

Speciální fermentační procesy

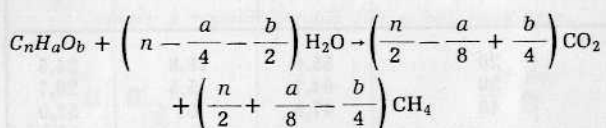
Využitie organických substrátov anaeróbnymi baktériami

663.18

Ing. IVAN ČERNOCH, Doc. Ing. DUŠAN HALAMA, Prof. GERARD GOMA,*[†]) Dr. IRMA DE LA TORRE LOZANO,*[†]) Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Bratislava

Metánová fermentácia má niekoľkonásobný význam. Z praktického hľadiska sa využíva najmä pri čistení odpadovej vody a likvidácii odpadov za súčasného získania väčšiny energie substrátov vo forme metánu, resp. jeho zmesi s CO₂. Nie zanedbateľnou skutočnosťou je aj produkcia vitamínu B₁₂ metánovými baktériami. Túto skutočnosť využívajú v ZSSR, pričom produkcia koncentrátov toho vitamínu je za ich podmienok ekonomicky atraktívna aj pre veľmi zriedené odpadové vody (výpalky po destilácii etanolu alebo acetónbutanolu [1]).

Sumárny vzorec tvorby metánu je



Vlastný vzorec je pomerne zložitý, lebo je vlastne výsledkom dvoch skupín procesov. Prvá zahŕňa tzv. kyslú fermentáciu uskutočňovanú rozličnými anaeróbnymi baktériami. Tieto najprv hydrolyzujú polyméry (napr. polysacharidy) a z monomérov produkujú zmes produktov, v ktorej prevládajú prchavé masťné kyseliny (najmä C₂ a C₄) a v plynných produktoch je to CO₂ a H₂ (obr. 1).

Konečné produkty kyslej fázy sú substrátom pre metánové baktérie, ale sa môžu uvažovať ako prvý stupeň pre výrobu mikrobiálnych bielkovín z rastlinného materiálu. Táto výroba dovoľuje získať až 16násobne viac bielkovín než pri využití pôvodného materiálu v živočišnej produkcii [11]. Metánových baktérií je viac fyziologických skupín (hlavne mezofily, tiež však termofily [2]), ktoré sa môžu deliť na skupiny organotrofných a na skupiny litotrofných baktérií.

Organotrofné využívajú masťné kyseliny, litotrofné CO₂ a H₂. V prevádzkových pomeroch sa uplatňujú vedľa seba.

Prehľad procesov je uvedený v [2].

V posledných rokoch sa zvyšuje záujem o tieto procesy najmä preto, lebo môžu efektívne prispieť k zlepšeniu situácie v oblasti energie a životného prostredia, ale aj (nepriamo) výroby potravín (humusové hnojivo).

Problémy úspešného zvládnutia tejto fermentácie predpokladajú reguláciu podmienok tak, aby metánové baktérie mohli efektívne využívať masťné kyseliny i CO₂ a H₂ na CH₄. V tom je podstata väčšiny ťažkostí.

Metánové baktérie sa rozmnožujú podstatne pomalšie ako baktérie prvej fázy a navyše sú oveľa citlivejšie voči inhibítorom. Sú inhibované neionizovanými masťnými kyselinami (teda pod pH 6), ale aj amoniakom (teda pH nad 8). Sú podstatne citlivejšie ako baktérie prvej

fázy na iné inhibítory, napríklad ťažké kovy. Navyše ide o najstriktnejšie anaeróby — niektoré druhy sa inaktivujú už pri krátkodobom kontakte s kyslíkom.

Pre pomalý rast i nízky výťažok (a teda koncentráciu) biomasy metánová fermentácia vyžaduje dlhú zdržnú dobu. Za bežných podmienok zdržná doba (napr. u aktivačného kalu) býva až 30 dní. Zvýšenie efektivity procesu sa uvažuje viacerými cestami. Jednou z nich je použitie termofilných kultúr (proces je skoro 10krát rýchlejší ako u mezofilov) [3], rozdelenie procesu na kyslú a metánovú fermentáciu do 2 fermentérov, prípadne s recykláciou biomasy [4] alebo použitie náplňových filtrov, ktoré údajne aj za mezofilných podmienok majú dobu zdržania iba medzi 0,15–1,2 dňa [5] (v tomto prípade sa však uvažuje fermentácia iba roztokov — nie suspenzií).

Ďalšou možnosťou je presná regulácia, prípadne až po nasadenie riadiaceho počítača. Nasvedčuje tomu úspešné matematické modelovanie procesu [6].

Niektoré údaje však nasvedčujú [4], [5], [12], že je možné podstatne urýchliť metanogézu až po rýchlost porovnateľnú s rýchlosťou tvorby prchavých organických kyselín a pri oddelení oboch fáz je ľahšie regulovať metanogézu. Potom by celková produktivita v systéme bola primárne závislá na zvládnutí acidogézy.

Z bioinžinierstva je známe, že ak sa jedná o inhibíciu produktom (v našom prípade organické kyseliny), reaktor s piestovým tokom, alebo kaskáda ideálne miešaných reaktorov sú účinnejšie ako ideálne miešaný reaktor. Naopak, ak je inhibítorom substrát, kontinuálne miešaný reaktor je najúčinnjší. Ako už bolo spomenuté, je preto vhodné rozdeliť proces tvorby CH₄ na acidogézu a metanogézu. Pri acidogéze sa používa buď reaktor s piestovým tokom, alebo kaskáda ideálne miešaných reaktorov a pre metanogézu sa používa dokonale miešaný reaktor. Tento postup bol navrhnutý Wisem a kol. [7] a neskoršie pre metanizáciu rozpustného substrátu Gomom [8].

V našich experimentoch sme sa zaoberali ako periodickou, tak i kontinuálnou fermentáciou s nahromadenou kultúrou baktérií I. (kyslej) fázy.

Tento článok opisuje výsledky periodickej fermentácie.

Materiál a metódy

Použitý fermentér bol sklenený, 30litrový, s mechanickým miešaním, opatrený registráciou a reguláciou pH a teploty. Sterilizoval sa prehánaním vodnou parou počas 1 h; pH elektróda chemicky. Pôda sa sterilizovala zvlášť 30 min pri pretlaku 0,15 MPa s dodatočnou úpravou pH po sterilizácii. Do fermentéra sa preniesla asepticky ešte za horúca a nechala v ňom vychladnúť za chladenia a bez miešania. Kyslík sme neodstraňovali.

pH sa regulovalo na 6; v niektorých pokusoch sme pH neregulovali. Kultivácia a fermentácia sa robili pri rôznych teplotách do 40 °C.

Časť experimentálnych výsledkov bola získaná počas študijného pobytu I. Černocho vo Francúzsku, v Toulouse.

*[†]) Laboratoire de Génie Biochimique, I. N. S. A., Avenue de Rangueil Toulouse, France.

Kultivačná pôda mala nasledovné zloženie v g/l: sacharóza 50, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,42, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 2,0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,4, CaCl_2 : 0,03, KCl : 0,08.

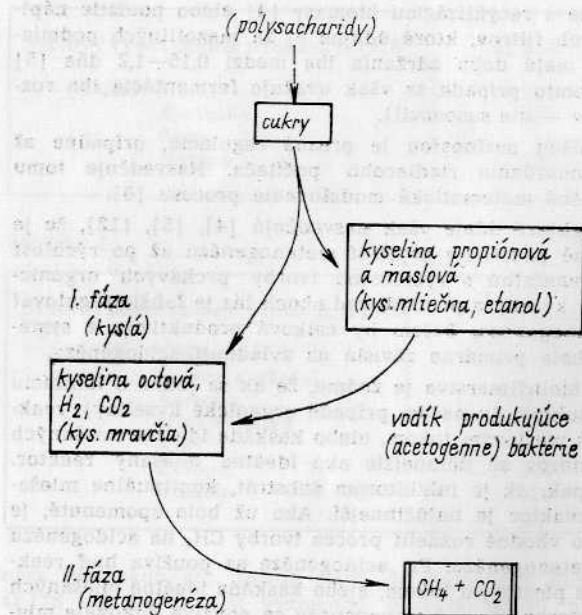
Selekcia zmesných bakteriálnych kultúr

Selekcia sa urobila z mestskej čističky odpadových vôd, v ktorej sú nasledovné kultivačné podmienky: teplota 28 °C, pH 6,8. Chovanie referenčnej zmesnej bakteriálnej kultúry, získanej priamo z aktivovaného kalu, sa porovnávalo s kultúrou po 3mesačnej kontinuálnej kultivácii bez regulácie pH s kultúrou po 6mesačnej kontinuálnej kultivácii s reguláciou pH (pH 6). Chovanie referenčnej a izolovaných kultúr sa študovalo v 30 l ideálne miešanom reaktore, s reguláciou teploty (30 °C).

Analytické metódy

Koncentrácia biomasy (X) bola meraná gravimetrickou metódou. Používal sa filter Millipore (porozita 0,22 μm). Biomasa sa sušila 24 h pri teplote 50 °C pod vakuom. Sacharóza sa stanovovala DNS [dinitrosalicilovou] metódou, po kyslej hydrolýze.

Prchavé organické kyseliny (kyselina octová, propionová, maslová a valérová) sa stanovovali plynovou chromatografiou.



Obr. 1. Hlavné medziprodukty tvorby metánu zo sacharidov

Výpočty

Výťažkové koeficienty pri kontinuálnej a batch kultivácii boli počítané pomocou nasledovných vzťahov

$$Y_p = \frac{(\Sigma P_s - \Sigma P_n)}{(\Sigma S_n - \Sigma S_8)} = \frac{\text{g kyselín}}{\text{g sacharózy}} \quad (\text{kontinuál}) \quad (1)$$

$$Y_p = \frac{\Sigma P_i - \Sigma P_i}{S_i - S_f} = \frac{\text{g kyselín}}{\text{g sacharózy}} \quad (\text{batch}) \quad (2)$$

Produktivita pri kontinuálnej kultivácii sa počíta:

$$P = \frac{F \cdot \Sigma P_i}{V} \quad [\text{g/lh}] \quad (3)$$

Špecifická rastová rýchlosť v n-tej etáži sa počíta:

$$\mu_n = \frac{1}{X_n} \cdot \left[\left(\frac{dX}{dt} \right)_n + \frac{F}{V_n} (X_n - X_{n-1}) \right] \quad (4)$$

Tabuľka 1. Vplyv teploty na inhibičnú konštantu vo vzťahu ($\mu = \mu_m (K_p / K_p + P)$ bez regulácie pH. $S_0 = 50 \text{ g/l}$).

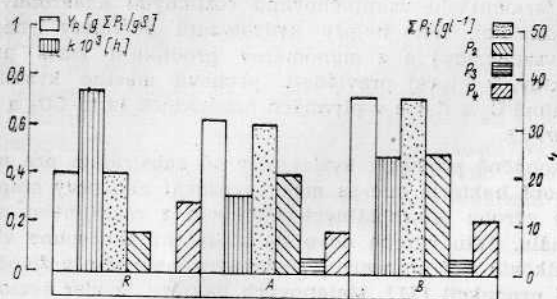
Teplota °C	20	35	40
$K_p \text{ g/l}$	0,2	0,99	2,7

Tabuľka 2. Vplyv teploty na inhibičnú konštantu vo vzťahu ($\mu = \mu_m (K_p / K_p + P)$, pH = 6. $S_0 = 50 \text{ g/l}$).

Teplota °C	20	30	40
$K_p \text{ g/l}$	3,2	6,9	13,3

Tabuľka 3. Zloženie organických kyselín vo hmotových % po skončení fermentácie za podmienok uvádzaných v tab. 2

Teplota °C	Octová	Propiónová	Maslová
20	55,6	18,8	24,5
30	64,7	5,5	29,7
40	47,9	0	52,0



Obr. 2. Kinetické parametre acidogenézy pre 3 kultúry R, A a B. v_s — rýchlosť spotreby substrátu, Y_p — výťažkový koeficient produkcie kyselín, P_i je produkcia kyselín ($P_2 + P_3 + P_4$), P_2 značí kyselinu octovú, P_3 kyselinu propiónovú, P_4 kyselinu maslovú. Koncentrácie kyselín sú vyjadrené vo váhových %.

Špecifická rýchlosť tvorby produktu (prchavých mastných kyselín) je

$$\mu_n = \frac{v_{pn}}{X_n} = \frac{1}{X_n} \left[\left(\frac{dP}{dt} \right)_n + \frac{F}{V_n} (P_n - P_{n-1}) \right] \quad (5)$$

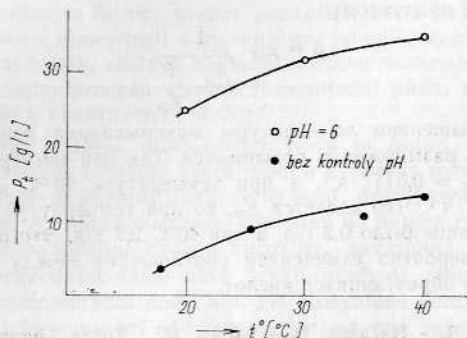
Parametre kinetiky rastu a produkcie kyselín sa vypočítali metódou najmenších štvorcov po grafickom vyrovnaní nameraných údajov. Použili sa vlastné programy a kalkulátor HP 9810 A.

Správnosť výpočtu sa kontrolovala aj porovnaním údajov modelovaných z vypočítaných parametrov a nameraných.

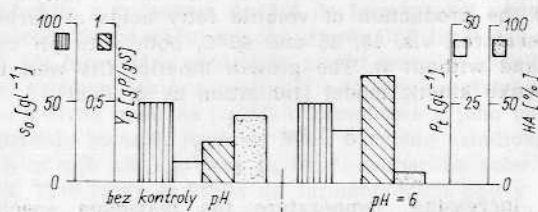
VÝSLEDKY

Porovnanie referenčnej zmesnej bakteriálnej kultúry so selektovanou zmesnou bakteriálnou kultúrou.

Porovnanie chovania sa referenčnej kultúry [R] a selektovaných kultúr [A a B] sa robilo v batch procese pri pH 6 a teplote 30 °C. Najreprezentatívnejšie (najcharakteristickejšie) parametre rastu sú znázornené na obr. 2, koncentráciu kyselín (ΣP_i), rýchlosť degradácie substrátu a koncentrácie jednotlivých vyprodukovaných kyselín (P_2 octová, P_3 propiónová, P_4 maslová). Veľmi významné zmeny možno pozorovať vo zvýšení hodnoty výťažkového koeficientu produktov Y_p vzhľadom k č. 1 a maximálnej koncentrácii kyselín (ΣP_i).



Obr. 3. Závislosť celkovej koncentrácie kyselín (P_i) od teploty s reguláciou pH (6) a bez regulácie.



Obr. 4. Efekt regulácie pH. HA je % neionizovaných kyselín po ukončení fermentácie. Teplota reakcie $t = 40$ °C.

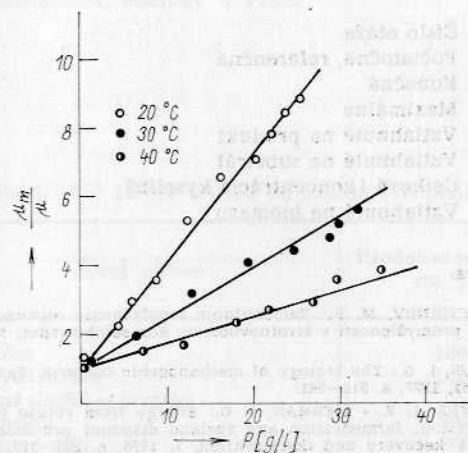
Výťažkový koeficient sa zvýšil z 0,4 g/g [referenčná kultúra R] na 0,75 g/g [kultúra B] a sumárna koncentrácia kyselín sa tiež zmenila z 18 g/l na 36 g/l. Rýchlosť degradácie substrátu mierne poklesla. Pre kultúry A a B inhibícia produktom je menšia, ako by sa dalo očakávať pri danej koncentrácii organických kyselín.

Efekt pH a teploty na selektovanú zmesnú kultúru

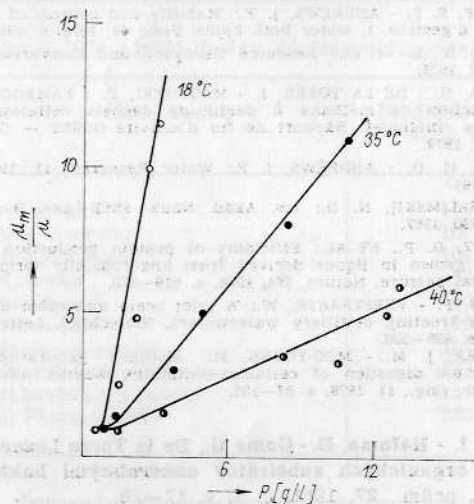
Závislosť maximálnej koncentrácie kyselín (ΣP_i) od teploty pre dve série experimentov, s reguláciou pH je na obrázku 3 ($S_0 = 50$ g/l). Zvýšenie teploty spôsobuje vzrast koncentrácie kyselín, čo je dané nižším inhibičným efektom organických kyselín pri vyšších teplotách.

Obrázok 4 umožňuje porovnať výsledky pokusov pri pH 6 a bez regulácie pH ($t = 40$ °C, $S_0 = 50$ g/l). Z obrázku číslo 4 sú zrejmé významné zmeny v produkcii organických kyselín a v zložení neionizovaných kyselín (počítalo sa podľa vzťahov, ktoré uvádzajú BUHR a ANDREWS [9]). Tieto výpočty potvrdzujú, že neionizované kyseliny majú väčší inhibičný účinok. Inhibícia špecifickej rastovej rýchlosti sa javí ako nekompetitívna inhibícia a je popísaná vzťahom [10]. Táto hypotéza je dvakrát verifikovaná, pri regulácii a bez regulácie pH ako to je zobrazené na obrázku 5 a 6, kde pomer μ_m/μ je vyneseny v závislosti od koncentrácie kyselín pri rôznych teplotách, pH je regulované (obr. 5) alebo nie (obr. 6). V oboch prípadoch je zrejmé, že smernica závislosti $\mu_m/\mu = f(P)$ sa znižuje so vzrastajúcou teplotou.

Z výsledkov (pozri obr. 5, 6, tab. 1 a 2) vyplýva, že zvyšovaním teploty sa relatívny inhibičný účinok kyselín znižuje.



Obr. 5. Zmena μ_m/μ v závislosti od celkovej koncentrácie kyselín. Z obrázku je zrejmé, že závislosť je lineárna. Reakcia sa riadi modelom Jarovenka, platným pre inhibíciu produktom. $\mu = \mu_m (K_P / (K_P + P))$. $S_0 = 50$ g/l, pH = 6, $t = 20, 30, 40$ °C



Obr. 6. Zmena μ_m/μ od P_i . $S_0 = 50$ g/l, pH nebola regulovaná, teplota 20, 30, 40 °C.

Zníženie inhibičného účinku možno vysvetliť zmenou pomeru produkovaných organických kyselín (tabuľka 3), napr. praktickým vymiznutím kyseliny propiónovej.

Zvýšenie teploty podstatne urýchľuje rast kultúr. Pri pH 6 sa zvýšila maximálna špecifická rastová rýchlosť z 0,0117 h⁻¹ (20 °C) na 0,0217 h⁻¹ (40 °C).

Použité symboly

- F — Objemový prietok (kg · h⁻¹)
- K_P — Inhibičná konštanta Jarovenkovho modelu (kg · m⁻³)
- P — Koncentrácia produktu (Σ organických kyselín, P_2 — octová, P_3 — propiónová, P_4 — maslová) (kg · m⁻³)
- S — Produktivita (kg · m⁻³ · h⁻¹)
- V — Koncentrácia substrátu (kg · m⁻³)
- P — Objem (m³)
- X — Koncentrácia biomasy (kg · m⁻³)
- v — Reakčná rýchlosť (kg · m⁻³ · h⁻¹)

- μ — Špecifická rastová rýchlosť (h^{-1})
 v — Špecifická rýchlosť tvorby produktu (h^{-1})

Indexy

- n — Číslo etáže
 $i, 0$ — Počiatočná, referenčná
 f — Konečná
 m — Maximálna
 p — Vzťahnuté na produkt
 s — Vzťahnuté na substrát
 t — Celková (koncentrácia kyselín)
 x — Vzťahnuté na biomasu

Literatúra

- [1] GAJNETDINOV, M. F.: Racionalnoje ispol'zovanie otchodov piščejvoj promyšlenosti v životnovodstve. Rossseľchozizdat, Moskva 1978.
[2] ZEIKUS, J. G.: The biology of methanogenic bacteria: Bacteriol. Rev. **41**, 1977, s. 514–541.
[3] PFEFFER, J. Z. - LIEBMAN, J. C.: Energy from refuse by bio-conversion, fermentation and residue disposal processes. Resource Recovery and Conservation, **1**, 1976; s. 295–313. COONLEY, C. L. - WISE, D. L.: Thermophilic anaerobic digestion of solid waste for fuel gas production. Biotechnol. Bioeng. **17**, 1975; s. 1119–1135.
[4] GHOSH, S. - KLAS, D. L.: Two — phase anaerobic digestion. Process Biochem., April 1978, s. 15–24.
[5] JEWEL, W. J., ET AL.: Anaerobic fermentation of agricultural residue: Potential form improvement and implementation. USDA Final Report EY-76-S-02-2981-7. Cornell University, Ithaca, N. Y. 1978.
[6] GRAEF, S. P. - ANDREWS, J. F.: Stability and control of anaerobic digestion. J. Water Poll. Contr. Fed., **48**, 1974 s. 886–883.
[7] WISE, D. L. et al.: Resource Recovery and Conversion, **3**, 41–59, 1978.
[8] GOMA, G. - DE LA TORRE, I. - MAUGHERI, F. - YAMEOGO, T.: Production de méthane à partir de déchets cellulotiques: Études cinétiques. Rapport de fin d'activité DGRST — Comité VEDA, 1979.
[9] BUHR, H. O. - ANDREWS, J. F.: Water Research, **11**, 1967, s. 129–143.
[10] JERUSALIMSKIJ, N. D.: Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol., s. 339–350, 1967.
[11] HENRY, D. P., ET AL.: Efficiency of protein production from yeast grown in liquor derived from anaerobically fermented tropical pasture. Nature, **274**, 1978, s. 619–620.
[12] PIPYN, P. - VERSTRAETE, W.: A pilot scale anaerobic upflow reactor treating distillery wastewaters. Biotechnol. Letters, **1**, 1979, s. 495–500.
SCHAER, J. M. - MOO-YOUNG, M.: Methane generation by anaerobic digestion of cellulose-containing wastes. In: Adv. Biocem. Eng., **11** 1979, s. 87–101.

Černoch, I. - Haľama, D. - Goma G., De la Torre Lozano, I.: Využitie organických substrátov anaerobnými baktériami. Kvas. prům., **27**, 1981, č. 1, s. 17–20.

Na syntetickej modelovej pôde v periodickej kultúre sa sledovala produkcia prchavých mastných kyselín zmesnou kultúrou anaerobných baktérií pri teplotách 18,35 a 40 °C, bez a s reguláciou pH [6]. Kinetika rastu je v dobrom súlade s kinetickým modelom podľa Jarovenka (inhibícia produktom)

$$\mu = \mu_m \frac{1}{1 + \frac{P}{K_p}}$$

So zvyšovaním teploty rastie maximálna špecifická rastová rýchlosť (pri 18 °C) $\mu_m = 0,0117 \text{ h}^{-1}$, pri 40 °C $\mu_m = 0,0217 \text{ h}^{-1}$ a K_p sa zvýšilo z 0,2 g/l (18 °C) na 2,7 g/l pri 40 °C. Pravdepodobne je to spôsobené zmenou v pomere produkovaných kyselín.

Чернох, И. — Халама, Д. — Гома, Г. — Торре Лозанэ, И.: Использование органических субстратов анаэробными бактериями. Квас. прум. **27**, 1981, № 1, стр. 17–20.

На синтетической питательной среде развелись периодически культуры, состоявшие из смеси штаммов анаэробных бактерий для изучения выделения ими летучих жирных кислот. Эксперименты проводились при разных температурах, т. е. 18, 35 и 40 °C как с регулируемой pH, так и без регулировки. Кинетика роста хорошо совпадает с кинетической моделью Яровенко (по давлению продуктом)

$$\mu = \mu_m \frac{1}{1 + \frac{P}{K_p}}$$

С повышением температуры максимальная удельная скорость размножения повышается. Так при температуре 18 °C $\mu_m = 0,0117 \text{ ч}^{-1}$, а при температуре 40 °C $\mu_m = 0,0217 \text{ ч}^{-1}$. Что касается K_p , то при температуре 18 °C его значение было 0,2 г/л, а при 40 °C 2,7 г/л. Это объясняется вероятно изменением соотношения между количествами образующихся кислот.

Černoch, I. - Haľama, D. - Goma, G. - Torre Lozano, I.: Consumption of Organic Substrates by Anaerobic Bacteria. Kvas. prům. **27**, 1981, No. 1, pp. 17–20.

Synthetic modelling medium has been used for periodic cultivation of mixed strains of anaerobic bacteria to study the production of volatile fatty acids at various temperatures, viz. 18, 35 and 40 °C, both with pH control and without it. The growth kinetics fits well the Jarovenko kinetic model (inhibition by product)

$$\mu = \mu_m \frac{1}{1 + \frac{P}{K_p}}$$

With increasing temperature the maximum specific growth rate is higher. At 18 °C it is $\mu_m = 0,0117 \text{ h}^{-1}$ and at 40 °C $\mu_m = 0,0217 \text{ h}^{-1}$. The K_p values increased from 0,2 g/l (18 °C) to 2,7 g/l (40 °C). Apparently the increase is due to the changing relation in the proportions of produced acids.

Černoch, I. - Haľama, D. - Goma, C. - Torre Lozano, I.: Ausnützung organischer Substrate durch anaerobe Bakterien. Kvas. prům. **27**, 1981, No. 1, S. 17–20.

Auf synthetischen Modellmedium wurde in periodischer Kultur die Produktion flüchtiger Fettsäuren durch Mischkultur anaerober Bakterien bei Temperaturen von 18, 35 und 40 °C ohne Regulation und mit Regulation des pH [6] verfolgt. Die Wachstumskinetik ist in guter Übereinstimmung mit dem kinetischen Modell nach Jarovenko (Inhibition durch das Produkt)

$$\mu = \mu_m \frac{1}{1 + \frac{P}{K_p}}$$

Mit der Temperaturerhöhung wächst auch die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit (bei 18 °C) $\mu_m = 0,0117 \text{ h}^{-1}$, bei 40 °C $\mu_m = 0,0217 \text{ h}^{-1}$ und K_p wurde die Erhöhung aus 0,2 g/l (18 °C) auf 2,7 g/l bei 40 °C festgestellt. Diese Erscheinung hängt wahrscheinlich mit der Änderung in dem Verhältnis der produzierten Säuren zusammen.