

Látková bilance při jednorázové kultivaci *Candida utilis* na syntetickém etanolu

663.13:661.72 582.232.23

Ing. MILOSLAV RUT - Dr. LUBOMÍR ADÁMEK - Ing. FRANTIŠEK ŠTROS, Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, oddělení mikrobiálních výrob, Praha - Ing. KAREL PECKA, Vysoká škola chemickotechnologická, Praha

Do redakce došlo 15. února 1976

Československý výzkum sleduje možnost využití syntetického etanolu jako výchozí suroviny pro mikrobiální procesy již od počátku šedesátých let. V letech 1961 a 1962 byl proveden výběr kmenů a proběhly základní kultivační pokusy zaměřené na výrobu kvasničných bílkovin ze syntetického etanolu [1, 2]. V roce 1964 byl v ČSR udělen patent na výrobu krmných kvasnic ze syntetického etanolu [3] a v roce 1967 patent na výrobu mikrobiálních tuků z téže suroviny [4]. V letech 1971 a 1972 byla vyřešena základní koncepce automatické regulace kultivačního procesu výroby kvasničných bílkovin z etanolu [5–7] a od ledna 1972 byla zahájena pokusná výroba krmných kvasnic z etanolu v Seliko, n. p., závod Kojetín. Závod vyrábí 1200 až 1400 tun sušených kvasnic ročně a v nejbližších letech bude rekonstruován na kapacitu 5000 t/r. Optimalizace a racionalizace technologie a především zvyšování výkonnosti, která rozhodující měrou ovlivňuje výrobní náklady, předpokládá důkladnou znalost bilance syntézy biomasy z etanolu. Článek referuje o výsledcích první ze série prací, zabývajících se studiem této problematiky.

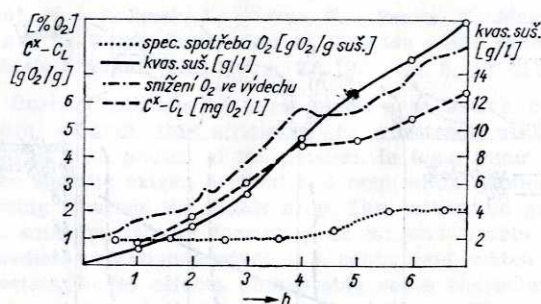
Materiály a metody

Při kultivacích byl používán *Candida utilis*, kmen č. 49 ze sbírky VÚKPS Praha, používaný při průmyslové výrobě kvasnic ze syntetického etanolu. Kultivační tank se inokuloval kvasničnou pastou získanou z předešlých pokusů na odstředivce Westfalia LWA 205. Pasta byla skladována nejdéle 1 týden při +5 °C. Kultivační médium bylo připravováno z roztoku solí (35 ml 85 % kyseliny fosforečné p. a., 25 g louhu draselného p. a., 25 g síranu hořečnatého p. a. a 0,5 g síranu zinečnatého p. a. na 1 l vody) tak, že na každý 1 g očekávané produkce kvasničné sušiny byl do 1 l vodovodní vody přidán 1 ml roztoku solí. Na každý 1 l takto připraveného média se přidá 1 g síranu amonného.

Syntetický líh surový spolu se zdrojem dusíku byly dávkovány ve formě lihočpavkové směsi (1 obj. díl 25 % čpavkové vody + 4 díly syntetického surového líhu 90 % obj.). V některých pokusech byl etanol dávkován jednorázově a zdroj dusíku podle pH 25 % čpavkovou vodou. Kultivace probíhala ve skleněném tanku objemu 30 l s plněním 15 l, opatřeným samonasávacím míchadlem a cirkulačním válcem. Teplota a pH byly regulovány automaticky na 30 °C, resp. pH 4,5. Regulační pH-metr dávkoval lihočpavkovou směs, nebo čpavkovou vodu. Průtok vzduchu 1 litr za minutu na 1 litr účinného objemu byl měřen a korigován podle rotametru.

Spotřeba a vývin plynů se měřily paramagnetickým analyzátozem kyslíku Permolyt (Junkalor NDR) s rozsahem 0 až 21 % a infračerveným analyzátozem kyslíčnicku uhličitého Infralyt (Junkalor NDR) s rozsahem 0 až 10 %. Aktuální koncentrace rozpuštěného kyslíku se měřila přístrojem Oxytest (Vývojové dílny ČSAV), pracujícím na polarografickém principu s kombinací pevných elektrod Pt/AgCl pokrytých polypropylénovou membránou.

Kvasničná sušina se stanovovala vážením kvasničné sedimenty získané filtrací 5 až 10 ml vzorku na fritě S 4 a sušené 2 hodiny při 105 °C. Koncentrace etanolu v surovém syntetickém líhu byla stanovena pyknometricky, koncentrace etanolu v médiu byla stanovena oxidimetricky po předestilování etanolu do roztoku dvochromanu draselného v konc. kyselině sírové. Kyselina octová se stanovovala jako těkavé kyseliny acidimetricky po předestilování 150–200 ml destilátu s vodní párou z 5 až 10 ml vzorku. Elementární složení biomasy bylo stanoveno běžným postupem elementární semi-mikroanalýzy [9].

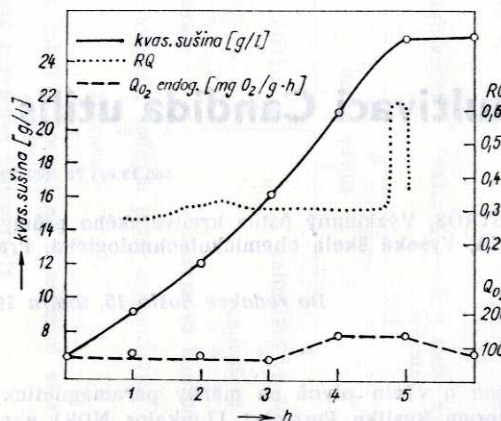


Obr. 1. Spotřeba kyslíku při jednorázové fermentaci regulované lihočpavkovou směsí

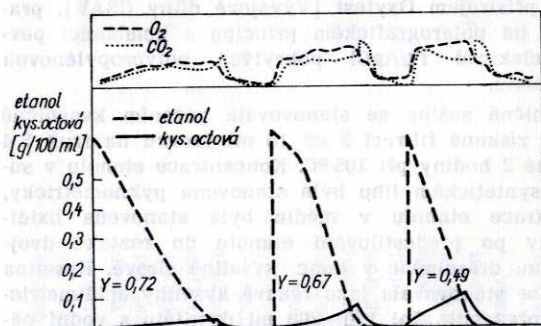
Výsledky a diskuse

První pokusy byly zaměřeny na stanovení specifické spotřeby kyslíku (g O_2 na gram kvasničné sušiny). V grafu 1 je uveden průběh jednorázové kultivace s přítokem etanolu regulovaným lihočpavkovou směsí. V grafu 2 je průběh podobné kultivace se záznamem konce fermentace po přerušení dávkování lihočpavkové směsi (těsně před 5. hodinou). Dále je v grafu uveden průběh respiračního kvocientu a endogenního dýchání. V grafu 3 je uveden typický průběh fermentace a je

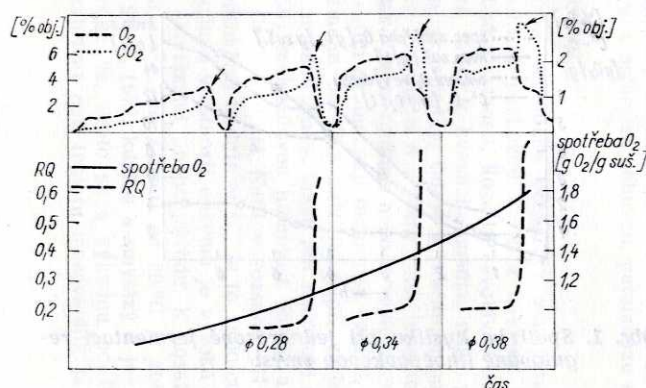
současně znázorněn průběh hromadění kyseliny octové. Další pokusy byly zaměřeny na zkoumání kvantitativních vztahů během růstové křivky, a proto byl v těchto pokusech přidáván etanol odděleně od čpavku po částech a pro každou část po spotřebování substrátu byla počítána výtěžnost, specifická spotřeba kyslíku a respirační kvocient. Tyto výsledky jsou uvedeny v grafech 3 a 4.



Obr. 2. RQ a endogenní respirace při fermentaci regulované lihočepavkovou směsí



Obr. 3. Spotřeba etanolu, hromadění kyseliny octové a výtěžnost při jednotlivých dávkách etanolu



Obr. 4. Specifická spotřeba kyslíku a RQ při kultivaci při jednotlivých dávkách etanolu

Z prvních výsledků bylo zřejmé, že tak, jak se mění v průběhu fermentace fyziologický stav, mění se i způsob využití základního substrátu; stoupá specifická spotřeba kyslíku a respirační kvocient. Změny jsou výrazné zejména v druhé části fermentace, kdy specifická spotřeba kyslíku stoupá z původních 1,2 g O₂/g suš. až na 2,0 g O₂ a více. Toto zvýšení je provázáno současným zvyšováním RQ. V okamžiku spotřebování etanolu

stoupne RQ např. z původních 0,32 na 0,7. Je zřejmé, že v této době se začíná výrazněji projevovat oxidace substrátu (pravděpodobně intermediárního metabolitu) s vyšším spalovacím koeficientem, resp. substrát více oxidovaný než etanol. Jedná se o substrát, který se obtížně vymývá z buněk (viz zvýšené endogenní dýchání v grafu 2). Protože se vždy po spotřebování etanolu zvyšuje pH, jde o kyselý substrát, který s postupujícím zpracováním uvolňuje vázaný amoniak a pH stoupá. Domněnka, že jde o kyselinu octovou, byla potvrzena (viz graf 3).

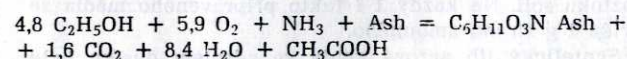
Uvedené závěry potvrzují také pokusy, při kterých se jednorázově přidávalo větší množství etanolu a byla pozorována dílčí růstová křivka odpovídající tomuto přídatku. Ve všech případech se vždy po vyčerpání etanolu okamžitě zvýšila tvorba kysličníku uhličitého a tím i RQ na hodnoty podstatně vyšší než za přítomnosti etanolu. Na grafu 4 je vidět, že v jednotlivých úsecích rozdělené růstové křivky stoupá i průměrná hodnota RQ, což svědčí o tom, že se kyselina octová hromadí stále rychleji. Uvedené poznatky potvrzuje i průběh výtěžnosti ve všech pokusech. Výtěžnost v poslední části logaritmické fáze je pravidelně nižší než na začátku, nebo uprostřed logaritmické fáze. Na začátku není výjimkou dosáhnout výtěžnosti 70 % a vyrovnat se tak nejvyšším údajům o výtěžnosti kvasničné hmoty z etanolu [8].

Nahromaděná kyselina octová je zřejmě hlavní příčinou snížení výtěžnosti kvasničné hmoty z etanolu. V některých pokusech se nahromadilo takové množství kyseliny octové, že se inhibicí úplně zastavila fermentace. V grafu 3 v posledním úseku fermentace byla výtěžnost pouze 49 % a množství nahromaděné kyseliny octové odpovídalo 11 % celkově přidaného etanolu. Jestliže se snažíme využít takto nahromaděné kyseliny octové k syntéze kvasničné hmoty, je výtěžnost značně nižší, než při udržování koncentrace kyseliny octové hluboko pod inhibiční koncentrací. Cílem této práce bylo sestavit látkovou bilanci, a proto jsme se prozatím nezabývali příčinami hromadění kyseliny octové, ani jsme se změnami základních kultivačních parametrů nesnažili ovlivnit hromadění.

Z těchto příčin jsme látkovou bilanci sestavili pro dva pochody, odpovídající přibližně začátku a konci logaritmické fáze. Při prvním pochodu se kyselina octová hromadí, avšak její množství ještě neinhibuje syntézu kvasničné hmoty. Při druhém pochodu ovlivňuje kyselina octová výtěžnost, a to jednak svým inhibičním vlivem a jednak málo efektivní utilizací.

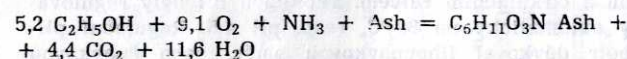
Po zpracování bilančních údajů, které jsou částečně znázorněny v grafech, pokusili jsme se o sestavení odpovídajících přibližných stechiometrických rovnic. Průměrné složení kvasničné sušiny odpovídalo sumárnímu vzorci C₆H₁₁O₃N Ash, kde anorganická složka „Ash“ je 8 gramů.

Pro první fázi fermentace vychází tato stechiometrická rovnice:



Tato rovnice charakterizuje ideální průběh oxidace etanolu při hromadění kyseliny octové, kdy vznikající metabolit neinhibuje syntézu kvasničné hmoty. Výtěžnost je 69,7 %, specifická spotřeba kyslíku 1,23 g O₂/g a RQ = 0,27.

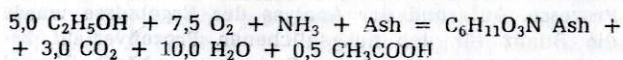
Pro druhou fázi fermentace vychází:



Tato rovnice charakterizuje průběh syntézy kvasničné hmoty z etanolu v případě, že proces ovlivňuje málo

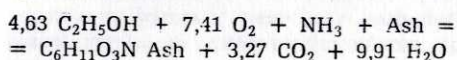
efektivní oxidace kyseliny octové, nahromaděné v předcházející fázi fermentace nad určitou mez. Výťažnost je 64 %, specifická spotřeba kyslíku 1,9 g O₂/g a RQ = 0,48.

V případě, že bilancujeme jednorázovou kultivaci jako celek, vycházejí potom hodnoty mezi oběma výše uvedenými vztahy:



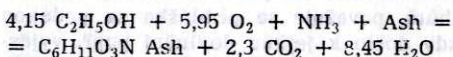
a tomu odpovídající výťažnost 66,6 %, RQ = 0,4 a specifická spotřeba kyslíku 1,57 g O₂/g.

Jestliže se vhodnými podmínkami fermentace daří zpracovávat vznikající kyselinu octovou tak, aby se nehromadila, potom se vznikající kyselina octová zpracovává s maximální výťažností (do 40 g biomasy na 100 g kyseliny octové). Potom probíhá pochod charakterizovaný touto rovnicí:



tzn. výťažnost 71,8 %, spotřeba kyslíku 1,55 g O₂/g a RQ = 0,44.

Z předcházejících zkušeností vyplývá, že by bylo dále možno zlepšovat ekonomické parametry při syntéze kvasničné hmoty z etanolu za použití kmene č. 49. Bylo by nezbytné při kontinuální kultivaci pracovat za podmínek počátku logaritmické fáze, kdy je substrát využíván s maximální efektivností při minimální spotřebě kyslíku, ale současně zajistit podmínky pro okamžitou oxidaci kyseliny octové, a to stejně rychle jako je její vznik. Aktuální koncentrace kyseliny octové by neměla stoupnout nad 0,3 g/litr. Taková fermentace je charakterizována rovnicí:



Z toho je výťažnost 80 %, specifická spotřeba kyslíku 1,23 g O₂/g a RQ = 0,39. Toto jsou zřejmě maximálně možné výsledky za podmínek vypracovaného technologického postupu s *C. utilis* č. 49.

Literatura

- [1] VERNEROVÁ, J.: Podmínky pro asimilaci etanolu kvasinkami. Sborník VŠCHT, E 12, Potravinářství, 1966, s. 55
- [2] VERNEROVÁ, J., SYHOROVÁ, V.: The study of a strain *Candida utilis* in the course of continuous cultivation of ethanol with a special respect to biotin requirement. Folia Microbiologica, 12, 1967, s. 146
- [3] VERNEROVÁ, J., ROSA, M.: Způsob výroby krmných kvasnic. ČS. patent č. 109 658, 1964.
- [4] KRUMPHANZL, V., DYR, J., MOSTECKÝ, J., PELECHOVÁ, J.: Způsob výroby tuků mikrobiální cestou z ropných surovin a jejich derivátů. ČS. patent č. 137 446, 1967
- [5] ŠTROS, F., PROKOP, A., HAUSER, K., ŠVOJGR, M., ADÁMEK, L.: Způsob aerobní kultivace kvasinek v syntetických médiích. ČS. autor. osvěd. č. 158 954, 1974
- [6] ADÁMEK, L., ŠTROS, F., ŠVOJGR, M., HAUSER, K., PROKOP, A.: Způsob aerobní kultivace kvasinek v syntetických médiích. ČS. autor. osvěd. č. 158 991, 1974
- [7] ŠIMEK, V., ŠTROS, F., HAUSER, K.: Způsob regulace zředovací rychlosti a vodního režimu při kontinuální kultivaci kvasinek s recirkulací odstředěného média. ČS. autor. osvěd. č. 161 535, 1974.
- [8] OURA, E.: The effect of aeration on the growth energetics and biochemical composition of bakes's yeast. Dissertation. Helsinki 1972.
- [9] VEČERA, M.: Organická elementární analýza. SNTL Praha 1967.

Rut, M. - Adámek, L. - Štros, F. - Pecka, K.: Látková bilance při jednorázové kultivaci *Candida utilis* na syntetickém etanolu. Kvas. prům. 22, 1976, č. 5, s. 111—114.

Bylo zjištěno, že při syntéze kvasničné biomasy z etanolu se v jednorázové kultivaci mění způsob využití substrátu. V logaritmické fázi se zvyšuje specifická spotřeba kyslíku a respirační kvocient a snižuje se výtěž-

nost. Při kultivaci se hromadí jako meziprodukt oxidace kyselina octová, která může nad jistou hranicí nepříznivě ovlivňovat základní veličiny, z nichž se vychází při sestavování látkové bilance procesu. Byla sestavena stechiometrická rovnice pro začátek procesu, kdy při nízké spotřebě kyslíku je substrát využíván efektivněji a pro konec procesu, kdy nahromaděná kyselina octová ovlivňuje syntézu kvasničné hmoty a zvyšuje se specifická spotřeba kyslíku. Bilance celé kultivace je součtem obou procesů. Na základě rozboru výsledků byla vypočtena bilance pro vyvážený proces, při kterém se neakumuluje kyselina octová. Výťažnost tohoto procesu je hranicí, které je možno dosáhnout s daným kmenem, surovinou a technologickým postupem.

Рут, М. — Ададек, Л. — Штрос, Ф. — Пецка, К.: Вещественный баланс при однократном разведении дрожжей *Candida utilis* в среде синтетического этанола. Квас. прум., 22, 1976, № 5, стр. 111—114.

Было установлено, что в ходе процесса получения биологической массы путем однократного разведения определенного вида дрожжей в среде этанола, эффективность использования питательного субстрата постепенно изменяется. В логарифмической фазе размножения микроорганизмов удельный расход кислорода и интенсивность респирации увеличиваются, а выход продукта снижается. В качестве промежуточного продукта окисления образуется уксусная кислота, которая при превышении определенного предела может оказывать неблагоприятное влияние на величины, взятые в расчет вещественного баланса процесса. Авторы вывели стехиометрическое уравнение как для начала процесса, когда при низком удельном расходе кислорода субстрат используется эффективно, так и для конца процесса, характеризованного — под отрицательным влиянием накопленной уксусной кислоты — повышенным расходом кислорода. Конечный баланс процесса показывает сумму обеих фаз. На основании анализа результатов был рассчитан уравновешенный вещественный баланс, предупреждающий накопление уксусной кислоты. Показанный выход является максимальным пределом, которого можно добиться с данными штаммом, сырьем и технологическим процессом.

Rut, M. - Adámek, L. - Štros, F. - Pecka, K.: Mass Balance in Batch Cultivation of *Candida utilis* with Synthetic Ethanol. Kvas. prům. 22, 1976, No. 5, pp. 111—114.

During synthesis of yeast biomass in batch culture with ethanol the efficiency of substrate utilization varies with phases of the process. In logarithmic phase the specific oxygen demand and respiration quotient are rising whereas the yields drop. The cultivation process is accompanied by formation of an undesirable intermediate oxidation product, i. e. acetic acid, which above certain limits affects unfavorably some characteristics taken into calculations of mass balance. The authors have derived stoichiometric equations for the initial phases of the process, when the oxygen demand is low and substrate is utilized very efficiently as well as for final ones, when accumulated acetic acid affects the biomass synthesis and increases the oxygen demand. The total balance of process is given by the sum covering all phases. From the analysis of results the authors calculate a mass balance for well balanced process without acetic acid accumulation. Such a process offers yields which for given strain, raw materials and technology are maximum which can be obtained.

Rut, M. - Adámek, L. - Štros, F. - Pecka, K.: Die Stoffbilanz bei der einmaligen Kultivierung von *Candida*

utilis auf synthetischem Äthanol. Kvas. prům. 22, 1976, No. 5, S. 111–114.

Es wurde festgestellt, daß sich bei der Synthese der Hefebiomasse aus Äthanol in der einstufigen Kultivation die Charakteristik der Substratausnützung ändert. In der logarithmischen Phase erhöht sich der spezifische Sauerstoffverbrauch und der Respirations Quotient und die Ausbeute sinkt ab. Bei der Kultivation häuft sich als Oxydationszwischenprodukt Essigsäure an, die über einer bestimmten Grenze die Grundparameter ungünstig beeinflussen kann, die bei der Zusammenstellung der Stoffbilanz des Prozesses eine wichtige Rolle spielen. Es wurde die stöchiometrische Gleichung zusammen-

gestellt, und zwar sowie für den Anfang des Prozesses, wo das Substrat bei niedrigem Sauerstoffverbrauch effektiver ausgenützt wird, als auch für die Endphase des Prozesses, wo die angehäuften Essigsäure die Synthese der Hefemassee beeinflusst und der spezifische Sauerstoffverbrauch ansteigt. Die Bilanz der gesamten Kultivation ergibt sich aus der Summe der beiden Prozesse. Aufgrund der Analyse der Ergebnisse wurde die Bilanz für den ausgeglichenen Prozeßverlauf berechnet, bei dem sich keine Essigsäure anhäuft. Die bei diesem ausgeglichenen Prozeßverlauf erzielte Ausbeute stellt die Maximalgrenze dar, die mit dem gegebenen Hefestamm, Rohstoff und technologischen Verfahren erreicht werden kann.