

# Kontinuální kultivace mikroorganismů s částečnou recirkulací média

663.132—932

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

Do redakce došlo 28. prosince 1973

## Úvod

V posledních desetiletích byly značně propracovány způsoby kultivace mikroorganismů, a to jak periodické, tak i kontinuální.

Při mikrobiální kultivaci, kde je cílem získat vlastní biomasu, je nejproduktivnější systém kontinuálního odběru mikroorganismů s částí média a kontinuálního přítoku živného média. Podmínkou kontinuální kultivace je rovnováha mezi přírůstkem biomasy a jejím odběrem [1]. Matematicky vyjádřeno

$$\mu = D \quad [1]$$

kde

$\mu$  je růstová rychlost

$D$  — zředovací rychlost.

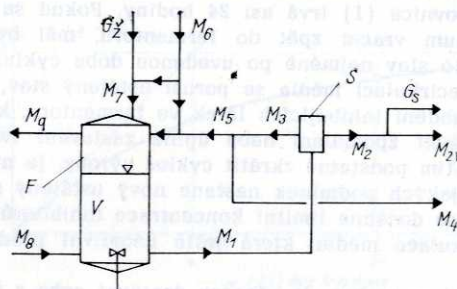
Za těchto podmínek se ustálí v kultivačním tanku určitá koncentrace mikroorganismů, jejíž hodnota bývá většinou určena jen schopností dodávky kyslíku do kapalné fáze. Nastane tzv. dynamický stav, charakterizovaný tím, že koncentrace složek i přeměna volné energie jsou konstantní.

Při průmyslové výrobě mikroorganismů tímto kontinuálním způsobem je však značným problémem likvidace velkého množství odpadních vod, které zde vzniká. Proto je snaha objem těchto vod omezit na nejmenší míru, několiknásobně jich využít vrácením zpět do fermentoru. Tato recirkulace má však za následek hromadění inhibujících látek (metabolitů) ve fermentoru.

## Kontinuální kultivace s částečnou recirkulací média

Dále je proveden rozbor podmínek kontinuální kultivace krmných kvasnic z etanolu při částečné recirkulaci

média. Na obr. 1 je znázorněna část linky na výrobu krmných kvasnic, a sice fermentace a separace.



Obr. 1

F — fermentor, S — separační stanice,  $M_1$  — odtah na separaci,  $M_2$  — proud na sušárnu,  $M_{2V}$  — kapalná část proudu  $M_2$ ,  $G_3$  — hmota kvasnic v proudu  $M_2$ ,  $M_3$  — zpětná proudy do fermentoru,  $M_4$  — odpadní voda na čističku,  $M_5$  — přítok čisté vody,  $M_7$  — přítok živného média (surovina a soli),  $M_8$  — přívod vzduchu,  $M_9$  — odvod vzduchu,  $G_2$  — přívod koncentrovaných živin a suroviny, V — účinný ojem fermentoru.

Pro bilanci kapalně fáze (odpadní vody) si pro zjednodušení představíme, že přivádíme surovinu a živiny v koncentrovaném stavu v proudu  $G_2$  a veškerou čistou vodu do procesu, jedním proudem  $M_6$ , z kterého ředíme (rozpuštění) živiny na provozní koncentraci. Výstupní proud do sušárny  $M_2$  si představíme jako proud kapalně fáze  $M_{2V}$  a proud  $G_3$  kvasnic ve 100 % sušině.

Vlastní proces tvorby biomasy ve fermentoru představuje složitou problematiku jak po stránce biochemických reakcí, tak i po stránce chemicko-inženýrských operací. V obou těchto oblastech se stále získávají nové poznatky, které se projevují i v oblasti přesných materiálových bilanci celého procesu. Pro naše účely prove-



deme některé zjednodušující předpoklady, které ještě neovlivní regulaci provozu, když produkce biomasy je stálá.

### Předpoklady pro materiální bilanci kapalně fáze (odpadní vody)

Pro dosažení ustáleného stavu při kontinuální kultivaci se měří koncentrace mikroorganismů ve fermentoru a podle této koncentrace se regulují jednotlivé proudy, aby byla splněna podmínka v rovnici (1). Regulace se provádí automaticky a udržuje se konstantní hladina ve fermentoru. Průtoky v jednotlivých proudech se měří v  $\text{m}^3/\text{h}$ . Aby byla zajištěna konstantní hladina ve fermentoru, musí platit následující materiálová bilance pro přítok a odtok všech proudů do uvažovaného systému fermentace — separace v ustáleném stavu:

$$G_z + M_6 + M_8 = G_s + M_{2v} + M_4 + M_9 \quad (2)$$

Hmota kvasnic se tvoří z proudu  $G_z$ ,  $M_8$  a  $M_6$  při biochemické reakci a metabolity odchází v proudech  $G_s$ ,  $M_{2v}$ ,  $M_4$  a  $M_9$ . Přibližně můžeme předpokládat, že

$$G_z + M_8 \approx G_s + M_9$$

Budeme-li dále předpokládat, že  $M_4 = 0$ , tj. že neodchází odpadní voda na čistící stanici, bude přibližně uvedená materiálová bilance

$$M_6 \approx M_{2v} \quad (3)$$

Tato rovnice platí jen přibližně, protože při biochemické reakci vzniká též určité množství čisté vody, které odchází v proudu  $M_2$ . Protože množství této vzniklé vody nelze dobře provozně měřit, je výhodnější měřit přítok veškeré čisté vody  $M_6$ , přiváděné do procesu, a při přesné bilanci připočítat ještě toto množství určitým koeficientem k proudu  $M_6$ .

### Předpoklady pro materiálovou bilanci inhibitorů

Teoreticky by ustálený stav při kontinuální produkci biomasy měl trvat nekonečně dlouho. Prakticky postačí např. doba deseti — čtyřiceti dnů pro jeden výrobní cyklus. Vytvoření ustáleného stavu pro produkci biomasy podle rovnice (1) trvá asi 24 hodiny. Pokud se nebude médium vracet zpět do fermentoru, měl by se udržet tento stav nejméně po uvedené době cyklu. Při částečné recirkulaci média se poruší ustálený stav, nastává hromadění inhibujících látek ve fermentoru, které může způsobit zpomalení nebo úplné zastavení tvorby biomasy a tím podstatně zkrátit cyklus výroby. Je nutno zjistit, za jakých podmínek nastane nový ustálený stav, popř. kdy se dosáhne limitní koncentrace inhibitorů vlivem recirkulace média, která ještě neovlivní produkci biomasy.

Inhibitory se mohou do procesu dostávat nebo z něho odcházet jen v proudech, uvedených v rovnici (2). Jejich koncentrace jsou však velmi různé a v těchto proudech jsou obsaženy většinou jen ve stopových množstvích. Zhodnocení jednotlivých proudů:

- proud  $G_z$  — přívod suroviny a živin (popř. po rozpuštění proud  $M_7$ ). Inhibitory zde přicházejí jako nečistoty v surovině a v živinách (např. ve formě různých toxických látek) (2).
- proud  $M_6$  — je čistá voda; předpokládáme, že neobsahuje inhibující látky.
- proud  $M_8$  — přívod vzduchu; předpokládáme, že neobsahuje inhibující látky.
- proud  $M_9$  — odvod vzduchu a plynné fázi metabolitů; může obsahovat parní fázi inhibitorů, pokud jde o těkavé látky. Zatím předpokládáme, že neobsahuje inhibující látky.
- proud  $M_2$  ( $G_s$ ,  $M_{2v}$ ) — odtah na sušárnu; předpokládáme, že obsahuje stejnou koncentraci inhibitorů, jako je ve fermentoru, a že je stejná ve vodní fázi i v kvasnicích.

Inhibitory však mohou též vznikat při biochemických reakcích ve fermentoru při tvorbě biomasy jako metabolity. Jakmile nastane ustálený stav pro tvorbu biomasy (tj. přibližně za 24 hodiny), je tvorba biomasy i metabolitů konstantní, jak je uvedeno v rovnici (1). To znamená, že tvorba metabolitů je v konstantním poměru k tvorbě biomasy. Zavedením recirkulace média porušíme ustálený stav, neboť hmotový podíl určitého inhibitoru (metabolitu) v přívodu do fermentoru zvyšujeme, což způsobuje i zvyšování jeho koncentrace ve fermentoru. Tvorba biomasy je stálá, dosud se nedosáhne limitní koncentrace inhibitorů, při které se začne produkce zpomalovat. Předpokládáme, že i v tomto období bude tvorba inhibujících látek (metabolitů) v konstantním poměru k tvorbě biomasy. Vyjádříme-li uvedené předpoklady ve formě rovnice, bude pro přítok nebo vznik inhibitorů platit

$$G_i = G \cdot x_1 + R_i = M_7 \cdot x_3 + R_i$$

kde

$G_i$  je celkový přítok a vznik inhibitorů v g/h,

$x_1$  — hmotový podíl inhibitorů v živinách a surovině,

$x_3$  — hmotový podíl inhibitorů v proudu  $M_7$ ,

$R_i$  — vznik inhibitoru při biochemické reakci ve fermentoru při ustáleném stavu.

Podle uvedeného předpokladu můžeme též napsat

$$G_i = G_s \cdot y \quad (4)$$

kde

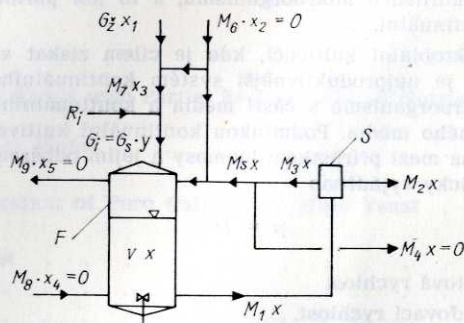
$G_s$  je produkce biomasy (v sušině) v t/h,

$y$  — specifické množství inhibujících látek, přítékajících nebo vznikajících ve fermentoru na t sušiny.

Toto vyjádření je výhodné, protože všechny suroviny vstupující do procesu se odměřují na t vyrobené biomasy (v sušině) jako spotřební materiálové normy, z čehož plyne i příslušný podíl nečistot (inhibitorů).

### Materiálová bilance inhibitorů

Pro uvedené předpoklady při částečné recirkulaci média je znázorněna na obr. 2 materiálová bilance inhibitorů v časovém období, než nastane jeho limitní koncentrace ve fermentoru.



Obr. 2

Podle uvedených předpokladů  $M_4 \cdot x = 0$ ;  $M_6 \cdot x_2 = 0$ ;  $M_8 \cdot x_4 = 0$ ;  $M_9 \cdot x_5 = 0$

kde

$x$  je hmotový podíl ve fermentoru a v proudech  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_5$ . Předpokládáme, že je ve všech těchto proudech stejný.

$x_2$  — hmotový podíl inhibitoru v proudu  $M_6$ ,

$x_4$  — hmotový podíl inhibitoru v proudu  $M_8$ ,

$x_5$  — hmotový podíl inhibitoru v proudu  $M_9$ .

V určitém časovém okamžiku „t“ po zavedení recirkulace je účinný objem fermentoru  $V$  ( $\text{m}^3$ ) a koncentrace inhibujících látek ve fermentoru  $x$  ( $\text{g}/\text{m}^3$ ), množství vody a kvasnic odcházející na sušárnu  $M_2$  ( $\text{m}^3/\text{h}$ ). Po uplynutí časového intervalu „dt“ bude koncentrace  $(x + dx)$  a můžeme napsat materiálovou bilanci inhibitorů



$$G_i dt = V dx + M_2 (x + dx) dt \quad (5)$$

Zanedbáme člen vyššího řádu, oddělíme proměnné a dostaneme diferenciální rovnici

$$\frac{dx}{G_i - M_2 x} = \frac{dt}{V}$$

která po integraci má tvar

$$-\frac{1}{M_2} \ln [G_i - M_2 x] = \frac{1}{V} t + c$$

Pro podmínku  $t = 0$  je  $x = 0$ , stanovíme  $c =$

$$-\frac{1}{M_2} \ln G_i$$

Po dosazení a úpravě dostaneme závislost „ $x$ “ na čase „ $t$ “.

$$x = \frac{G_i}{M_2} \left( 1 - e^{-\frac{M_2}{V} t} \right) \quad (6)$$

Pro  $t = \infty$  je  $x = \frac{G_i}{M_2} = x_r$

kde  $x_r$  je rovnovážná koncentrace.

Výraz  $\frac{V}{M_2}$  můžeme označit „ $n$ “, čili  $\frac{V}{M_2} = n$

nebo  $V = M_2 n$

$n$  — v tomto významu představuje čas, tj.  $n$  hodin, za které odchází množství vody, rovnající se objemu fermentoru (jedna fiktivní výměna). Při přesné bilanci bychom museli vzít ohled na kvasnice obsažené v proudu  $M_2$ .

Podle rovnice (3) je „ $n$ “ také přibližně čas, za který přiteče jeden objem čisté vody do fermentoru.

Výraz  $\frac{M_2}{V} = \frac{1}{n}$  čili  $\frac{1}{n} V = M_2$

vlastně znamená, že za hodinu se fiktivně obmění  $n$ -tý díl objemu fermentoru nebo

$\frac{1}{n} \cdot 100$  je procento fiktivní obměny čistou

vodou za hodinu,

$\frac{1}{n}$  představuje též tzv. zředovací rychlost.

Po dosazení je tvar závislosti

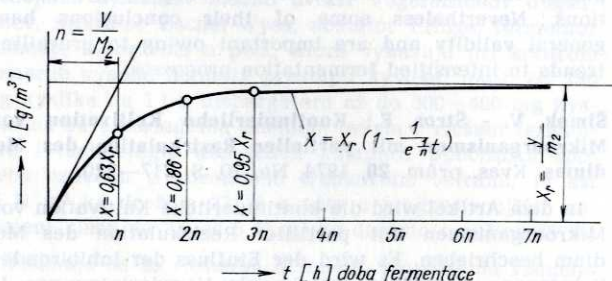
$$x = x_r \left( 1 - e^{-\frac{t}{n}} \right) \quad (7)$$

pro  $t = 1 \cdot n$   $x = 0,63 x_r$

$t = 2 \cdot n$   $x = 0,86 x_r$

$t = 3 \cdot n$   $x = 0,95 x_r$

Na obr. 3 je uvedeno grafické znázornění této závislosti.



Obr. 3

Rovnovážnou koncentraci lze vyjádřit

$$x_r = \frac{G_i}{M_2} = \frac{G_s y}{M_2} = \frac{y}{\frac{M_2}{G_s}} = \frac{y}{m_2}$$

kde  $\frac{M_2}{G_s} = m_2$ , což je přibližně měrná spotřeba odcházející (odpadní) vody v  $m^3$  na 1 t sušiny.

Z tohoto vztahu vyplývá, že rovnovážná koncentrace  $x_r$  je určena vytvářením inhibujících látek v g/t sušiny a specifickým množstvím odpadních (odcházejících) vod v  $m^3/t$  sušiny.

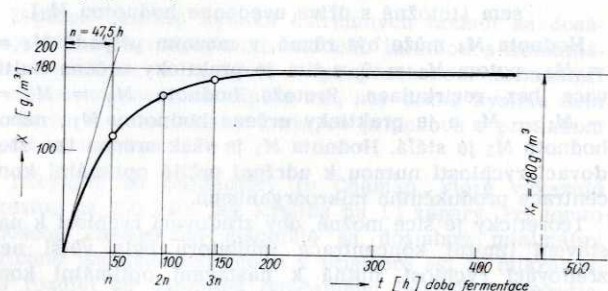
Nebo, že množstvím odpadních vod lze nastavit při určitém „ $y$ “ přípustnou limitní koncentraci inhibitorů.

Změřením  $m_2$  je možno určit limitní koncentraci mikroorganismů ve fermentoru, při které by ještě měl probíhat kontinuální proces jejich produkce.

Číslo „ $n$ “ lze podobně upravit

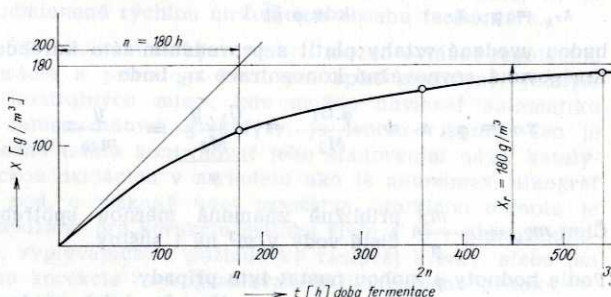
$$n = \frac{V}{M_2} = \frac{V}{\frac{G_i}{x_r}} = \frac{V x_r}{G_s y} = \frac{V}{G_s m_2}$$

$n$  zde udává čas v hodinách, za který nastane výměna inhibujících látek ve fermentoru při ustáleném stavu, nebo to představuje čas, za který by nastala rovnovážná koncentrace  $x_r$  ve fermentoru, kdyby nebylo odtahu ( $M_2 = 0$ ).



Obr. 4

Na obr. 4 je v příloze pro porovnání uveden příklad grafické závislosti  $x$  na  $t$  pro  $V = 100 m^3$ ,  $G_s = 0,37 t/h$ ,  $y = 1000 g/t$  suš.,  $M_2 = 2,1 m^3/h$ ,  $m_2 = 5,6 m^3/t$ .



Obr. 5

Na obr. 5 je další příklad této závislosti stejného fermentoru, ale jiných parametrů:  $V = 100 m^3$ ,  $G_s = 0,1 t/h$ ,  $y = 1000 g/t$ ,  $M_2 = 0,56 m^3/h$ ,  $m_2 = 5,6 m^3/t$ .

#### Zhodnocení některých předpokladů

Na počátku fermentace, než se ustálí kontinuální produkce biomasy, neodpovídá průběh závislosti „ $x$ “ na „ $t$ “ přesně podle uvedeného vztahu. Vzhledem k délce cyklu a k malé počáteční koncentraci inhibitorů však tyto odchylky nemají praktický význam. Eventuálně je lze dostatečně přesně vyčíslit.

Proud vzduchu  $M_9$  odcházejícího z fermentoru je nasycen vodními parami. Toto množství je však relativně malé a není proto zahrnuto v celkové bilanci kapalně fáze. Podle potřeby je lze vyčíslit.

Vzduch však může u těkavých látek obsahovat páry inhibitorů, jak již bylo uvedeno. Pokud toto množství mů-



žeme vyjádřit pro určitý rozsah koncentrace v závislosti na „ $x$ “ např. „ $M_9 \cdot \text{konst. } x$ “, připojí se k proudu  $M_2$  ještě tato složka a ostatní závislosti se nemění.

Podle předpokladu neodcházely odpadní vody na čističí stanici a bylo  $M_4 = 0$ , kde

$$x_r = \frac{G_i}{M_2}$$

Pokud by hodnota  $x_r$  přesáhla limitní mez, znamenalo by to zpomalení produkce mikroorganismů. Jak snížit koncentraci inhibujících látek, je zřejmé z uvedeného zlomku.  $G_i$  je většinou vázáno na biomasu a nelze je snížit. Je možno však zvýšit hodnotu  $M_2$ , a to tak, že určitou část recirkulovaných vod ( $M_4$ ) odvádíme na čističí stanici a úměrně k tomu přivádíme více čisté vody ( $M_6$ ). Všechny závislosti platí potom stejně, musíme ale za  $M_2$  dosadit hodnotu

$$M_{2C} = M_2 + M_4$$

kde

$M_{2C}$  je celkové množství odcházející kapalně fáze,  
 $M_2$  — množství kapalně fáze vázané separačním procesem (totožné s dříve uvedenou hodnotou  $M_2$ ).

Hodnota  $M_4$  může být různá, v mezním případě  $M_4 = M_3$ , potom  $M_5 = 0$ , a tím je prakticky určena kultivace bez recirkulace. Protože hodnota  $M_4 = M_3 = M_1 - M_2$  a je prakticky určena hodnotou  $M_1$ , neboť hodnota  $M_2$  je stálá. Hodnota  $M_1$  je však určena tzv. zřeďovací rychlostí nutnou k udržení určité optimální koncentrace produkčního mikroorganismu.

Teoreticky je sice možné, aby zřeďovací rychlost k nastavení limitní koncentrace inhibitoru byla větší než zřeďovací rychlost, nutná k nastavení optimální koncentrace mikroorganismů, potom by ale část biomasy musela být vrácena ze separace do fermentoru, aby se nevyplavovala kultura.

Pokud by při izolačních procesech neplatil předpoklad, že inhibitory jsou v proudu  $M_2$  ve stejné koncentraci „ $x$ “ jako ve fermentoru, ale v koncentraci

$$x_{rk} = \varphi \cdot x_r \quad \text{kde } \varphi \leq 1$$

budou uvedené vztahy platit s provedením této korekce. Korigovaná rovnovážná koncentrace  $x_{rk}$  bude

$$x_{rk} = \varphi \cdot x_r = \frac{\varphi G_i}{M_2} = \frac{G_s \cdot y}{M_2} = \frac{y}{m_{2k}}$$

Člen  $m_{2k} = \frac{m_2}{\varphi}$  přibližně znamená měrnou spotřebu čisté vody v  $m^3$  na  $t$  sušiny.

Podle hodnoty  $\varphi$  mohou nastat tyto případy:

1.  $\varphi = 1$  — vztahy popsané podle původních předpokladů, měrná spotřeba čisté vody  $m_2$ ,

2.  $\varphi > 1$  — měrná spotřeba čisté vody  $\frac{m_2}{\varphi} < m_2$ , pokud nemůže  $m_{2k}$  klesnout, zmenší se rovnovážná koncentrace  $x_{rk}$ ,

3.  $\varphi < 1$  — měrná spotřeba čisté vody  $m_{2k} = \frac{m_2}{\varphi} > m_2$

a musí se část vody recirkulované odvádět proudem  $M_4$  na čističku odpadních vod.

Podobně se vyjádří korekce i u čísla „ $n$ “

$$n_k = \frac{V}{M_2} = \frac{V}{M_{2k}}$$

Z uvedených vztahů vyplývá, že některé závislosti platí obecně. Schéma uvedené na obr. 1 představuje vlastně model fermentoru, kde lze nastavit mezní koncentraci inhibujících látek a tím vlastně určit mezní koncentraci mikroorganismů ve fermentoru. Tyto poznatky jsou dů-

ležitě zejména pro intenzifikaci vlastního výrobního procesu, který stále probíhá.

#### Literatura

- [1] MÁLEK, I. a kol.: Kontinuální kultivace mikroorganismů, ČSAV, 1964
- [2] WHITE, I. B., MUNNS, D. J.: Inhibitory effect of common elements towards yeast growth. I. Inst. Brew., 1951, 57, 3, 175—179

Šimek, V. - Štros, F.: Kontinuální kultivace mikroorganismů s částečnou recirkulací média. Kvas. prům. 20, 1974, č. 10, s. 217—220.

V článku je popsána kontinuální kultivace mikroorganismů s částečnou recirkulací média. Je zde uveden vliv inhibujících látek, které do procesu přicházejí jako nečistoty nebo které vznikají při vlastní kultivaci jako metabolity. Rozbor podmínek při této kultivaci je proveden pro inhibitory v kapalně fázi za určitých zjednodušujících předpokladů. Některé poznatky mají však obecnou platnost a mají význam zejména při stále probíhajících intenzifikaci fermentačních procesů.

Шимек, В. — Штрос, Ф.: Непрерывное культивирование микроорганизмов в установках с частичной рециркуляцией питательной среды. Квас. прум. 20, 1974, № 10, стр. 217—220.

V статье описывается метод непрерывного культивирования микроорганизмов в установках с частичной рециркуляцией питательной среды. Подробно рассматривается влияние разных ингибиторов, попадающих в среду с загрязняющими примесями, или же возникающих как метаболиты в результате процессов обмена веществ. Оценка влияния ингибиторов, присутствующих в жидкой фазе, основана на некоторых упрощающих предположениях, но, несмотря на это, выведенные из исследования заключения являются весьма ценными, в особенности с учетом наблюдаемых в настоящее время стремлений интенсифицировать бродительные процессы.

Šimek, V. - Štros, F.: Continuous Cultivation of Microorganisms in Plants with Partial Recirculation of Nutrient Medium. Kvas. prům. 20, 1974, No. 10, pp. 217—220.

The article deals with a method developed for continuous cultivation of microorganisms in plants with partial recirculation of medium. The authors analyze the effects of inhibitory substances which may get into the system either as polluting impurities, or as metabolic products of cultivation process. To outline the conditions in systems where inhibitors are present in the liquid phase, the authors accept several simplifying assumptions. Nevertheless some of their conclusions have general validity and are important owing to prevailing trends to intensified fermentation processes.

Šimek, V. - Štros, F.: Kontinuierliche Kultivierung von Mikroorganismen mit partieller Rezirkulation des Mediums. Kvas. prům. 20, 1974, No. 10, S. 217—220.

In dem Artikel wird die kontinuierliche Kultivierung von Mikroorganismen mit partieller Rezirkulation des Mediums beschrieben. Es wird der Einfluss der inhibierenden Substanzen angeführt, welche als Verunreinigungen in den Prozess eintreten oder bei der eigentlichen Kultivierung als Metabolite entstehen. Die Analyse der Bedingungen bei dieser Kultivierung wurde für die Inhibitoren in der flüssigen Phase bei bestimmten vereinfachenden Voraussetzungen durchgeführt. Einige Erkenntnisse haben jedoch allgemeine Gültigkeit und sind bei der fortschreitenden Intensifizierung der Fermentationsprozesse von Bedeutung.