečné přesnosti proložení. Při použití modelu s polynomy 3. a 5. řádu se dosáhlo velmi dobrého proložení experimentálních dat. V dolní části růstové křivky lépe vyhovuje proložení s polynomelem 3. řádu, v horní části růstové křivky pak polynom 5. řádu. Jelikož rozdíly

v přesnosti proložení polynomu 3. a 5. řádu jsou velmi malé, lze za dostatečně vhodný považovat polynom 3. řádu. Vypočtené hodnoty μ pro jednotlivé polynomy pro všechny kultivace při různých hodnotách mezního koeficientu korelace jsou uvedeny v tab. 1. V porovnání s modelem Kono a metodou aproximační přímky je zřejmé, že hodnoty μ určené vyhlazením aktuálních hodnot μ vypočtených v jednotlivě experimentálně určených bodech exponenciální fáze růstu vykazují menší citlivost na volbě KR.



Obr. 6. Porovnání výsledků v případě subjektivního odhadu intervalu exponenciální fáze. Proložení logistickou funkcí s polynomem: (1) 1. řádu, (2) 3. řádu, (3) 5. řádu.



Obr. 7. Porovnání výsledků v případě určení intervalu exponenciální fáze pomocí mezního koeficientu korelace. Proložení logistickou funkcí: (1) 1. řádu, (2) 3. řádu, (3) 5. řádu; a) pro $KR = 0,998 - 0,996$; b) pro $KR = 0,994$.

Konstanty logistické funkce K_v , b_0 , b_1 , které podle tvrzení Edwardse a Wilkeho [2] mají mít biologický význam, jsou značně odlišné od experimentálních výsledků. Hodnota K_v je v případě růstu za podmínek přebytku kyslíku zhruba o 50 % vyšší, než je experimentálně zjištěná koncentrace buněčné sušiny ve stacionární fázi. Za podmínek růstu v limitu kyslíkem je hodnota K_v dokonce více než dvojnásobně vyšší vůči experimentu. Konstanta $-b_1$, která by měla odpovídat hodnotě μ nejen kvantitativně neodpovídá, ale za určitých podmínek vykazuje dokonce i záporné hodnoty. Na základě získaných výsledků lze proto konstatovat, že žádná z konstant logistické funkce typu podle rov. (12) nemá kvantitativní biologický význam.

Porovnání vypočtených hodnot specifické růstové rychlosti v exponenciální fázi růstu získaných z kultivací provedených při různé velikosti dodávky kyslíku pro oba způsoby volby intervalu exponenciální fáze je uvedeno v tab. 2 a na obr. 4–7. V případě subjektivního odhadu

exponenciální fáze růstu vykazují hodnoty specifické růstové rychlosti za podmínek růstu v přebytku kyslíku prakticky konstantní průběh při aplikaci všech modelů (obr. 4 a 6). Nejlepších výsledků s nejmenším rozptylem je dosáhlo u modelu proložení aproximační přímky. Poněkud větší kolísání se projevilo u modelu podle Kona a největší při použití logistické funkce. Dokonce i proložení logistickou funkcí s polynomem 5. stupně vykazuje větší kolísání hodnot μ než oba předchozí modely. Z kvantitativního porovnání vyplývá, že při růstu populace buněk v přebytku kyslíku jsou hodnoty μ získané aplikací logistické funkce zhruba o 5 % nižší. Hodnoty μ za striktně anaerobních podmínek růstu jsou, s výjimkou proložení logistickou funkcí s polynomem 1. řádu, totožné. Subjektivní odhad mezních bodů exponenciální fáze růstu má za následek necitlivé rozlišení přechodu z oblasti přebytku kyslíku na růst limitovaný kyslíkem, což se projevilo ostrým přechodem.

Výrazně odlišné výsledky se projevily v případě určení exponenciální fáze růstu pomocí mezního koeficientu korelace. Zde, jak vyplývá z obr. 5 a 7, velmi záleží na volbě hodnoty KR. Při volbě vysoké hodnoty KR, tzn. při požadavku vysoké přesnosti, hodnoty specifické růstové rychlosti v oblasti růstu v přebytku kyslíku u modelu podle Kona a aproximační přímky s růstem $K_L a C^*$ trvale rostly. Vzrůst hodnoty μ za podmínek přebytku kyslíku je z hlediska biologického významu nepravděpodobný a vyplývá zřejmě z požadavku příliš vysoké přesnosti proložení, což je výsledkem zkreslení následkem malého počtu experimentálních dat, kdy náhodná chyba či nepřesnost experimentálního stanovení způsobí uvedené velké odchylky od skutečnosti. Z porovnání obr. 6 a 7 je zřejmé, že i při aplikaci logistické funkce byly hodnoty μ získané metodou objektivního stanovení mezních bodů exponenciální fáze vyšší než v případě jejich subjektivního určení ($KR = 0,998 - 0,996$). Jakmile se však zvolil koeficient $KR = 0,994$, tzn. výpočet s menší přesností proložení zahrnující více bodů do intervalu exponenciální fáze růstu, byly získány velmi dobré výsledky μ . Použije-li se metoda objektivního určení mezních bodů exponenciální fáze růstu, dosáhne se přesnější identifikace fáze přechodu kultury z podmínek přebytku kyslíku na podmínky limitace růstu kyslíkem. Také při tomto způsobu stanovení μ se ukázala větší citlivost výsledku na volbě KR za podmínek růstu kultury v přebytku kyslíku. V porovnání s modelem podle Kona a metodou aproximační přímky se ukázalo, že hodnoty μ určené vyhlazením aktuálních hodnot μ vypočtených v jednotlivých experimentálně naměřených bodech exponenciální fáze růstu vykazují menší citlivost na volbu hodnoty mezního koeficientu korelace.

4. ZÁVĚR

Ze zhodnocení použitých modelů vyplývá, že nejvhodnějším způsobem určení specifické růstové rychlosti v exponenciální fázi růstové křivky je kombinace logistické funkce s polynomem 3. stupně s metodou objektivního stanovení mezních bodů. Výhody této kombinace jsou:

- Při aproximaci experimentálních dat lze do značné míry eliminovat nahodilé chyby.
- Méně obtížný odhad mezního koeficientu korelace [menší citlivost KR na vypočtenou hodnotu μ]; z toho vyplývá úspora strojového času při konverzačním způsobu řešení.
- Logistická funkce umožňuje získání průměrné hodnoty μ z vyhlazených dat. Lze však současně získat i aktuální hodnoty μ zatížené však větší chybou. Tato funkce umožňuje získat aktuální hodnoty první a druhé derivace, které jsou žádoucí z hlediska řízení procesu počítačem.

d) Kombinace s metodou objektivního určení mezních bodů dovoluje citlivé rozlišení přechodu z nadbytku kyslíku do podmínek limitace růstu kyslíkem.

Z hlediska praktických aplikací lze výsledky shrnout takto:

a) Pro první odhad se doporučuje použití metody aproximační přímky a objektivním určením mezních bodů exponenciální fáze růstu (kratší strojový čas).

b) Pro získání přesnějších výsledků při studiu kinetiky procesu „scale-up“ apod. je nutno použít uvedenou kombinaci logistické funkce se strojovým odhadem mezních bodů exponenciální fáze.

c) Uvedený postup lze úspěšně aplikovat i na stanovení rychlosti tvorby produktů spojených i nespojených s růstem buněk.

Použité symboly

C_M	... koncentrace látky M , která reaguje s limitující živinou za vzniku buněčné hmoty
C_R	... koncentrace látky R , která je buňkami vylučována, hromadí se v médiu a potlačuje růst buněk
C_S	... koncentrace limitující živiny
X	... koncentrace buněčné sušiny
k_0, k_1	... koeficienty reakční rychlosti v rov. (1)
t	... čas
X_C	... koncentrace buněk na konci exponenciální fáze růstu (mezní bod)
X_L	... koncentrace buněk na začátku exponenciální fáze růstu (mezní bod)
R_{ty}	... korelační koeficient definovaný rov. (11)
y	... nezávisle proměnná v rov. (10)
m	... počet hodnot v posloupnosti naměřených dvojic $\{X_i; t_i\}$
K	... index počátečního bodu
KR	... mezní koeficient korelace
K_D	... konstanta v rov. (12)
b_0, b_1, \dots, b_n	... konstanty v rov. (12)
n	... stupeň polynomu v tab. 1 a 2
α	... konstanta regresní přímky rov. (9)
μ	... specifická růstová rychlost
K_{La}	... objemový koeficient přenosu kyslíku (h^{-1})
$K_{La}C^*$... sířičitanové číslo ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

Literatura

- [1] KONO, T.: *Biotechnol. Bioeng.* **10**, 1968, s. 105
- [2] EDWARDS, V. H., WILKE, C. R.: *Biotechnol. Bioeng.* **10**, 1968, s. 205
- [3] VERHULST, P. F.: *Mem. Acad. Roy. Bruxelles* **18**, 1844, s. 1
- [4] VERHULST, P. F.: *Mem. Acad. Roy. Bruxelles* **20**, 1846, s. 1
- [5] PEARL, R., REED, L. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **6**, 1920, s. 275
- [6] DEGN, H., LILEØR, M., LONSMANN IVERSEN, J. J.: *Biochem. J.* **136**, 1973, s. 1097
- [7] HOLME, T., LINDHOLM, B.: *Proc. Biochem.* **5**, (2), 1970, s. 7
- [8] PÁČA, J.: *Sborník VŠCHT E* **43**, 1975, s. 67
- [9] GREENHALGH, S. H., McMANAXEY, W. J., PORTER, K. E.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **23**, 1975, s. 143
- [10] COOPER, C. M., RERNSTROM, G. A., MILLER, S. A.: *Ind. Eng. Chem.* **36**, 1944, s. 504
- [11] PÁČA, J.: *Folia Microbiol.* **21**, 1976, s. 417

Páča, J.: Určení kinetických konstant z experimentálních dat jednorázových kultivací. *Kvas. prům.*, **28**, 1982, č. 2, s. 32–38.

Práce se zabývá stanovením specifické růstové rychlosti v exponenciální fázi růstové křivky. Přesnost stanovení hodnoty μ závisí na použité metodě. Byly testovány tyto modely: model podle Kona, proložení aproxi-

mační přímkou, objektivní stanovení mezních bodů exponenciální fáze růstu pomocí korelačního koeficientu a logistická funkce. Modely byly ověřeny na experimentálních hodnotách série bakteriálních kultivací provedených za podmínek přebytku kyslíku a při růstu v limitu kyslíku. Výsledky prokázaly, že nejvhodnější metodou ke stanovení μ je kombinace logistické funkce s polynomem 3. stupně s metodou objektivního stanovení mezních bodů.

Паца, Я.: Установление кинетических констант по экспериментальным данным, полученным при однократном культивировании. *Квас. прум.*, **28**, 1982, № 2, стр. 32–38.

Работа занимается установлением удельной скорости роста в экспоненциальной фазе кривой роста. Точность установления величины зависит от примененного метода. Исследовались следующие модели: модель по Кону, переживание кривой аппроксимации, объективное определение предельных точек экспоненциальной фазы роста при помощи коэффициента корреляции и логистическая функция. Модели проверялись на экспериментальных величинах серии бактериального культивирования, произведенной в условиях избытка кислорода и при росте с лимитированным кислородом. Результаты доказали, что самым подходящим методом для установления μ является комбинация логистической функции с полиномом 3-ей степени с методом объективного определения предельных точек.

Páča, J.: Methods for Kinetic Constant Estimation from Experimental Culture Data. *Kvas. prům.*, **28**, 1982, No 2, p. 32–38.

The estimation of specific growth rate in an exponential phase of growth curve is very often used. The accuracy of the μ estimation depends on a method applied. In this study, the following models were compared: Kono's model, Monod's expression for the exponential phase, the use of the correlation coefficient for the determination of the boundary points of the exponential growth phase and logistic function. The fitting of the individual models was tested with the experimental data from a set of bacterial batch cultivations, performed under conditions of oxygen in excess and at oxygen limitation. From the results it can be concluded that the most suitable method is the logistic function with the mathematical determination of boundary points using a correlation coefficient.

Páča, J.: Bestimmung der kinetischen Konstanten aus den Experimentaldaten einmaliger Kultivationen. *Kvas. prům.* **28**, 1982, No. 2, S. 32–38.

Die Arbeit behandelt die Bestimmung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit in der exponentialen Phase der Wachstumskurve. Die Genauigkeit der Bestimmung des μ -Wertes hängt von der angewandten Methode ab. Es wurden die folgenden Modelle getestet: das Modell nach Kono, Durchlegen einer Approximationsgeraden, objektive Ermittlung der Grenzpunkte der Exponentialphase des Wachstums mittels des Korrelationskoeffizienten und der logistischen Funktion. Die Modelle wurden an den Experimentalwerten einer Serie bakterieller Kultivationen geprüft, die bei Sauerstoffüberschuß und bei Wachstum im Sauerstofflimit durchgeführt wurden. Die Ergebnisse haben erwiesen, daß zur Bestimmung des μ die Kombination der logistischen Funktion mit dem Polynom des 3. Grades und der Methode der objektiven Ermittlung der Grenzpunkte am besten geeignet ist.