

Specifická spotřeba kyslíku a respirační kvocient při výrobě kvasničných bílkovin z etanolu

663.14:636.087 546.21

II. Porovnání odvozených vztahů s experimentálními hodnotami

Ing. MIROSLAV RUT, Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, odd. mikrobiálních výrob, Praha
Ing. FRANTIŠEK MADRON, CHEMOPETROL, Výzkumný ústav anorganické chemie, Ústí n. L.
Ing. FRANTIŠEK ŠTROS, CSc.,
Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, odd. mikrobiálních výrob, Praha

V předcházející práci [1] jsme pojednali o významu specifické spotřeby kyslíku ($Y_{O/X}$) a respiračním kvocientu (RQ) při aerobní syntéze kvasničné hmoty z etanolu. Odvodili jsme teoretické vztahy pro závislost mezi výtěžností, tvorbou vedlejších produktů, specifickou spotřebou kyslíku a respiračním kvocientem. V této práci jsme se zaměřili na praktické ověření platnosti odvozených závislostí.

Materiály a metody

Kultivační pokusy byly prováděny v chemostatu a do výpočtů byla brána měření v ustáleném stavu. Pokusy v jednorázové kultivaci nejsou pro tyto účely vhodné, protože v různých růstových fázích je způsob zpracování základního substrátu značně rozdílný [2].

Ke kultivaci se používala kvasinka *Candida utilis* kmen č. 49 ze sbírky VÚKPS, používaná při průmyslové výrobě kvasnic ze syntetického etanolu. Inokulovala se pasta získaná při udržování provozního kmene ve skleněných laboratorních tancích s plněním 15 l. Pasta se skladovala při 5 °C nejdéle 1 týden. Pro přípravu kultivační půdy se používal zásobní roztok solí — 10 g síranu amonného techn., 35 g síranu hořečnatého techn., 1 g síranu zinečnatého techn., 50 ml technické kyseliny fosforečné 80% a 70 ml 40% techn. louhu draselného se

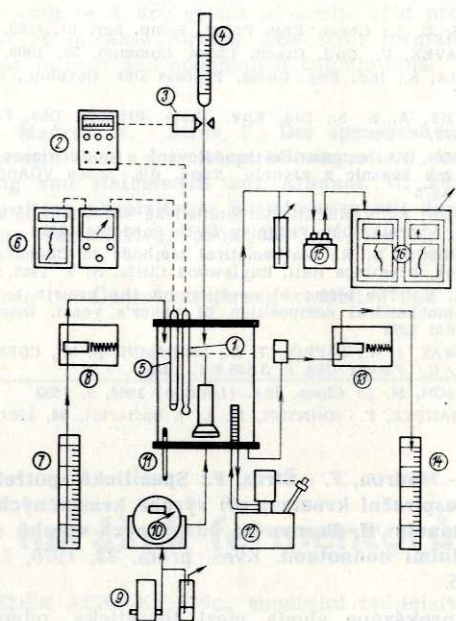
rozpuští a doplní vodovodní vodou na 1 litr. K přípravě kultivační půdy se použije 20 ml zásobního roztoku solí, přidá se 0,5 g síranu amonného, 0,5 g popela z lihovarských zahuštěných výpalků (předem se rozpustí v 1 ml konc. kyseliny solné), zředí se, pH se upraví na 4 louhem, přidá se potřebné množství syntetického surového lihu a doplní se vodovodní vodou na 1 litr.

Fermentace se prováděla v laboratorním skleněném tančíku vyrobeném ve Vývojových dílnách ČSAV pro kontinuální kultivaci. Z původního zařízení se používal pouze fermentační tančík s pohonem a stojanem. Schéma kultivačního a měřicího zařízení je na *obrázku 1*.

Při kultivaci byly udržovány tyto základní parametry: teplota 30 °C, množství vzduchu 1 litr/min, plnění 1 litr, pH 4. Otáčky míchadla 1100 až 1200 ot/min a uvedený průtok vzduchu zajišťovaly přenos kyslíku charakterizovaný $K_La = 1000/h$.

Před zahájením průtoku probíhala jednorázová kultivace s počáteční koncentrací 4 g kvasničné sušiny/litr. V tančíku byl 1 litr kultivačního média bez lihu, fermentace byla zahájena s 5 ml lihu, další etanol byl dávkován podle změny koncentrace rozpuštěného kyslíku [3]. Jakmile stoupla koncentrace kvasničné sušiny o 1 až 2 g/l nad rovnovážnou koncentraci odpovídající množství lihu v médiu, byl zahájen průtok. Při všech fermenta-

cích se koncentrace lihu a průtok volil tak, aby růst nebyl limitován kyslíkem.



Obr. 1. Schéma fermentačního zařízení

1 — pH-elektroda, 2 — regulační pH-metr, 3 — elektromagnetický ventil, 4 — byreta s NH_3 , 5 — kyslíková elektroda, 6 — oxytest se zapisovačem, 7 — nádrž s půdou, 8 — mikročerpadlo přítoku půdy, 9 — membránové čerpadlo, 10 — plynoměr, 11 — teploměr, 12 — ultratermostat, 13 — mikročerpadlo odběru suspenze, 14 — nádrž na kvasničnou suspenzi, 15 — membránové čerpadlo, 16 — analyzátor plynů

V porovnání s předcházející prací [2] byla zvýšena přesnost měření vzduchu a koncentrace kyslíku a kyslíčnicku uhlíčitého ve výdechu. Množství vzduchu bylo korigováno každé 4 hodiny na normální podmínky při současné registraci tlaku a teploty vzduchu. Koncentrace plynů ve výdechu byla měřena přístroji Junkalor s rozsahy 15 až 21 % kyslíku a 0 až 0 % kyslíčnicku uhlíčitého a chyby přístroje byly korigovány podle práce [4]. Koncentrace rozpuštěného kyslíku se měřila a registrovala přístrojem Oxytest (VD ČSAV). Stanovení etanolu, kvasničné sušiny, kyseliny octové a složení biomasy bylo stejné jako v předcházející práci [2].

Výsledky měření, stejně jako všechny korekce byly zpracovány na počítači Tesla 2000. Současně byla použita nová metoda statistického zpracování bilančních dat. Při bilančování reaktoru, ve kterém probíhá mikrobiální přeměna, se setkáváme s dvěma příčinami chyb. Jednak jsou to vlastní chyby měření (koncentrací a průtoků tekutin), dále pak chyby vyplývající z nesplnění předpokladů o bilančovaném systému (neustálený stav, nečekané úniky apod.). Pro mikrobiální přeměny je charakteristický další zdroj chyb — neznalost všech látek účastnících se přeměny, popřípadě nedokonalá znalost jejich elementárního složení. Důsledkem existence chyb je, že data látkové bilance nevyhovují zákonu o zachování chemických prvků během reakce — říkáme, že bilanční data jsou nekonsistentní. Statistickému zpracování takových dat byla věnována řada prací [5–9]. V souvislosti s naším výzkumem byla vypracována nová metoda statistického zpracování bilančních dat [10, 11], která má proti dosavadním metodám některé výhody. Je zvlášť vhodná pro případ neúplného bilančování, kdy nelze bilančovat všechny látky vyskytující se v problému (např. reakční voda, živné soli). Tato metoda je

založena na stechiometrických vlastnostech minimální soustavy reakcí [12] v daném systému látek, tj. nejmenší soustavy lineárně nezávislých chemických reakcí postačujících k vyjádření jakékoliv chemické přeměny v daném systému látek. Metoda zahrnuje statistické vyrovnání bilančních dat a posouzení, zda nekonsistentnost dat lze vysvětlit pouze náhodnými chybami, nebo zda jsou data zatížena i chybami systematickými, popřípadě hrubými.

Výsledky a diskuse

Naměřené a korigované hodnoty byly použity a zpracovány podle vztahů odvozených a diskutovaných v první části této práce [1]. Zaměřili jsme se pouze na specifickou spotřebu kyslíku a respirační kvocient. Hodnoty, získané z pokusů, které probíhaly bez větších závad, jsou uvedeny v tabulce 1.

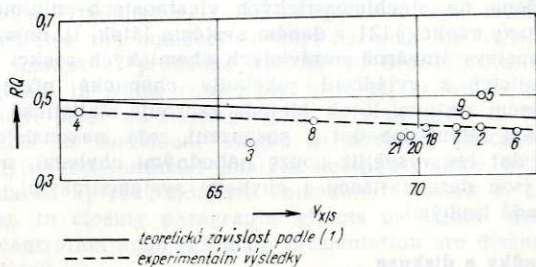
Tabulka 1

Číslo kultivace	Výtěžnost [g/100 g]		Spec. spotřeba O_2 [g/g]		Respirační kvocient RQ	
	změřená	vyrovnaná	změřená	vyrovnaná	změřený	vyrovnaný
2	71,6	75,7	1,35	1,42	0,42	0,42
3	65,8	68,3	1,76	1,73	0,39	0,46
4	61,5	60,3	2,03	2,04	0,47	0,48
5	71,6	70,9	1,54	1,61	0,50	0,47
6	72,5	74,0	1,45	1,50	0,41	0,44
7	71,0	70,7	1,60	1,63	0,42	0,45
8	67,4	70,7	1,57	1,62	0,44	0,45
9	71,2	70,0	1,58	1,64	0,45	0,44
18	70,2	69,7	1,67	1,66	0,42	0,46
20	69,8	70,8	1,62	1,62	0,40	0,45
21	69,6	70,5	1,71	1,63	0,40	0,45

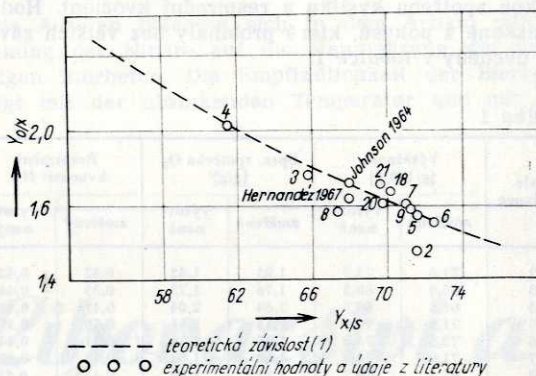
Jednou z nejdůležitějších hodnot sledovaných při kultivacích je výtěžnost. V našich experimentech se při kultivacích bez tvorby kyseliny octové pohybovala výtěžnost v intervalu 68,3 až 75,7 %. Horní hranici intervalu je výsledek získaný při kultivaci č. 2 při neustáleném stavu a tedy zatíženější větší pravděpodobností chyb. Vynecháme-li tento výsledek, je interval výtěžnosti fermentací bez tvorby kyseliny octové 68,3 až 74,0 %. Průměrná výtěžnost statisticky zhodnocená je $70,2 \pm 2,6$ %. Výtěžnost ve fermentaci s tvorbou kyseliny octové je podstatně nižší — 60,3 %. Výtěžnosti uvedené v tomto odstavci jsou z nejvyšších, jaké byly kdy publikovány. Oura [13] na syntetickém médiu plně dotovaném vitamíny, růstovými látkami a stopovými prvky dosáhl výtěžnosti 70,4 % na využitý etanol. V patentu firmy Standard Oil [14] se uvádějí hodnoty 70,3 až 72,1 % pro fermentaci limitovanou etanolem. Praktické výsledky budou za stejných okolností pravděpodobně nižší o započítání nevyužitého etanolu. Na výtěžnost má dále vliv koncentrace kvasničné sušiny a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Obě hodnoty mohou v některých případech vzájemně souviset. Jedná se zejména o průmyslové fermentace, které jsou vesměs vedeny v limitu kyslíku. Těmito případy jsme se v rámci této práce nezabývali. Nicméně i zde bylo prokázáno (fermentace č. 3), že při vyšší koncentraci kvasničné sušiny i za přebytku rozpuštěného kyslíku výtěžnost klesá.

Respirační kvocient RQ má při tvorbě kvasničné hmoty z etanolu hodnoty v intervalu 0,39 až 0,50. Uvedené výsledky i závislost RQ na výtěžnosti a tvorbě kyseliny octové potvrzují hodnoty odvozené v předcházející práci [1]. Soulad mezi vypočtenými a experimentálními výsledky je zřejmý z obrázku 2.

Velmi důležitou veličinou sledovanou při aerobních fermentacích je spotřeba kyslíku na tvorbu biomasy. Specifická spotřeba kyslíku Y_{O_2} úzce souvisí s výtěžností, jak ukazují teoretické vztahy vypočítané v předchá-



Obr. 2. Závislost respiračního kvocientu na výtěžnosti (g kvasničné sušiny na 100 g etanolu)



Obr. 3. Závislost specifické spotřeby kyslíku (g O₂ na g kvasničné sušiny) na výtěžnosti (g kvasničné sušiny na 100 g etanolu)

zející práci [1]. Experimentální výsledky uvedené v tabulce 1 jsou vyneseny do grafu na obrázku 3, kde je současně čárkovně uveden teoretický vztah mezi výtěžností a specifickou spotřebou kyslíku. Z grafu vyplývá, že většina údajů velmi dobře plní teoretický předpoklad. Výjimkou jsou body kultivací č. 2 a 8 z důvodů, které jsou uvedeny výše. Teoretické závislosti odvozené v přecházející práci [1] byly potvrzeny a lze jich využít prakticky. Vztah mezi specifickou spotřebou kyslíku a výtěžností je velmi důležitý pro projekční a ekonomické výpočty. Pro průměrné složení kvasničné biomasy (47,06 % C, 7,19 % H, 31,37 % O, 9,15 % N, a 5,23 % popela) a pro kultivaci bez významnější akumulace kyseliny octové platí užitečný vztah

$$Y_{O/X} = \frac{208}{Y_{X/S}} - 1,36, \quad (1)$$

kde $Y_{O/X}$ je specifická spotřeba kyslíku v g O₂ na gram kvasničné sušiny

$Y_{X/S}$ — výtěžnost v g kvasničné sušiny na 100 g etanolu.

Dostupné literární údaje o specifické spotřebě kyslíku při tvorbě kvasničné hmoty z etanolu [15, 16] jsou uvedeny též na obrázku 3. Oba údaje se přibližují teoretickému vztahu, podobně jako naše výsledky. Při významnější tvorbě a akumulaci kyseliny octové, je nutno spotřebu kyslíku snížit podle vztahu 2

$$Y_{O/X} = \frac{208}{Y_{X/S}} - 1,36 - 1,06 \text{ STAc}, \quad (2)$$

kde STAc je specifická tvorba kyseliny octové v g kyseliny octové na 1 g biomasy.

Literatura

- [1] MADRON, F., RUT, M., ŠTROS, F.: Kvasný průmysl **22**, 1976, č. 9, s. 202–204.
- [2] RUT, M., ADÁMEK, L., ŠTROS, F., PECKA, K.: Kvasný průmysl **22**, 1976, č. 5, s. 111–114

- [3] ČÁSLAVSKÝ, Z., HOSPODKA, J.: Patent USA 3 384 553, 1968
- [4] RUT, M., MADRON, F.: Kvasný průmysl **22**, 1976, č. 4, s. 84–87
- [5] KUEHN, D. R., DAVIDSON, H.: Chem. Eng. Progr. **57**, 1961, s. 44
- [6] RIPPS, D. L.: Chem. Eng. Progr. Symp. Ser. **61**, 1965, s. 8
- [7] VÁCLAVEK, V.: Coll. Czech. Chem. Commun. **34**, 1969, s. 2662
- [8] NOGITA, S.: Ind. Eng. Chem. Process Des. Develop., **11**, 1972, s. 197
- [9] MURTHY, A. K. S.: Ind. Eng. Chem. Process. Des. Develop., **12**, 1973, s. 246
- [10] MADRON, F.: Matematické modelování a optimalizace výroby krmných kvasnic z etanolu. Kand. dis. práce VÚAnCh, Ústí n. L. 1975
- [11] MADRON, F., VANĚČEK, V.: Statistické vyrovnání látkové bilance, Sborník, Dům techniky ČVTS Pardubice 1974
- [12] AMUNDSON, N. R.: Mathematical Methods in Chemical Engineering, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. Y. 1965, s. 50–54
- [13] OURA, E.: The effect of aeration on the growth energetics and biochemical composition of baker's yeast. Dissertation Helsinki 1972
- [14] RIDGWAY, J. A., LAPPIN, T. A., BENJAMIN, B. M., CORNS, J. B., AKIN, C.: Patent USA č. 3 865 891, 1975
- [15] JOHNSON, M. J.: Chem. Ing. (London) 1964, s. 1532
- [16] HERNANDEZ, F. - JOHNSON, M. J.: J. Bacteriol. **94**, 1967, s. 996.

Rut, M. - Madron, F. - Štros, F.: Specifická spotřeba kyslíku a respirační kvocient při výrobě kvasničných bílkovin z etanolu. II. Porovnání odvozených vztahů s experimentálními hodnotami. Kvas. prům. **22**, 1976, č. 12, s. 272–275.

Byla prokázána shoda mezi teoreticky odvozenými vztahy pro výtěžnost a specifickou spotřebu kyslíku a experimentálními hodnotami těchto důležitých bilančních veličin. Pro kontinuální kultivaci limitovanou substrátem platí vztah: specifická spotřeba kyslíku = 203/výtěžnost — 1,36. Pokud se při fermentaci akumuluje větší množství kyseliny octové, je třeba pro výpočet specifické spotřeby kyslíku použít korigovaného vztahu: specifická spotřeba kyslíku = 208/výtěžnost — 1,36 — 1,06 STAc (STAc je počet gramů vytvořené kyseliny octové na gram vytvořené biomasy). Oba vztahy jsou užitečné při projekčních a ekonomických výpočtech.

Рут, М. — Мадрон, Ф. — Штрос, Ф.: Удельное потребление кислорода и дыхательный коэффициент, характеризующие производство дрожжевых белковых веществ из этанола. 2-ая часть. Сравнение теоретических формул с экспериментальными данными. Квас. прум., **22**, 1976, № 12, стр. 272–275.

Результаты экспериментов, проведенных авторами доказали их совпадение с теоретическими формулами, выведенными для расчета выхода белковых веществ и потребления кислорода. Непрерывное культивирование в данном количестве и виде субстрата можно выразить посредством формулы: удельное потребление кислорода = 208/выход — 1,36. Если в ходе сбраживания накапливается большое количество уксусной кислоты, необходимо приведенную формулу заменить скорректированной, т. е.: удельное потребление кислорода = 208/выход — 1,36 — 1,06 СТА с (СТА с = число граммов образовавшейся уксусной кислоты на 1 грам биологической массы). Приведенные формулы дают полезную и ценную информацию для проектирования и экономических расчетов.

Rut, M. - Madron, F. - Štros, F.: Specific Oxygen Consumption and Respiration Quotient in Manufacturing Processes of Yeast Proteins Made from Ethanol. Part II. Comparison of Theory with Experimental Data. Kvas. prům. **22**, 1976, č. 12, pp. 272–275

It was proved the agreement of theoretical formulas derived in the previous paper for yield and specific oxygen consumption with experimental values of these very important balance characteristics. For continuous cultivation under limit of substrate following formula is applicable: Specific oxygen consumption = 208/yield —

— 1,36 (g O₂ per g biomass). In case of significant acetic acid accumulation corrected formula must be used: Spec. oxygen consumption = 208/yield — 1,36 — 1,06 A, where A are grams of acetic acid produced per gram of biomass formed. The both formulas are usefull for project and economical calculations.

Rut, M. - Madron, F. - Štros, F.: Der spezifische Sauerstoffverbrauch und der Respirationsquotient bei der Erzeugung von Hefeeiweiß aus Äthanol. II. Vergleich der theoretisch abgeleiteten Beziehungen mit den experimentalen Werten. Kvas. prům. 22, 1976, No. 12, S. 272—275

Es wurde die Übereinstimmung zwischen den theore-

tisch abgeleiteten Beziehungen für die Ausbeute und den spezifischen Sauerstoffverbrauch und den Experimentalwerten dieser wichtiger Bilanzparameter bewiesen. Für die kontinuierliche, durch das Substrat limitierte Kultivation gilt die folgende Beziehung: spezifischer Sauerstoffverbrauch = 203/Ausbeute — 1,36. Wenn bei der Fermentation eine grössere Menge der Essigsäure akkumuliert wird, muß für die Errechnung des spezifischen Sauerstoffverbrauchs die folgende korrigierte Beziehung angewandt werden: spezifischer Sauerstoffverbrauch = 208/Ausbeute — 1,36 — 1,06 STAc (STAc gibt die Zahl der Gramme der gebildeten Essigsäure pro Gramm gebildeter Biomasse an). Beide Beziehungen können mit Vorteil bei Projektions- und ökonomischen Berechnungen appliziert werden.