

Využití imobilizovaných buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ke kontinuální výrobě ethanolu

663.13
663.1

II. Porovnání několika variant kontinuálních metod

Ing. VĚRA IVANOVA, CSc.^{a)}, Doc. Ing. MOJMÍR RYCHTERA, CSc., Prof. Ing. GABRIELA BASAŘOVÁ, DrSc.,
Vysoká škola chemickotechnologická v Praze

Klíčová slova: *imobilizace, Saccharomyces cerevisiae, kontinuální fermentace, ethanol, bioreaktory*

Ekonomika fermentační výroby ethanolu závisí na pěti hlavních faktorech — na vlastní surovině a její předúpravě, na schopnostech a aktivitě mikroorganismů (s ohledem na maximální využití substrátu a na maximální koncentraci ethanolu v médiu), na zařízení, vlastní technologii a na způsobu izolace. Jak jsme již uvedli v I. části [1], není poslední bod v naší práci zatím studován, ale je třeba si jej neustále uvědomovat. Izolace produktu je proces značně náročný na energii.

Jak vyplývá z literárních údajů mnoha pracovišť, je aplikace imobilizovaných buněk vhodných producentů perspektivní, ale vyžaduje ještě vyřešit řadu technických i technologických problémů. Imobilizace buněk metodou prosté adsorpce je známa již dlouhou dobu a byla využita i v provozním měřítku [2].

Z hlavních výhod použití imobilizovaných buněk je třeba v první řadě uvést:

- Možnost pracovat při vysokých průtocích média (vysoké zředovací rychlosti). Siva Raman et al. [3], Krug a Daugilis [4] uvádějí hodnoty zředovací rychlosti až $11,0 \text{ h}^{-1}$. Výtěžek ethanolu může dosahovat až 96 % teoretické hodnoty [5].
- Je dosahováno vysokých produktivit fermentačních systémů (od 30,0 do 220,0 g ethanolu na 1 litr média za 1 hodinu [1, 3, 7, 8]). Toto zvýšení je především způsobeno vysokou koncentrací buněk ve fermentačním médiu. Při aplikaci buněk imobilizovaných v alginátu může objem kuliček gelu dosahovat 75–80 % celkového fermentačního objemu [6].

Tato studie se opírá o vlastní experimenty prováděné na katedře kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT v Praze v letech 1982–1989 [9, 10] a je věnována porovnání několika variant využití imobili-

a) nyní: Mikrobiologický ústav BAN, Sofie

zovaných buněk kultury lihovarských kvasinek SL 100 v různém uspořádání fermentačních kolon.

MATERIÁL A METODY

K testování byl použit kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* SL 100 ze sbírky katedry kvasné chemie a bioinženýrství VŠCHT v Praze.

Imobilizace byla provedena podle metody popsané v literatuře [11] a doplněna na základě zkušeností pracovníků Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze [12].

Složení fermentačního média (na 1 litr): 120,0 g glukosy, 2,5 g sušeného kvasničného extraktu (Imuna, Šarišské Michalany), 5,0 g peptonu, 1 g KH_2PO_4 , 3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 mg CaCl_2 a 25 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Alginát sodný je produkt norské firmy Protan (Protanal LF 10/60). Ostatní chemikálie byly tuzemské proveniencie (Lachema, Brno). Analýza redukcí-
cích látek byla provedena metodou podle Schoorla a ethanol stanoven oxidimetricky [13].

Použité zařízení

Byla provedena řada pokusů, při kterých byly měněny sestavy fermentačního zařízení — kolon. Maximální objem kolon byl 1000 ml. Pro demonstraci výsledků uvádíme čtyři hlavní sestavy.

V první fermentační řadě byl použit kolonový reaktor o celkovém objemu 200 ml (poměr $H:D = 2,45$; H .. výška kolony, D .. průměr kolony). K němu byl připojen další fermentor jako dokvašovací, kde probíhalo dokvašení cukru kvasinkami uvolněnými z gelu. Objem kapalně fáze ve druhé koloně byl 1000 ml. První reaktor pracoval se zředovací rychlostí až $3,0 \text{ h}^{-1}$ (vztaheno na objem kapalně fáze). Samotný biokatalyzátor v prvním kolonovém fermentoru zaujímal objem 80 % účinného objemu fermentoru. Čerstvé médium bylo přiváděno do spodní části první kolony a částečně prokvašené médium bylo odváděno z vrchní části kolony a pokračovalo do dolní části druhé kolony.

V druhé fermentační řadě byl použit fermentor o celkovém objemu 150 ml naplněný z 80 % biokatalyzátorem. Fermentor byl umístěn v šikmé poloze (úhel odklonu od vertikály — 50°). Zředovací rychlost D_m (vztahena na médium) činila až $1,33 \text{ h}^{-1}$. Šikmo umístěné reaktory se používají tehdy, když biokatalyzátor produkuje mimo hlavní produkt plyn, v tomto případě oxid uhličitý [14]. Dráha, kterou urazí peleta biokatalyzátoru vynášená bublinami CO_2 (závisí na náklonu kolony), je menší než u vertikálních kolon. Neplatí to však pro zcela zaplněné kolony. Někteří autoři uvádějí, že lepších výsledků lze dosáhnout v horizontálně umístěných kolonách [15]. Jejich konstrukce je však náročnější. Příliš velký pohyb pelet, jako např. ve fluidačním bioreaktoru, působí nepříznivě na jejich mechanickou stabilitu [16].

Ve třetí fermentační řadě byla volena kaskáda dvou skloněných reaktorů: první kolonový fermentor měl objem 150 ml ($H:D = 4,3$), druhý 240 ml ($H:D = 7,0$). Zředovací rychlost D_m pro první člen byla $4,4 \text{ h}^{-1}$ a pro druhý člen $1,4 \text{ h}^{-1}$. Čerstvé

médium přicházelo jen do první kolony. Propojení bylo stejné jako v první variantě. Druhý reaktor byl rovněž naplněn peletami.

Ve čtvrté sérii pokusů bylo pořadí fermentorů obrácené v porovnání s předchozí sérií. Zředovací rychlosti byly $1,67 \text{ h}^{-1}$ a $1,33$ (v pořadí první a druhý reaktor). Čerstvé médium přicházelo opět jen do prvního fermentoru.

Jednotlivé kontinuální experimenty byly vedeny 14 dní, nejvýhodnější uspořádání bylo podkladem pro dlouhodobý experiment trvající dva měsíce.

VÝSLEDKY A DISKUSE

1. Anaerobní kontinuální fermentace s dokvašováním v druhém stupni (první varianta)

Pelety alginátu vápenatého obsahující kvasinky jsou v průběhu fermentace narušovány jak růstem buněk, tak působením CO_2 a další řadou mechanických faktorů. Proto dochází k uvolňování buněk do prostředí. Cílem experimentů bylo zjistit možnost využití kvasinek uvolňovaných do prostředí z gelu alginátu vápenatého k dokvašení zbytků zkvasitelného cukru. Výstupní koncentrace glukosy z prvního stupně byla za podmínek experimentu (vstupní koncentrace glukosy kolem 120 g/l , D_m kolem $3,0 \text{ h}^{-1}$) 13 g/l . Nízká koncentrace uvolněných kvasinek (kolem $1,5 \text{ g/l}$) a jejich malá fermentační aktivita nezajistila prokvašení veškeré glukosy (výstupní koncentrace glukosy byla 6 g/l). Maximální koncentrace ethanolu v médiu z druhého reaktoru byla 53 g/l , přičemž výtěžnostní koeficient v prvním reaktoru činil $0,91$ teoretické hodnoty. U prvního reaktoru bylo dosaženo dobré stability procesu a produktivita se pohybovala kolem $150 \text{ g ethanolu/l média} \cdot \text{h}$, což odpovídá hodnotě 30 g ethanolu za 1 hodinu na litr účinného objemu kolony. Připojením druhého stupně se zvýšil obsah alkoholu na výstupu jen o 3 g/l média . Celková zředovací rychlost a produktivita kalkulovaná na oba fermentory byla nízká, což je způsobeno relativně velkým objemem druhé kolony. Z výsledků experimentů první série vyplývá, že aktivita uvolněných kvasinek je relativně nízká a proto jejich využití ve druhém fermentoru by bylo neefektivní. Celková produktivita systému vztahená na objem média je pouze $5,3 \text{ g/l} \cdot \text{h}$ (ve srovnání s produktivitou v prvním stupni, kde se pohybovala kolem $150 \text{ g/l} \cdot \text{h}$). K optimálnímu řešení by bylo možno se přiblížit buď snížením vstupní koncentrace glukosy nebo použitím druhé kolony naplněné rovněž peletami s imobilizovanými buňkami nebo větší kolonou zcela naplněnou biokatalyzátorem.

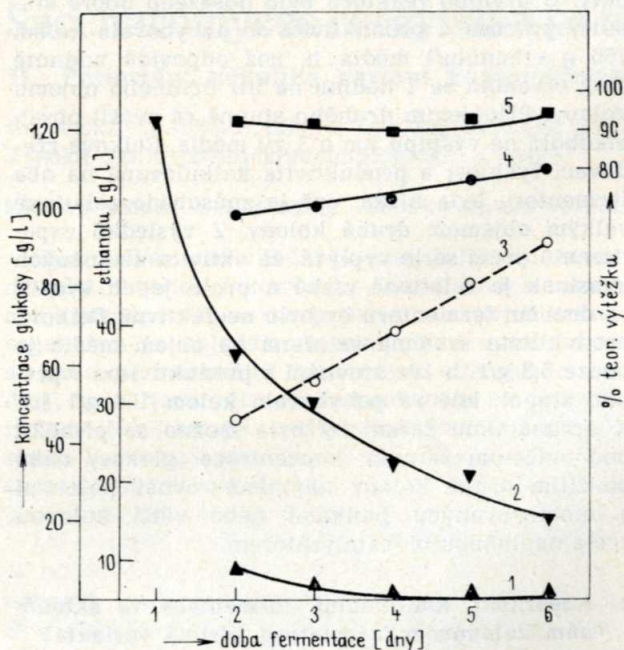
2. Anaerobní kontinuální fermentace ve skloněném kolonovém fermentoru (druhá varianta)

Skloněné kolony mají proti běžně používaným vertikálním kolonám hlavní přednost v tom, že zmenšují tvorbu kanálů ve vrstvě biokatalyzátoru, zkracují dráhu bublin a snižují poškození pelet otěrem [14]. Kromě toho je významné i snížení hydrostatického tlaku sloupce média a pelet, což

přispívá ke zvýšení stability pelet u dna kolony (především u větších kolon). Bublínky oxidu uhličitého se rychle soustřeďují u horní stěny kolony a vycházejí podél ní v úzkém kanálu. Fermentor pracoval při výtěžnostním koeficientu kolem 92 % teoretické hodnoty. Výstupní koncentrace ethanolu byla 55 g/l, výstupní koncentrace glukosy se pohybovala kolem 3,5 g/l. Tyto hodnoty lze považovat za hodnoty stacionární (ustálený stav kontinuální kultivace). Průměrná produktivita biosyntézy ethanolu byla 73 g ethanolu na 1 litr média za 1 hodinu, tj. 14,8 g/h.l účinného objemu kolony. Šikmá poloha fermentoru vedla ke snížení „pulsace“ fermentační kapaliny způsobené shlukováním bublinek oxidu uhličitého kolem pelet a jejich rychlým vynášením ke hladině, kde dochází k odplynění. Nižší hodnoty produktivity ve srovnání s prvním fermentorem předcházející varianty byly způsobeny nižším průtokem média. Výhody takto uspořádané kolony se projeví hlavně při dlouhodobých experimentech. Pro průmyslová měřítka nelze uvažovat o aplikaci šikmých kolon, ale spíše o vhodném vnitřním uspořádání kolon.

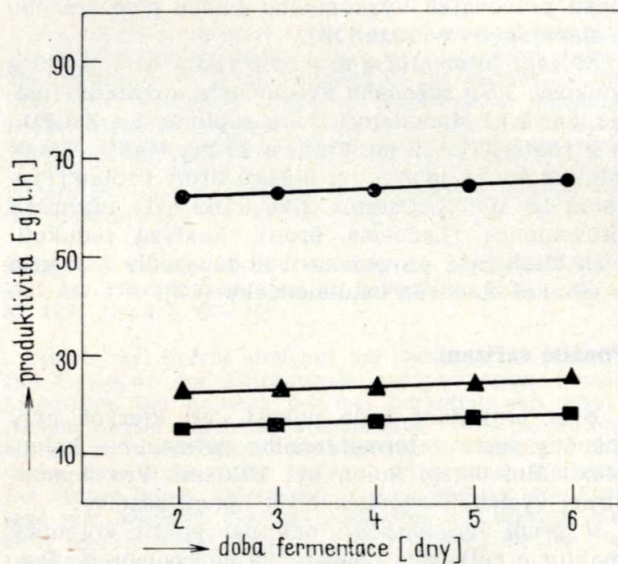
3. Anaerobní kontinuální fermentace v kaskádě skloněných kolon (třetí varianta)

Tato experimentální série je pokračováním druhé varianty a jejím cílem bylo hledání optimální laboratorní sestavy. Kaskáda byla tvořena dvěma skloněnými kolonami o nestejném objemu (objem prvního reaktoru byl menší). Vstupní koncentrace glukosy byla opět 120 g/l a stacionární koncentrace na výstupu z prvního reaktoru činila 40 g/l.



Obr. 1. Průběh fermentace v kaskádě dvou skloněných kolon naplněných biokatalyzátorem (varianta 3) 1 — aktuální koncentrace glukosy na výstupu z 2. členu, 2 — aktuální koncentrace glukosy na výstupu z 1. členu, 3 — aktuální koncentrace ethanolu na výstupu z 1. členu, 4 — aktuální koncentrace ethanolu na výstupu z 2. členu, 5 — výtěžnost ethanolu

Toto množství bylo úplně prokvašeno ve druhém fermentoru. Na výstupu z druhé kolony se koncentrace ethanolu zvýšila o 18 g/l. Maximální produktivita ethanolu dosáhla v prvním stupni hodnoty 220 g/h.l média, ve druhém fermentoru již jen 29 g/h.l fermentačního prostoru. Koncentrace ethanolu na výstupu byla 57 g/l. Celková produktivita je 60 g/h.l média, tj. 16 g/h.l účinného fermentačního prostoru. Počáteční fázi kontinuální fermentace znázorňují obr. 1 a 2. Na nich je vidět,



Obr. 2. Závislost produktivity systému (varianta 3) na době fermentace

- — produktivita vztažená na účinný objem obou reaktorů
- — produktivita vztažená na objem média v obou reaktorech
- ▲ — produktivita vztažená na objem gelu v obou reaktorech

že dynamika systému je nejvýraznější v prvním reaktoru, kde se využije 67 % glukosy. Ustálování zde trvá šest a více dní. Druhý reaktor stabilizuje proces. Na obr. 2 je znázorněn průběh produktivity celého systému v závislosti na době fermentace.

4. Anaerobní kontinuální fermentace v kaskádě skloněných kolon (čtvrtá varianta)

V této řadě experimentů, jak bylo již uvedeno, bylo pořadí reaktorů obráceno. Zředovací rychlost se při zachování stejného průtoku v prvním reaktoru snížila. Vzhledem k tomu, že velikost celkové produktivity určuje hlavně první reaktor, jsou výsledky horší než v předcházejícím případě. V obou reaktorech byly hodnoty výtěžnostních koeficientů 98 %, resp. 93 % teoretické hodnoty. Produktivita v prvním reaktoru byla 88 g/h.l média a celková produktivita 44 g/h.l média. Sumární výsledky všech čtyř popsaných variant jsou uvedeny v tab. 1.

Výsledky vybraných experimentů potvrdily, že je možno i při použití běžné provozní kultury kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* dosáhnout vysokých hodnot produktivity fermentačního systému. Literární prameny však často uvádějí čísla, u kterých není jasné, na jaký základ jsou vztažena.

Tab. 1. Základní charakteristika a výsledky jednotlivých pokusů (I.—IV. varianta)

Varianta	N	V _{BR} (ml)	% V _{BR}	D _m (h ⁻¹)	S _i (g/l)	E (g/l)	S (g/l)	Y _{E/S}	p _m (g/l.h)	p _f (g/l.h)	Charakter sestavy
I	2	1: 200 2: 1000	80 volné buněk	3,0 0,12	120,20 13,0	49,9 53,0	13,0 6,0	0,46 0,46	149,85 0,372	29,97 0,372	Vertikální reaktor H/D = 2,45 + dokvašovací reaktor
II	1	150	80	1,33	120,20	54,86	3,5	0,47	73,0	14,8	skloněný reaktor H/D = 4,3
III	2	1: 150 2: 240	83 67	4,4 1,38	122,40 40,20	39,0 56,70	40,20 2,54	0,47 0,47	171,60 24,43 (59,54)	28,86 8,06 (16,05)	kaskáda skloněných kolon 1: H/D = 4,3 2: H/D = 6,9
IV	2	1: 240 2: 150	75 50	1,67 1,37	119,60 14,26	52,88 58,96	14,26 1,59	0,50 0,48	88,31 8,03 (43,69)	21,95 4,01 (15,15)	kaskáda skloněných kolon 1: H/D = 6,9 2: H/D = 4,3

N počet stupňů (kolon)
V_{BR} účinný objem kolony (bioreaktoru)
% V_{BR} objem pelet v % V_{BR}
D_m zředovací rychlost vztažená na objem média v koloně (průtok média/objem média)
d_f zředovací rychlost vztažená na účinný objem kolony
S_i vstupní koncentrace glukosy
E výstupní koncentrace ethanolu z kolony (1 a 2)
S výstupní koncentrace glukosy z kolony (1 a 2)

Y_{E/S} výtěžnostní koeficient pro ethanol ($Y_{E/S} = \frac{E}{S_i - S}$)

p_m produktivita pro ethanol vztažená na objem média v koloně. Pro p_{m1} platí $p_{m1} = D_{m1} \cdot E_1$,
 $p_{m2} = D_{m2} \cdot (E_2 - E_1)$

p_f produktivita pro ethanol vztažená na účinný objem kolony, přičemž $p_{f1} = D_{f1} \cdot E_1$ a
 $p_{f2} = D_{f2} \cdot (E_2 - E_1)$

1: první kolona
2: druhá kolona

Poznámka: Produktivity p_m, p_f uvedené v závorkách u III. a IV. varianty představují produktivitu celého systému. Produktivita uvedená u druhého stupně se týká produkce ethanolu pouze v tomto stupni.

Tento problém ve vyjádření produktivity (základem pro výpočet může být buď celkový fermentační objem, nebo objem biokatalyzátoru, nebo objem fermentačního média) se vyskytuje vždy při aplikaci heterogenních biokatalyzátorů. Údaje je možno navzájem přepočíst, pokud je známo množství biokatalyzátoru v reaktoru. Získané hodnoty produktivity kolem 200 g ethanolu na litr média za hodinu jsou považovány za mimořádně dobré. Uvědomme si, že produktivita běžně používaného systému s recirkulací kvasinek se pohybuje pod hodnotou 10 g/l.h. Za těmito čísly je však třeba vidět i další velmi důležitou stránku procesu. Maximálních hodnot produktivity je dosaženo při vysokých průtocích média a při takových koncentracích sacharidu, kdy vznikající ethanol neinhubuje významně biosyntézu. Tato koncentrace ethanolu bývá mezi 5 až 8 % hm. Při vyšších koncentracích se již významně uplatňuje vliv a vlastnosti používaného mikroorganismu. Pro praktickou aplikaci je třeba hledat především takové podmínky, při kterých by kromě produktivity byla vysoká i koncentrace ethanolu (úspory energie při destilaci).

ZÁVĚR

Dvoustupňový kolonový systém s náplní kvasi-

nek *Saccharomyces cerevisiae* SL 100 imobilizovaných do gelu alginátu vápenatého je schopen dosahovat vysoké produktivity při produkci ethanolu. Využití kvasinek uvolněných z pelet gelu při dokvašování se nejeví výhodné, protože jak jejich koncentrace, tak především jejich aktivita je nízká. Chemické a biochemické rozdíly imobilizovaných a uvolněných buněk budou popsány v další části našeho příspěvku. Druhý stupeň sestavy s náplní biokatalyzátoru je výhodný pro dokvašení zbytkového cukru a pro stabilizaci systému. Jeho velikost závisí na kinetice biosyntézy ethanolu a na množství biokatalyzátoru v prvním členu. Vzhledem k tomu, že dokvašování probíhá pomaleji než hlavní fermentace, je výhodné, aby objem druhého stupně byl větší. Pro provozní aplikaci je důležité se orientovat na vysokoprodukční kmeny kvasinek a na reaktory vhodné konstrukce.

Literatura

- [1] IVANOVA V., RYCHTERA M., BASAŘOVÁ G.: Kvas. prům., **35**, 1989, s. 41.
- [2] REIFF F. et al.: Die Hefen. Band II: Technologie der Hefen. Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1962, s. 464.
- [3] SIVA RAMAN H. et al.: Biotechnol. Lett., **4**, 1982, s. 359.
- [4] KRUG T. A., DAUGILIS A. J.: Biotechnol. Lett., **5**, 1983, s. 159.

- [5] WADA M., KATO J., CHIBATA I.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **11**, 1981, s. 67.
- [6] GÓDIA F., CASAS C., SOLÁ C.: J. Chem. Technol. Biotechnol., **35** B, 1985, s. 139.
- [7] KUU W. Y., POLACK J. A.: Biotechnol. Bioeng., **25**, 1983, s. 1995.
- [8] KLEIN J., KRESSDORF B.: Biotechnol. Lett., **5**, 1983, s. 497.
- [9] IVANOVA V.: Studium vlastností imobilizovaných kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* s ohledem na produkci ethanolu. [Kandidátská disertační práce], Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 1986.
- [10] MELZOCH K.: Využití imobilizovaných biologických systémů v lihovarství. [Kandidátská disertační práce], Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 1988.
- [11] KIERSTAN M., BUCKE C.: Biotechnol. Bioeng., **19**, 1977, s. 387.
- [12] PARDONOVÁ B. et al.: Brauwissenschaft, **35**, 1982, s. 254.
- [13] GERHARDT P. Ed.: Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1981.
- [14] SAMEJIMA H. et al.: Enzyme Eng., **7**, 1984, s. 434.
- [15] NAVARRO A., et al.: Biotechnol. Lett., **6**, 1984, s. 465.
- [16] LEE T. H., AHN J. C., RYU D. D. Y.: Enzyme Microb. Technol., **5**, 1983, s. 41.

Lektoroval Ing. M. Kahler, CSc.

Ivanova V. - Rychtera M. - Basařová G.: Využití imobilizovaných buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ke kontinuální výrobě ethanolu. II. Porovnání několika variant kontinuálních metod. Kvas. prům., **37**, 1991, č. 4, s. 100—104.

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* SL 100 byly imobilizovány v gelu alginátu vápenatého. Kontinuální lihové kvašení bylo provedeno v různých typech kolon a při zředovacích rychlostech v rozmezích od 1,0 do 4,4 h⁻¹. Nejlepší výsledky byly získány ve fermentorech ve skloněné poloze a v kaskádě reaktorů. Maximální produktivita byla kolem 172 g ethanolu na 1 litr média za hodinu.

Иванова, В. - Рихтера, М. - Басаржова, Г.: Использование иммобилизованных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для непрерывного производства спирта II. Сравнение нескольких вариантов непрерывных методов культивирования. Квас. прум., **37**, 1991, № 4, стр. 100—104.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* SL 100 были иммобилизованы в кальций альгинатовом геле. Непрерывное брожение было проведено в нескольких типах колонных биореакторов при скорости разбавления от 1,0 до 4,4 час⁻¹. Самые лучшие результаты появились при использовании каскады реакторов и в реакторах в наклонном положении. Максимальная продуктивность была получена около 172 г этанола на литр среды в час.

Ivanova, V. - Rychtera, M. - Basařová, G.: The Application of Immobilized Cells *Saccharomyces cerevisiae* for Continuous Ethanol Production. II. Comparison of Several Alternatives of the Continuous Method. Kvas. prům., **37**, 1991, No. 4, pp 100—104.

Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* SL 100 were immobilized in calcium alginate gel. Continuous alcohol fermentation was carried out in different types of columns at dilution rates ranging from 1.0 to 4.4 h⁻¹. The best results were obtained in fermentores situated in a leaning position and in cascade of bioreactors. The maximum productivity was about 172 g ethanol per litre of medium and hour.

Ivanova, V. - Rychtera, M. - Basařová, G.: Verwendung der immobilisierten Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* für die kontinuierliche Äthanol-Produktion. II. Der Vergleich einiger Varianten der kontinuierlichen Methoden. Kvas. prům., **37**, 1991, Nr. 4, S. 100—104.

Die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* SL 100 wurden in Kalziumalginat-Gel immobilisiert. Die kontinuierliche Alkoholferrmentation wurde in verschiedenen Kolonnen-typen bei Verdünnungsraten von 1,0 bis 4,4 h⁻¹ durchgeführt. Die besten Ergebnisse wurden bei der Benützung der Fermentoren in Schräglage und in der Kaskade von Bioreaktoren erzielt. Die maximale erreichte Produktivität betrug etwa 172 g Äthanol pro Liter des Mediums und Stunde.