Lihovarství a drožděžství

Kontinuální kultivace mikroorganismů s částečnou recirkulací média - II. část

663.132-932

Ing. VLADIMÍR ŠIMEK - Ing. FRANTIŠEK ŠTROS, CSc., Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, Praha

ÚVOD

V I. části tohoto článku [3] se sledovalo zejména hromadění inhibujících látek vlivem recirkulace média. Za určitých zjednodušujících předpokladů byla sestavena materiální bilance inhibujících látek, které do procesu přicházejí jako nečistoty surovin, nebo vznikají při vlastní kultivaci jako metabolity. Rozbor podmínek byl proveden pro inhibitory v kapalné fázi a byla vyjádřena bilance odpadních vod.

Druhá část článku navazuje na předchozí výsledky a blíže je v ní popsána ještě uvedená alternativa recirkulace, kdy proud vzduchu odcházející z fermentoru (M_9) obsahuje též páry inhibitoru. Závěrem je uveden souhrn a zhodnocení některých poznatků a předpokladů.

1. Kontinuální kultivace mikroorganismů s částečnou recirkulací média s inhibitorem v kapalné i plynné fázi

1.1 *Materiálová bilance inhibitoru*

Jak bylo uvedeno, může proud vzduchu odcházející z fermentoru (M_9) u těkavých látek obsahovat ještě páry inhibitoru. Pokud toto množství lze vyjádřit pro určitý rozsah koncentrace a teploty v závislosti na koncentraci v kapalné fázi, např. „M_9 . konst . x", potom lze podle *obr. 2* napsat tuto materiálovou bilanci inhibitoru:

$$G_i\,dt = V\,dx + M_2\,(x + dx)\,dt + M_9 k_1\,(x + dx)\,dt \quad (8)$$

Vypuštěním členů vyššího řádu se získá diferenciální rovnice

$$\frac{dx}{G_i - (M_2 + M_9 k_1)\,x} = \frac{dt}{V}$$

Substitucí $M_2 + M_9 k_1 = A$ dostaneme

$$\frac{dx}{G_i - Ax} = \frac{dt}{V}$$

Získáme stejnou diferenciální rovnici jako v první části, jen konstanta $M_2 = A$. Po integraci bude

$$x = \frac{G_i}{M_2 + M_9 k_1}\left(1 - \frac{1}{e^{\frac{M_2 + M_9 k_1}{V}\,t}}\right) \quad (9)$$

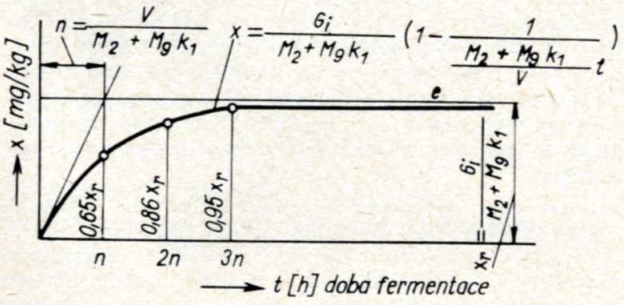
$$n = \frac{V}{M_2 + M_9 k_1} \quad (10)$$

$$x_r = \frac{G_s\,y}{M_2 + M_9 k_1} \quad (11)$$

Grafické znázornění je na *obr. 6.*

Protože je zde plynná i kapalná fáze, je vhodné vyjadřovat jednotlivé proudy v kg/h. Význam uvedených symbolů:

V	je objem fermentoru (náplň)	[kg]
M_2	— proud na sušárnu	[kg/h]
M_9	— proud vzduchu z fermentoru	[kg/h]
k_1	— součinitel	
x	— koncentrace inhibitoru	[mg/kg]
x_r	— rovnovážná koncentrace inhibitoru	[mg/kg]
t	— čas	[h]
n	— časová konstanta	[h]
G_i	— celkový přítok nebo vznik inhibitoru	[mg/h]
G_s	— produkce biomasy (v sušině)	[kg/h]
y	— specifické množství inhibujících látek přitékajících nebo vznikajících ve fermentoru na kg sušiny	[mg/kg]



Obr. 6

Uvedené parametry lze zjistit z údajů o technologickém procesu. Určité obtíže může činit zjištění součinitele k_1. Podle uvedeného předpokladu vlastně vyjadřuje v určité formě tzv. aktivní koeficient určité složky pro rovnováhu kapalné a plynné fáze v reálné soustavě. Protože pro některé látky a koncentrace se tyto koeficienty jen velmi obtížně získávají z literatury, je třeba je zjistit měřením.

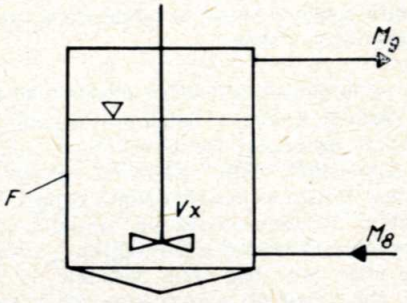
1.2 *Stanovení součinitele k_1 měřením*

Pro měření bylo nutno hledat podmínky, které se pokud možno nejvíce přibližují poměrům v provozním fermentoru. Z dostupných prostředků byl zvolen jako nejvhodnější laboratorní fermentor s míchadlem. Aby byl vyloučen možný vliv biochemické reakce, bylo jako náplně použito kvasného média s určitou koncentrací inhibitoru, ale bez kvasnic. Náplň se provětrávala proudem vzduchu, který odnášel páry inhibitoru. Protože množství par v odcházejícím proudu vzduchu je malé a jen

velmi obtížně by se dalo stanovit, byl měřen úbytek inhibitoru v kapalné fázi, který lze zjistit mnohem přesněji.

Pro zjištění úbytku inhibitoru v kapalné fázi by bylo nejjednodušší udržovat jeho koncentraci na konstantní hodnotě regulačním obvodem a měřit jeho přítok. Protože jde o velmi malé koncentrace, pro které nejsou k dispozici ani potřebná čidla, a celé zařízení by bylo dosti komplikované, byl zvolen jiný postup.

Podle tohoto postupu se ve fermentoru nastaví zvolená počáteční koncentrace inhibitoru x_0. Změří se v určitých časových intervalech úbytek inhibitoru v kapalné fázi a z matematické závislosti koncentrace na času se vypočte součinitel k_1.



Obr. 7

Na *obr. 7* je znázorněn laboratorní fermentor podle uvedeného popisu. Počneme-li provětrávat náplň, můžeme napsat materiálovou bilanci pro inhibitor

$$M_9 k_1 x \, dt = -V \, dx \qquad (12)$$

Po úpravě dostaneme diferenciální rovnici

$$\frac{dx}{x} = -\frac{M_9 k_1}{V}$$

Pro zjednodušení zavedeme $k_2 = \frac{M_9 k_1}{V}$,

potom je diferenciální rovnice

$$\frac{dx}{x} = -k_2 \, dt \qquad (13)$$

Po integraci bude

$$\ln x = -k_2 t + c$$

Pro podmínku $t = 0$, $x = x_0$ bude $c = \ln x_0$.

Obdržíme závislost x na t

$$\ln x_0 - \ln x = k_2 t \qquad (14)$$

nebo v jiné formě

$$x = x_0 \, e^{-k_2 t} \qquad (15)$$

Pro bližší určení této závislosti zjistíme některé hodnoty:

pro $t_1 = \frac{1}{k_2}$ bude $x = 0{,}37 \, x_0$

$t_2 = \frac{2}{k_2}$ $x = 0{,}14 \, x_0$

$t_3 = \frac{3}{k_2}$ $x = 0{,}05 \, x_0$

Grafické znázornění je na *obr. 8*.

Z rovnice (14) určíme součinitele k_2

$$k_2 = \frac{\ln x_0 - \ln x}{t}$$

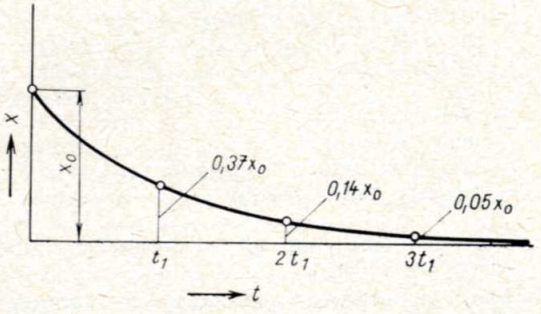
a dále součinitele k_1

$$k_1 = \frac{V}{M_9} k_2 \qquad (16)$$

Význam uvedených symbolů:

M_8	je proud vzduchu vstupující do laboratorního fermentoru	[kg/h]
M_9	— proud vzduchu vystupující z laboratorního fermentoru	[kg/h]
x	— koncentrace inhibitoru v kapalné fázi	[mg/kg]
x_0	— počáteční koncentrace inhibitoru v kapalné fázi	[mg/kg]
t	— čas	[h]
k_1	— součinitel	
k_2	— součinitel	[1/h]
V	— objem laboratorního fermentoru (náplň)	[kg]

Přesnost výpočtu závisí na určení součinitele k_1. Součinitel k_1 je tím přesnější, čím více se blíží podmínky při jeho měření podmínkám provozním. Jejich charakteristika je zejména určena systémem míchání a provzdušňování, rozsahem koncentrace těkavé složky, teplotou a případně tlakem.



Obr. 8

1.3 *Úlet z fermentoru*

Za použití součinitele k_1 lze vyjádřit množství par inhibitoru, které odnáší proud vzduchu z fermentoru. Tento způsob je možno s výhodou použít i na jiné těkavé složky, které popřípadě nejsou inhibitory. Jde např. o zjištění ztrát etanolu

$$\dot{U} = M_9 k_1 x \qquad (17)$$

kde

$\dot{U}$	je úlet těkavé složky (etanolu)	[mg/h]
M_9	— proud vzduchu z fermentoru	[kg/h]
k_1	— součinitel	
x	— koncentrace těkavé složky v kapalné fázi	[mg/kg]

2. Přehled a zhodnocení některých poznatků a předpokladů

2.1 *Kontinuální kultivace mikroorganismů bez recirkulace média*

Pro porovnání jsou uvedeny ve vhodné formě podmínky kontinuální kultivace mikroorganismů, která nastane přechodem z batch-procesu vytvořením tzv. ustáleného stavu, jenž je charakterizován tím, že koncentrace složek i přeměna volné energie ve fermentu jsou konstantní.

Nejdůležitější složkou je koncentrace mikroorganismů, na kterou je zaměřena regulace celého biochemického procesu. Její hodnota vyplývá ze závislosti růstu biomasy na času z tzv. růstové křivky. V batch-procesu je tato závislost dána vztahem

$$Z = Z_0 \, e^{\mu t} \qquad (18)$$

Nejvyšší bod této křivky se převádí na kontinuální proces. Přírůstek biomasy je dán derivací uvedeného vztahu

$$\frac{dZ}{dt} = \mu Z$$

Základní podmínkou kontinuálního procesu je rovnováha mezi tímto přírůstkem biomasy a jejím odběrem. Čili

$$\mu Z = DZ = G_s = \text{konst.} \qquad (19)$$

nebo $\mu = D$.

Ostatní složky se většinou dávkují nebo vznikají (metabolity) v závislosti na množství sušiny a lze je vyjádřit rovnicí

$$G_n = G_s y_n = \text{konst.} \qquad (20)$$

Rovnicemi (19) a (20) jsou vyjádřeny podmínky pro kontinuální kultivaci. Z těchto rovnic ještě vyplývá, že pro G_s = konst. by mělo být i složení G_s (biomasy) konstantní, tzn., že během cyklu by se nemělo měnit, např. obsah bílkovin by neměl kolísat.
Význam symbolů:

Z	je hmota biomasy ve fermentoru	[kg]
Z_0	— počáteční hmota biomasy ve fermentoru	[kg]
μ	— růstová rychlost	[1/h]
t	— čas	[h]
D	— zřeďovací rychlost	[1/h]
G_s	— množství sušiny	[kg/h]
y_n	— specifické množství určité složky	[kg/kg suš.]
G_n	— množství určité složky	[kg/h]

2.2 *Kontinuální kultivace mikroorganismů s částečnou recirkulací média*

Zavedeme-li recirkulaci odseparovaného média, trvá sice kontinuální produkce biomasy, ale poruší se ustálený stav tím, že se koncentrace některých složek ve fermentoru mění. Znamená to, že sice je splněna rovnice (19), ale poruší se rovnice (20). Vytvoření nového ustáleného stavu trvá přibližně dobu „$3n$". Za tuto dobu se nastaví nová rovnovážná koncentrace složky na hodnotu „x_r".

Při recirkulaci mohou nastat dva případy:

a) rovnovážná koncentrace určité složky je menší než limitní; kontinuální produkce biomasy trvá a nic se nemění,

b) rovnovážná koncentrace určité složky je větší než limitní, produkce biomasy se snižuje, popřípadě úplně zastavuje; musí se zmenšit stupeň recirkulace, nebo snížit obsah nečistot, metabolitů (inhibitorů) v procesu.

Protože je zvykem sledovat odvádění biomasy z fermentoru podle zřeďovací rychlosti

$$D_1 = \frac{M_1}{V},$$

bylo by asi vhodné vyjadřovat stupeň recirkulace jako odvádění kapalné fáze ze systému fermentace — separace též podle zřeďovací rychlosti

$$D_2 = \frac{M_2}{V}.$$

2.3 *Regulace biochemického procesu v ustáleném stavu*

Vztahy pro vytvoření nového ustáleného stavu platí pro libovolné složky, které se mění během výrobního cyklu v biochemickém procesu. Jde jak o inhibitory, tak i o stimulátory, např. o změny ve složení suroviny, vznik nových metabolitů, změny v dávkování živin apod. Tyto poznatky jsou důležité zejména pro regulaci procesu během výrobního cyklu, kdy každá změna vlastně znamená porušení ustáleného stavu a možnost překročení limitní koncentrace příslušné složky. Protože výrobní cyklus trvá poměrně dlouho, může způsobit i malá odchylka od ustálené hodnoty velkou změnu.

Vzhledem k tomu, že biochemický proces je poměrně složitý a jedná se o desítky až stovky složek, je velmi obtížné provádět regulaci na konstantní hodnotu jednotlivých složek, jak by vyplývalo z rovnic (19) a (20). Z řízení výrobního procesu jsou zkušenosti, že regulace na konstantní hodnotu hlavních složek má většinou po určité době za výsledek vyplavení kultury nebo větší spotřebu surovin. Proto je mnohem účinnější regulace podle okamžitého růstu biomasy. Zde je však velkým problémem vhodné čidlo. Při této regulaci se však též porušuje ustálený stav. Vytvoření nového ustáleného stavu každé složky se řídí dříve uvedenými závislostmi, přičemž je důležité sledovat možnost překročení limitní koncentrace jednotlivých složek.

2.4 *Intenzifikace procesu při produkci mikroorganismů*

Nejvyšší bod růstové křivky v batch-procesu se převádí na kontinuální produkci. Tento bod znamená, že ještě nenastává zpomalení růstu, způsobené jakýmikoli limitujícími faktory. Většinou je zatím limitujícím faktorem přenos kyslíku. Se zdokonalováním strojního zařízení a prohlubováním chemicko-inženýrských poznatků v této oblasti se však tento bod stále posunuje do vyšších koncentrací. Například při výrobě krmných kvasnic bylo dříve ve fermentoru 1 % kvasnic, dnes jsou to již 2 %.

Někdy je však výhodné mít např. ve fermentoru 2 % kvasnic, i když přenos kyslíku odpovídá jen 1 % sušiny. Znamená to snadnější separaci a menší množství odpadních vod. V tomto případě je však 1 % kvasnic ve fermentoru jen uskladněno a stejné podmínky by se vytvořily oddělením těchto kvasnic na separační stanici a vrácením veškeré tekuté fáze zpět do fermentoru. Z tohoto příkladu je zřejmé, že pokud je ve fermentoru více biomasy, než odpovídá růstové křivce, jde již o určitou formu recirkulace média.

Z uvedené úvahy vyplývá, že bude-li se recirkulovat až do limitních koncentrací, zjistí se mezní hodnoty intenzifikačního procesu. Zapojení recirkulace na *obr. 1* představuje vlastně model fermentoru, kde řízením recirkulace média se nastavují podmínky, odpovídající postupně až limitní koncentraci sušiny. Tím lze bez potřeby nákladného strojního zařízení na vysoký přenos kyslíku zjistit biochemické meze intenzifikačního procesu a tím i požadavky na maximální přenos kyslíku.

2.5. *Vliv biochemické reakce*

Uvedené vztahy a úvahy byly stanoveny za předpokladu, že inhibitory, které se přivádějí jako nečistoty nebo vznikají jako metabolity, se nezúčastňují biochemické reakce ve fermentoru. Pokud se inhibitory zúčastní této reakce, zmenší se jejich koncentrace ve fermentoru, v mezním případě k nulové hodnotě, tj. všechny se zpracují v biochemické reakci.

Podle průběhu reakce mohou nastat tyto případy:

1. *Nevznikají nové inhibitory jako metabolity*

a) inhibitory se zpracují v celém množství, jejich koncentrace je nulová,

b) inhibitory se zpracují jen částečně, úměrně k zpracovanému množství se nastaví jejich nižší koncentrace;

2. *Vznikají nové inhibitory jako metabolity*

a) stačí se zpracovat celé množství přiváděných inhibitorů, jejich koncentrace je nulová; nastaví se rovnovážná koncentrace nových inhibitorů;

b) nezpracují se všechny původní inhibitory, nastaví se úměrně ke zbylému množství jejich nižší rovnovážná

koncentrace; současně se nastaví rovnovážná koncentrace nových inhibitorů;

3. *Množství zpracovaných inhibitorů v biochemické reakci se mění s časem; limitní rovnovážná koncentrace inhibitorů též závisí na čase a mění se až po určité době.*

Z těchto poznatků vyplývá, že ke zjištění vlivu inhibitorů je nutné buď v provozních nebo laboratorních podmínkách měřit produkci biomasy v závislosti na různé rovnovážné koncentraci x_r. V případě, že hodnoty x_r nelze dobře měřit nebo se uplatňuje vliv biochemické reakce, změřit přiváděné množství inhibitorů ekvivalentní určité limitní koncentraci v závislosti na produkci sušiny pro určitou délku výrobního cyklu.

Literatura

[1] MÁLEK, I. et al.: Kontinuální kultivace mikroorganismů. ČSAV, 1934
[2] WHITE, I. - MUNNS, D. J.: Inhibitory effect of common elements towards yeast growth. J. Inst. Brew., **57**, 1951, č. 3, s. 175—179
[3] ŠIMEK, V. - ŠTROS, F.: Kontinuální kultivace mikroorganismů s částečnou recirkulací média. Kvasný průmysl **20**, 1974, č. 10, s. 217—220
[4] KADLEC, K. - LABÍK, V.: Výpočet koncentrace a úletu etanolu při aeračních procesech. Kvas. prům. **19**, 1973, č. 11, s. 247 až 252
[5] PERRY, J. H. Chemical Engineers Handbook, Mc-Grow Hill Book Comp. 1963

Šimek, V. - Štros, F.: Kontinuální kultivace mikroorganismů s částečnou recirkulací média — II. část. Kvas. prům. **21**, 1975, č. 10, s. 226—229.

Článek navazuje na publikaci v Kvasném průmyslu [3], v níž se sledovalo zejména hromadění inhibujících látek vlivem recirkulace média. Rozbor podmínek byl zde proveden pro inhibitory v kapalné fázi a byla vyjádřena bilance odpadních vod.

V druhé části článku je navázáno na předchozí výsledky a je blíže popsána ještě uvedená alternativa recirkulace, kdy inhibitory jsou v kapalné i plynné fázi. Protože se v literatuře jen obtížně získávají hodnoty aktivních součinitelů pro výpočet složky inhibitoru odcházejícího ve vzduchu, je uveden způsob měření a výpočtu součinitele k_1 v laboratorním fermentoru. Podle tohoto způsobu jsou vyjádřeny i ztráty lihu z fermentoru úletem v odcházejícím vzduchu.

Závěrem je uveden přehled a zhodnocení některých poznatků a předpokladů. Jsou zde srovnány podmínky pro kultivaci bez recirkulace a s recirkulací média. V této souvislosti je zhodnocena regulace biochemického procesu v ustáleném stavu a uveden postup, jak zjistit mezní hodnoty intenzifikace výrobního procesu, který stále probíhá. V případě, že inhibitory se zúčastní biochemické reakce, jsou uvedeny jednotlivé alternativy v souvislosti s vytvořením nové rovnovážné koncentrace inhibitoru.

Шимек, В. — Штрос, Ф.: Непрерывное разведение микроорганизмов в установках с частичной рециркуляцией среды. 2-ая часть. Квас. прум. **21**, 1975, № 10, стр. 226—229.

Настоящая статья дополняет статью отпечатанную в К. п. (3), в которой рассматривалось влияние накопления ингибирующих веществ в результате рециркуляции среды. Заключения распространялись на жидкостные ингибиторы. Был также составлен баланс сточных вод.

В настоящей статье рассматривается вариант рециркуляции, характеризованный присутствием ингибиторов в газовой и жидкой фазах. В доступной литературе нет точных данных о значениях коэффициентов активности, нужных для расчета доли ингибитора уходящей с воздухом и поэтому приведен метод измерения и расчета коэффициента k_1 в лабораторном ферментере. С помощью этого метода расчитаны потери спирта, уходящего из ферментера с воздухом.

В заключительной части статьи рассматривается приобретенный опыт и сравниваются условия разведения без рециркуляции и с рециркуляцией среды. Показана возможность регулирования хода биохимических процессов в установившемся состоянии. Указаны пределы до каких возможна интенсификация процессов. Для процессов, характеризованных тем, что ингибиторы принимают в них участие приведены условия образования равновесной концентрации ингибитора.

Šimek, V. - Štros, F.: Continuous Cultivation of Microorganisms in Installations with Partial Medium Recirculation. Part. II. Kvas. prům. **21**, 1975, No. 10, pp. 226—229.

In the first part of their article (see Kvasný průmysl [3]) the authors analyzed the concentration of inhibitors resulting from the recirculation of medium, paying attention only to inhibitors present in the liquid phase. They also presented the balance of waste water.

The second part of the article deals with a specific system of recirculation characterized by the presence of inhibitors both in liquid and gaseous phases. Since it is extremely dificult to find in available literature any reliable values of activity coefficients required for calculating the percentage of inhibtor escaping with air, the authors outline the method which can be applied to measure and calculate the value of coefficient k_1 for a laboratory fermenter. By applying the method the authors determine the losses of alcohol escaping from fermenter with air.

In the closing paragraphs the authors evaluate their experience, compare cultivation with and without recirculation, describe regulation of biochemical processes in steady state and give instructions, how to ensure optimum intensification of manufacturing processes. They also analyze various alternatives of processes in which inhibitors take part in biochemical reactions and specify conditions for equilibrium of inhibitor concentration.

Šimek, V. - Štros, F.: Kontinuierliche Kultivation der Mikroorganismen mit partieller Rezirkulation des Mediums — II. Teil. Kvas. prům. **21**, 1975, No. 10, S. 226—229.

Der Artikel knüpft an die Mitteilung in der Fachzeitschrift Kvasný průmysl [3] an, die über die Verfolgung der Anhäufung der inhibierenden Substanzen unter dem Einfluß der Rezirkulation des Mediums informierte. Die Analyse der Bedingungen wurde in der erwähnten Arbeit für Inhibitoren in fester Phase durchgeführt und es wurde auch die Abwässerbilanz ermittelt.

In dem zweiten Teil der Veröffentlichung wird an die vorherigen Ergebnisse angeknüpft und es wird die Rezirkulationsalternative mit den Inhibitoren in flüssiger Phase und in Gasphase beschrieben. Weil man aus der Literatur nur sehr schwierig die Aktivitätskoeffizienten zur Errechnung des in der Luft entweichenden Inhibitorenanteils gewinnen kann, beschreiben die Autoren die Messung und Errechnung des Koeffizienten k_1 im Laborfermentor. Nach diesem Verfahren sind auch die Spiritusverluste aus dem Fermentor durch Abflug in der entweichenden Luft ausgedrückt.

Zum Schluß wird die Übersicht und Auswertung der wichtigsten Erkenntnisse und Voraussetzungen angeführt. Es werden die Bedingungen für die Kultivation ohne und mit Rezirkulation des Mediums verglichen. In diesem Zusammenhang wird die Regulation des biochemischen Prozesses im stabilisierten Zustand behandelt und bewertet und das Verfahren zur Ermittlung der Grenzwerte der Intensifizierung des Produktionsprozesses beschrieben. Für den Fall, daß die Inhibitoren an der biochemischen Reaktion teilnehmen, werden die einzelnen Alternativen im Zusammenhang mit der Erreichung der neuen stabilisierten Inhibitorenkonzentration angeführt.