

# Speciální fermentační procesy

## Anaeróbna produkcia nižších mastných kyselín v kaskáde dokonale miešaných reaktorov

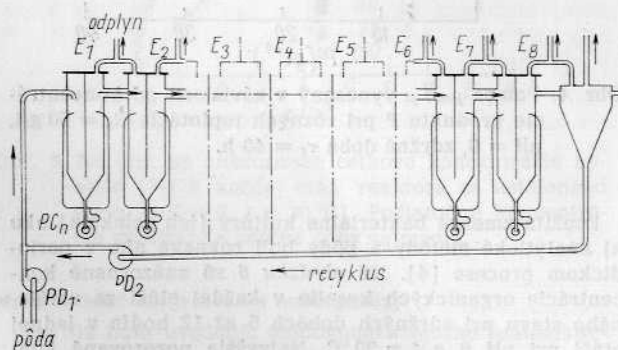
ING. IVAN ČERNOCH, DOC. ING. DUŠAN HALAMA, CSc. Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta Slovenskej vysokej školy technickej, Bratislava

V predchádzajúcej práci [4] sme sa zaoberali produkciou nižších mastných kyselín adaptovanou nahromaďovacou kultúrou anaeróbných baktérií. Z rozboru rastových a produkčných kriviek vyplynulo, že sa môžu dobre vyjadriť známymi vzťahmi pre inhibíciu produktom a pre tvorbu produktu. V tejto práci sme sa zamerali na overenie použiteľnosti uvedených kinetík pre popis chovania sa kontinuálneho systému a navrhli sme matematický model acidogenézy u reaktora s piestovým tokom.

Dvojfázová metánová fermentácia sa považuje za pomalú a citlivú na zmeny podmienok. Je to dané vlastnosťami metánových baktérií: pomerne veľmi malá maximálna špecifická rastová rýchlosť a citlivosť voči inhibítorom [1].

Ukazuje sa však, že metánová fermentácia sa môže podstatne urýchliť niektorými novšími technologickými postupmi, zvyšujúcimi koncentráciu biomasy [2] a potom pre celkovú rýchlosť fermentácie bude rovnako dôležitá I. fáza — tvorba nižších mastných kyselín. Zvládnutie procesu predpokladá znalosť kinetiky rastu a produkcie. Prvú informáciu môže poskytnúť analýza výsledkov periodickej kultivácie (napr. *Jarovenko* [3] pre produkciu etanolu); spoľahlivejšie výsledky sa však získajú v kontinuálnom procese.

Pri inhibícii produktom dáva lepšie výsledky kontinuálna fermentácia s piestovým tokom. V tomto článku je opísané štúdium kinetiky produkcie nižších mastných kyselín zmesnou bakteriálnou kultúrou v kaskáde 8 dokonale miešaných reaktorov (obr. 1), ktorú môžeme aproximovať vzťahmi platnými pre piestový tok [6].



Obr. 1. Schéma multietážového fermentora.  $PD_1$  — čerpadlo dávkujúce pôdu,  $PD_2$  — recirkulačné čerpadlo,  $PC_n$  — čerpadlo zabezpečujúce dokonalé miešanie v  $n$ -tom reaktore).

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

### SPŮSOB VÝPOČTU

Výťažkové koeficienty pri kontinuálnej kultivácii boli počítané podľa vzťahu

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

Špecifická rastová rýchlosť v  $n$ -tej etáži sa počítala pomocou vzťahu:

$$\mu_n = \frac{v_{xn}}{X_n} = \frac{1}{X_n} \left[ \frac{F}{V_n} (X_n - X_{n-1}) + \left( \frac{dX}{dt} \right)_n \right] \quad (2)$$

Špecifická rýchlosť tvorby produktu (prchavých mastných kyselín) v  $n$ -tej etáži získame analogickým spôsobom ako v predchádzajúcom prípade:

$$v_n = \frac{v_{pn}}{X_n} = \frac{1}{X_n} \left[ \frac{F}{V_n} (P_n - P_{n-1}) + \left( \frac{dP}{dt} \right)_n \right] \quad (3)$$

Nakoľko sa v tomto prípade jedná o inhibíciu produktom, pre špecifickú rastovú rýchlosť dostatočne vyhovoval Jerusalemského vzťah

$$\mu_n = \mu_m \frac{K_p}{K_p + P_n} \quad (4)$$

Maximálna špecifická rastová rýchlosť  $\mu_m$  a inhibičná konštanta  $K_p$  sa získali zo závislosti  $1/\mu_n = f(P_n)$  metódou najmenších štvorcov.

Pre kinetiku tvorby produktu dostatočne vyhovoval vzťah *Leudeking, Piret* [5].

$$v_{pn} = (\alpha \mu_n + \beta) X_n \quad (5)$$

Parametre  $\alpha$  a  $\beta$  sa tiež počítali metódou najmenších štvorcov.

### MATERIÁL A METÓDY

Na kontinuálnu kultiváciu sa použila kaskáda 8-ich dokonale miešaných reaktorov, zapojených do série. Ako zdroj uhlíka sa používala sacharóza v koncentráciách od 50 do 150 g/l. Aby sa zmenšila možnosť vyplavenia buniek z reaktora a zvýšila hustota buniek v systéme, použila sa recyklizácia. Za 8. etážou je dekantér, z ktorého sa privádza recykus do prvej etáže (obr. 1). Analytické metódy: popri [4].

### VÝSLEDKY

#### Vplyv zdržnej doby

Fermentácia sa robila pri pH 6, teplote 30 °C, počiatočná koncentrácia sacharózy v živnej pôde na vstupe do kaskády reaktorov bola 50 g/l. Objemová rýchlosť recyklu bola  $2.1 \cdot 10^{-3}$  l/h. Obrázok 2 znázorňuje pre rôzne zdržné doby, od 12 do 48 h, zmenu výťažkového koeficientu  $Y_p$ , zmenu maximálnej koncentrácie organických kyselín, zmeny koncentrácie kyseliny octovej a maslovej, ktoré sú najdôležitejšie a spotrebu substrátu. Výťažkový koeficient  $Y_p$  vzrastá so vzrastom zdržnej doby, maximálna koncentrácia kyselín bola pri  $\tau_s = 48$  h (40 g/l).

Pre všetky zdržné doby špecifická rastová rýchlosť je korelovaná s koncentráciou organických kyselín po-

Tabuľka 1. Vplyv teploty na inhibičnú konštantu  $K_p$  vo vzťahu  $\mu = \mu_m [K_p / (K_p + P)]$  pri kontinuálnej kultivácii v multietážovom reaktore, pH = 6, počiatočná koncentrácia substrátu  $S_0 = 50$  g/l, zdržná doba v reaktore 40 h.

Teplota °C	30	35	40
$K_p$ g/l	6,1	6,6	16

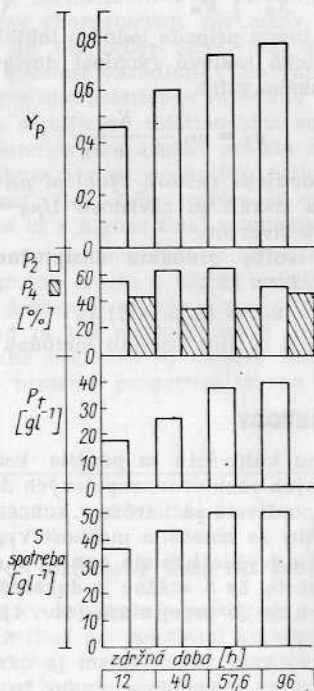
mocou vzťahu *Jerusalimského*. Inhibičná konštantá  $K_p = 6,3 \pm 0,1$  g/l je trochu menšia ako  $K_p$  zistené pri batch procese [4] ( $K_p = 6,9$  g/l).

Pre túto sériu experimentov špecifická rýchlosť produkcie kyselín je úmerná špecifickej rastovej rýchlosti (obr. 3). Vzťah medzi

$$\frac{v_p}{X} \text{ a } \mu \text{ je } \frac{v_p}{X} = 17,5 \mu \quad (6)$$

### Vplyv teploty

Už pri batch kultivácii [4] bol spomenutý *Jerusalimského* vzťah. Tiež pri kontinuálnej kultivácii platí tento vzťah. Závislosť  $\mu_m / \mu$  od  $P$  je znázornená na obr. 4. Aj v tomto prípade závislosť  $\mu_m / \mu$  od  $P$  je lineárna a inhibičný efekt kyselín sa znižuje so zvyšovaním teploty. Z tabuľky 1 vidieť že hodnoty  $K_p$  v kontinuálnej a batch kultivácii [4] sa veľmi nelíšia a že vyššie teploty sú pre kultiváciu vhodnejšie.



Obr. 2. Efekt zdržnej doby na spotrebu substrátu, na celkovú koncentráciu kyselín [ $P_t$ ], na pomer kyseliny octovej ku kyseline maslovej a na výťažkový koeficient produktu (prchavých masných kyselín).

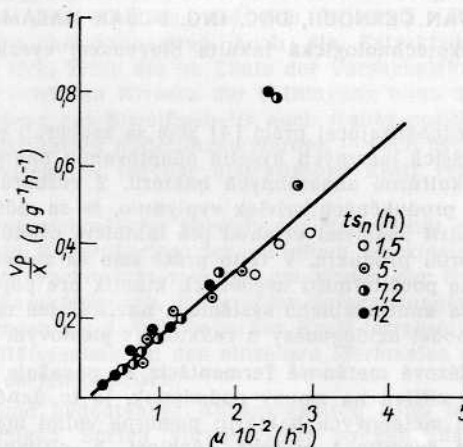
Pretože pri 40 °C sa produkuje viac kyseliny maslovej ako kyseliny octovej, možno predpokladať, že kyselina maslová má nižší inhibičný efekt ako octová (pravdepodobne preto, že je hydrofóbnejšia).

V študovanom teplotnom intervale možno rovnako ako pri batch fermentácii pozorovať lineárny vzťah medzi špecifickou rastovou rýchlosťou a špecifickou rýchlosťou produkcie kyselín (obr. 5).

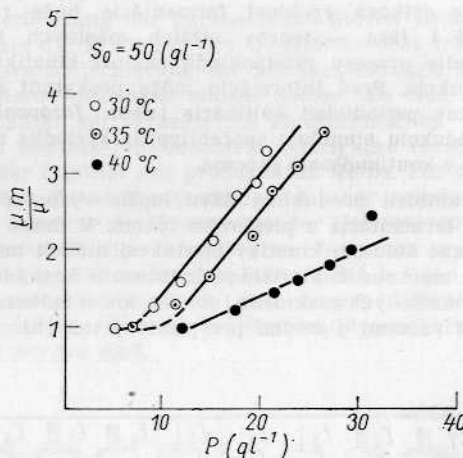
### Efekt počiatočnej koncentrácie substrátu na acidogénu

Pri kontinuálnej kultivácii sme sledovali efekt troch počiatočných koncentrácií sacharózy v živnej pôde: 50,75 a 150 g/l. Pri koncentrácii 150 g/l sa jedná o fermentáciu s extrémnou koncentráciou substrátu a produktu.

Kyslá fermentácia sa študovala pri 30, 35 a 40 °C (mezofilné baktérie), pri pH = 6 bolo kontrolované pri rôznych zdržných dobách: 12, 36, 48 a 104 h.



Obr. 3. Závislosť špecifickej rýchlosti tvorby produktu od  $\mu$ . Výsledky boli získané v kontinuálnej kultivácii pri rôznych zdržných dobách ( $t = 30$  °C, pH = 6).



Obr. 4. Pomer  $\mu_m / \mu$  vynesný v závislosti od koncentrácie produktu  $P$  pri rôznych teplotách.  $S_0 = 50$  g/l, pH = 6, zdržná doba  $\tau_s = 40$  h.

Použité zmesné bakteriálne kultúry (ich selekcia) ako aj analytické metódy a pôdy boli rovnaké ako v periodickom procese [4]. Na obrázku 6 sú znázornené koncentrácie organických kyselín v každej etáži za ustáleného stavu pri zdržných dobách 5 až 12 hodín v jednej etáži pri pH 6 a  $t = 30$  °C. Najvyššia pozorovaná koncentrácia organických kyselín je 61 g/l, čo je veľmi vysoká hladina tolerancie pre organické kyseliny. Nad touto koncentráciou kyselín baktérie nie sú schopné sa rozmnožovať alebo produkovať organické kyseliny.

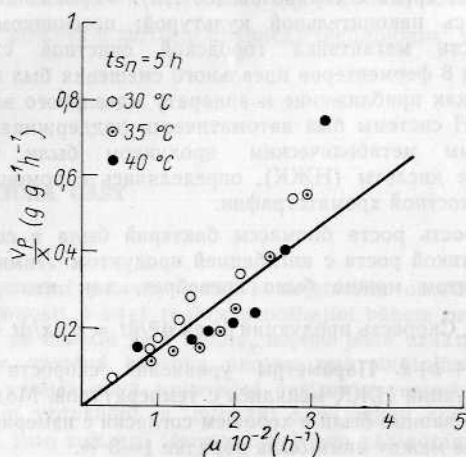
Multietážová kontinuálna kultivácia umožňuje počítať v každej etáži  $\mu_n$  a  $\mu_m$ , ktorú získame extrapoláciou koncentrácie produktu na  $P = 0$ . Maximálna špecifická rastová rýchlosť získaná takýmto spôsobom je funkciou počiatočnej koncentrácie substrátu  $S_0$ . Bol nájdený vzťah medzi  $\mu_m$  a  $S_0$ , ktorý je charakteristický pre nízky inhibičný efekt sacharózy (obr. 7). Maximálna špecifická

rastová rýchlosť  $\mu_m$  pri  $S_0 \rightarrow 0$  je  $0,0321 \text{ h}^{-1}$  a platí vzťah:

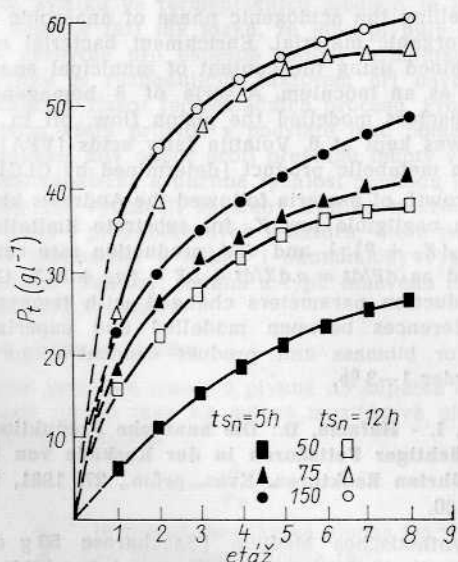
$$\mu = 0,0321 [1 - 0,0036 S_0] \quad (7)$$

$$[\mu = [\text{h}^{-1}], S_0 = [\text{g/l}]]$$

Podobné výsledky boli získané v batch kultivácii.



Obr. 5. Závislosť špecifickej rýchlosti tvorby produktu od  $\mu$  pri rôznych teplotách (ostatné reakčné podmienky sú rovnaké ako pre obr. 4).



Obr. 6. Na obr. sú znázornené celkové koncentrácie kyselín  $[P_i]$  v každej etáži reaktora za ustáleného stavu  $[\text{pH} = 6, t = 30^\circ\text{C}]$ . Počiatočné koncentrácie substrátu a zdržné doby sa menia.

#### Matematické modelovanie acidogenézy

Ako už bolo uvedené, acidogenézu možno matematicky popísať nasledovnými vzťahmi

$$\mu = \mu_m \frac{K_p}{K_p + P} \quad (8)$$

$$v_p = (\alpha \mu + \beta) X \quad (9)$$

$$v_p = \left( \alpha \mu_m \frac{K_p}{K_p + P} + \beta \right) X \quad (10)$$

predpokladáme, že platí

$$Y_x = \frac{v_x}{v_s} \quad (11)$$

$$Y_p = \frac{v_p}{v_s} \quad (12)$$

môžeme písať

$$v_s = \frac{v_x}{Y_x} + \frac{\alpha \mu X + \beta X}{Y_p} \quad (13)$$

úpravou dostaneme

$$v_s = (\alpha \mu + \beta) X \quad (14)$$

kde

$$a = \frac{1}{Y_x} + \frac{\alpha}{Y_p} \quad (15)$$

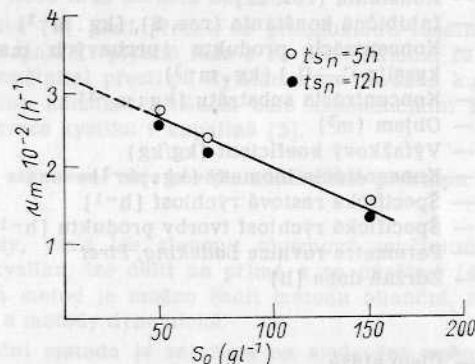
potom

$$v_s = \frac{a \mu_m K_p + \beta (P + K_p)}{P + K_p} \cdot X \quad (16)$$

$$v_s = \frac{a \mu_m K_p + \beta K_p + \beta P_0 + Y_p S_0 A \beta}{Y_p S_0 A + P_0 + K_p} (X_0 + Y_x S_0 A)$$

Predpokladáme, že kaskádu 8-mich ideálne miešaných reaktorov možno popísať vzťahmi platnými pre reaktor s piestovým tokom. Pre výpočet zdržnej doby u reaktora s piestovým tokom platí projektová rovnica [8, 9].

$$\tau_s = S_0 \int_{A_0}^A \frac{dA}{v_s} \quad (18)$$



Obr. 7. Vplyv počiatočnej koncentrácie substrátu [glukózy] na  $\mu_m$ , extrapolovanú na nulovú koncentráciu produktu (podmienky sú tie isté ako pre obr. 6).

$$A = \frac{S_0 - S}{S_0} \text{ kde } A \text{ je stupeň konverzie}$$

Po integrácii dostaneme

$$\tau_s = \frac{1}{C \cdot Y_x + X_0 \beta Y_0} \cdot \left[ \ln |X_0 + Y_x S_0 A| \cdot \left( E - \frac{X_0 Y_p}{Y_x} \right) + \ln |C + \beta Y_p S_0 A| \cdot \left( \frac{C}{\beta} - E \right) \right] \quad (19)$$

$$C = a \mu_m K_p + K_p + \beta P_0 \quad (20)$$

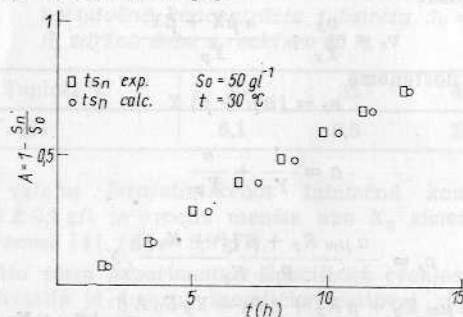
$$E = K_p + P_0 \quad (21)$$

Experimentálne výsledky sú porovnávané s výsledkami počítanými pomocou vzťahu (19). Kinetické parametre boli vypočítané z experimentálnych dát.

Výsledky sú porovnávané tak, že stupeň konverzie ako funkciu zdržnej doby počítanej a experimentálnej nanesieme do jedného grafu a počítame relatívnu odchýlku medzi modelom a experimentom (pri experimentálnych výsledkoch sa jedná o výsledky získané za ustáleného stavu). Ako príklad sa uvádza obr. 8. Model sa ukázal ako spoľahlivý a jeho presnosť, testovaná na viacerých prípadoch je 3 % alebo lepšia. Z toho súčasne vyplýva, že vplyv limitácie substrátom bol v danom prípade zanedbateľný. Možné vysvetlenie je aj v tom, že u určitých kultúr vzniká ako medziprodukt kyselina mliečna



a až z nej sa tvoria prchavé mastné kyseliny. Tento druhý proces je limitujúci. Podrobnejšie sa medziprodukta-mi zaoberá Uribe Larrea [7].



Obr. 8. Verifikácia výsledkov získaných pomocou matematického modelu (rov. 19) s experimentálnymi výsledkami.

#### Použité symboly

- $A$  —  $1 - S \cdot S_0^{-1}$ , stupeň konverzie
- $C$  — Konštanta (rov. 20)
- $E$  — Konštanta (rov. 21)
- $K_p$  — Inhibičná konštanta (rov. 8),  $(\text{kg} \cdot \text{m}^{-3})$
- $P$  — Koncentrácia produktu (prchavých mastných kyselín  $C_2-C_4$ )  $(\text{kg} \cdot \text{m}^{-3})$
- $S$  — Koncentrácia substrátu  $(\text{kg} \cdot \text{m}^{-3})$
- $V$  — Objem  $(\text{m}^3)$
- $Y$  — Výťažkový koeficient  $(\text{kg/kg})$
- $X$  — Koncentrácia biomasy  $(\text{kg} \cdot \text{m}^{-3})$
- $\mu$  — Špecifická rastová rýchlosť  $(\text{h}^{-1})$
- $\nu$  — Špecifická rýchlosť tvorby produktu  $(\text{h}^{-1})$
- $\alpha, \beta$  — Parametre rovnice Ludeking, Piret
- $\tau_s$  — Zdržná doba  $(\text{h})$

#### Indexy

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

#### Literatúra

- [1] ZEIKUS, J. G.: The biology of methanogenic bacteria: Bacteriol. Rev. 41, 1977, s. 514–541.
- [2] JEWELL, W. J., ET AL.: Anaerobic fermentation of agricultural residue: Potential form improvement and implementation, USDA Final Report EY-78-S-02-2981-7. Cornell University, Ithaca, N. Y. 1978.
- [3] GHOSH, S. - KLAS, D. L.: Two — phase anaerobic digestion. Process Biochem., April 1978: 15–24.
- [4] JAROVENKO, V. L. - ROVINSKIJ, L. A.: Modellirovanie i optimalizacija mikrobiologických procesov spirtovovo proizvodstva, Izd. Piščevaja promyšlenost', Moskva, 1978.
- [5] ČERNOCH, I. - HAĽAMA, D. - GOMA, G. - DE LA TORRE, I.: Vy-užitie organických substrátov anaeróbnymi baktériami. Kvas. prŕm., 27, 1981, s. 17–20.
- [6] LUEDEKING, R. - PIRET, E. L.: Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation, J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng., 1, 393, 1959.
- [7] ARIS, R.: Analiz procesov v chímickeskih reaktorach, Izd. chímija, Leningradskoje oddelenie, 1967.
- [8] URIBELARREA, J. L.: Thèse Docteur Ingénieur, INSA Toulouse, 1980.
- [9] LEVENSPIEL, O.: Chemical reaction engineering, Wiley, 1962.
- [10] HIMMELBLAU, D. M. - BISHHOF, K.: Process analysis and simulation deterministic systems, Wiley, 1968.

Чернох, И. — Галяма, Д.: Анаэробная продукция низших жирных кислот в каскаде ферментеров идеального смешения. Квас. прѕм. 27, 1981, № 7, стр. 157–160.

Для моделирования кислой фазы анаэробного разложения органических веществ была использована синтетическая среда с сахарозой (50 г/л). Ферментация проводилась накопительной культурой; источником была жидкость метантенка городской очистной станции. Каскад 8 ферментеров идеального смешения был использован как приближение к аппарату идеального вытеснения. pH системы был автоматически поддерживан на 6. Главным метаболическим продуктом были низшие жирные кислоты (НЖК), определялись с помощью газожидкостной хроматографии.

Скорость роста биомассы бактерий была в согласии с кинетикой роста с ингибцией продуктом. Лимитацией субстратом можно было пренебречь, так что  $\mu = \mu_m \frac{K_p}{K_p + P}$ . Скорость продукции была  $dP/dt = a dx/dt + bx = (a\mu + b)x$ . Параметры уравнений скорости роста и продукции НЖК менялись с температурой. Моделированные данные были в хорошем согласии с измеряемыми: разница между ними была порядка 1–3 %.

Černoch, I. - Haľama, D.: Anaerobic production of volatile fatty acids in serie of homogeneously mixed reactors. Kvas. prŕm. 27, 1981, No. 7, pp. 157–160.

A synthetic sucrose (50 g dm<sup>-3</sup>) medium was used for modelling the acidogenic phase of anaerobic digestion of organic material. Enrichment bacterial culture was obtained using the content of municipal anaerobic digester as an inoculum. A serie of 8 homogeneously mixed reactors modelled the piston flow. pH in whole system was kept at 6. Volatile fatty acids (VFA) were the main metabolic product (determined by GLC).

The growth of bacteria followed the Andrews kinetics, but with negligible low  $K_s$  for substrate limitation, so  $\mu = \mu_m K_p (K_p + P)^{-1}$ , and VFA production rate could be expressed as  $dP/dt = a dX/dt + bX = (a\mu + b)X$ . Growth and production parameters changed with temperature. The differences between modelled and experimental values for biomass and product concentrations were in the order 1–3 %.

Černoch, I. - Haľama, D.: Die anaerobe Produktion niederer flüchtiger Fettsäuren in der Kaskade von homogen gerührten Reaktoren. Kvas. prŕm., 27, 1981, No. 7, S. 157–160.

Ein synthetisches Medium (Saccharose 50 g dm<sup>-3</sup>) wurde für die Modellierung der ersten (säurebildenden) Phase der anaeroben Deegradation organischer Substanzen verwendet. Mittels Wasserphase des Faulraumes der Kommunalabwasserreinigungsanlage wurde als Inokulum eine bakterielle Anreicherungskultur isoliert. Die Kaskade von 8 homogen gerührten Reaktoren modellierte den Rührreaktoren mit Kolbenstroemung. Das Hauptfermentationsprodukt waren niedrige flüchtige Fettsäuren (NFF) (analysiert mit Hilfe von Gaschromatographie).

Die Wachstumskinetik der Bakterien war in Übereinstimmung der Andrewsschen Kinetik, aber mit praktisch unbedeutender  $K_s$  (Konstante der Substratlmitation), wie folgt:  $\mu = \mu_m K_p (K_p + P)^{-1}$ , und die NFF Produktionsrate  $dP/dt = a dX/dt + bX = (a\mu + b)X$ . Die Wachstums- und Produktionsparameter waren temperaturabhängig. Die Unterschiede zwischen modellierten und experimentellen Konzentrationen der Biomasse und der Produkte hielten sich im Bereich von 1–3 %.