

Vykonajte experimentálne merania v laboratórnom zariadení s objemom 6 litrov s cieľom získať časové závislosti tvorby etanolu a rastu biomasy pri prietoku vzduchu $1,0 \text{ NL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $3,0 \text{ NL}\cdot\text{min}^{-1}$ počas aeróbnej kultivácie. Teplota kultivačného média $28 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5,75 a frekvencia otáčania miešadla 100 min^{-1} .

V nasledujúcej kapitole sú opísané experimenty, ktoré sa uskutočnili v laboratórnom bioreaktore Esedra Plus 6.0, talianskej firmy SolarisBiotechnology.

Experimenty sa robili v dvoch režimoch. V aeróbnom režime sa prednostne namnožili kvasinky, v anaeróbnom sa vyrábala etanol. Cieľom bolo porovnanie vplyvu prietoku vzduchu, ktorého súčasťou je kyslík, v aeróbnom režime na celkový priebeh rastu kvasiniek a produkciu etanolu počas aeróbného a anaeróbného režimu.

Pre posudzovanie a vyhodnotenie týchto meraní sa použili postupy a prístroje používané vo vinárstve.

5. MERANIE

5.1 Príprava

Prípraví sa živný roztok, ktorý obsahuje stolný cukor, živnú soľ a destilovanú vodu.

Živná soľ pre kvasinky s optimálnym pomerom živín

POPIS VÝROBKU

VITAMON COMBI je špeciálna živná soľ pozostávajúca z Vitamínu B1 a Diamoniumfosfátu, v optimálnom pomere. Použitie je povolené súčasnými platnými predpismi. Čistotou a kvalitou zodpovedá kritériám vínného zákona SRN a interným normám firmy ERBSLÖH Geisenheim. Kvalita je certifikovaná podľa ISO 9001.

CIEĽ POUŽITIA

Podpora optimálnej výživy kvasiniek a tým lepšieho prekvášania.

PRODUKT A ÚČINOK

VITAMON COMBI je produkt, ktorý obsahuje nevyhnutné živiny pre kvasinky, v optimálnom pomere. VITAMON COMBI je účelné použiť pri výrobe vysokoakostných vín. Jeho použitím sa dosiahne optimálne prekvasenie suroviny, bez rušivých vplyvov. Hlavne v prípadoch keď je hrozno napadnuté plesňou Botrytis cinerea, obsahuje nedostatok Vitamínu B1. Použitím preparátu sa tiež znížia potrebné dávky oxidu siričitého, pretože optimálne živé kvasinky viažu podstatne menej SO_2 ako kvasinky s deficitom vitamínu B1.

POUŽITIE

VITAMON COMBI sa dávkuje v množstve 30 g / hl. To je doporučená a aj maximálna dávka, ktorú povoľuje vínnny zákon EÚ – VO 822/87.

SKLADOVANIE

VITAMON COMBI skladovať v suchu, na tmavom a chladnom mieste bez pachov. Otvorené balenia po použití znovu tesne uzavrieť a čo najskôr spotrebovať.

5.2 Opis laboratórneho zariadenia

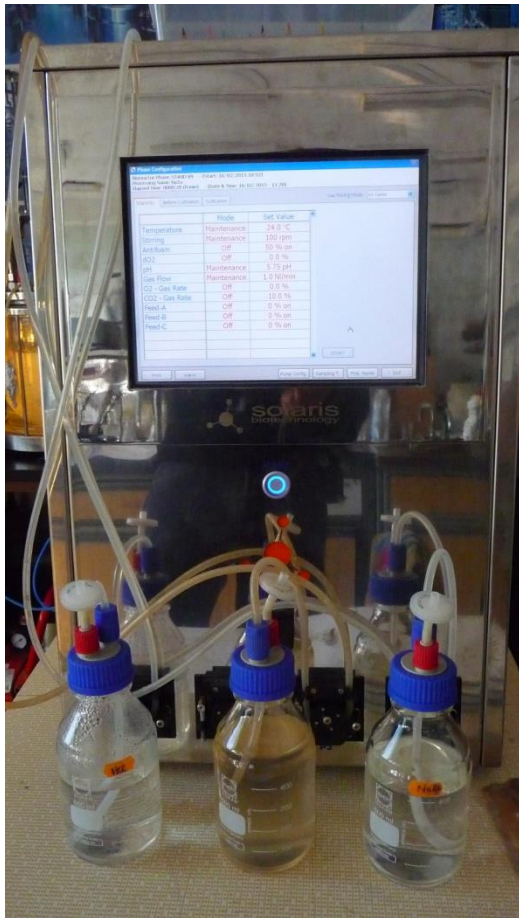
BIOREAKTOR

Bioreaktor má objem 6 litrov, pre naše meranie však stačilo približne 3,2 živného roztoku.

Bioreaktor pozostáva z týchto častí:

- Miešadlo
- Duplikátor
- Elektrické špirály – úlohou je ohrev vody, naopak ak ju treba ochladiť, pripúšťa sa voda z vodovodu
- Kondenzátor pár – slúži pre únik plynov a pár, má odvodušňovacie hrdlo, na ktoré je napojený mikrobiálny filter, vďaka ktorému uniká nepotrebný vzduch a zároveň zabezpečí, aby sa dnu nedostali nežiaduce mikroorganizmy.
- Prívod vzduchu – je vyrobený ako rúrka s dierami, prostredníctvom neho sa privádza kyslík do zariadenia.
- Sonda na meranie zmeny koncentrácie kyslíka rozpusteného vo vode (dO_2) – meria sa koncentrácia rozpusteného kyslíka
- Sonda na zmenu koncentrácie oxidu uhličitého (dCO_2) – počas aeróbného režimu je koncentrácia CO_2 malá, v anaeróbnom režime naopak, kvasinky CO_2 produkujú
- Sonda na meranie pH
- Sonda na merania redoxu – redukčno – oxidačné číslo
- Teplomer
- Otvory pre odobratie vzorky
- Ihla pre prívod kyseliny chlorovodíkovej a vody
- Ihla pre prívod hydroxidu sodného a vody

- Ihla pre prívod živného roztoku
- Fľaša pre roztok HCl s perystaltickým čerpadlom
- Fľaša pre roztok hydroxidu NaOH
- Fľaša pre roztok živného roztoku
- Riadiaca jednotka – ovláda reguláciu pH, dCO₂, dO₂, redox, teplotu, otáčky miešadla a následne zaznamenáva merané dáta



Obr.5 Pohľad na riadiacu jednotku s roztokmi HCl, NaOH v destilovanej vode a živnou pôdou

5.3 Opis experimentu

- 1) Pripraví sa živný roztok (recept vo vyhodnotení)
- 2) Naleje sa do bioreaktora
- 3) Spraví sa kalibrácia sond
- 4) Pripraví sa roztoky HCl s vodou, NaOH s vodou a živný roztok, ktorý sa neskôr pridáva do bioreaktora.

- 5) Sterilizácia – bioreaktor, roztoky aj so živným roztokom, ktoré sú vo fľašiach pri teplote 121 °C po dobu 20 minút sa sterilizujú s cieľom usmrtiť mikroorganizmy, ktoré sa bežne nachádzajú v prostredí okolo nás a nie sú žiaduce pre daný proces. Mohli by totiž prednostne začať využívať živný roztok skôr ako kultivované kmene mikroorganizmov a znehodnotiť tak celý bioproces, resp. vzádzku.



Obr. 6 Umiestnenie bioreaktora v sterilizátore

- 6) Po sterilizácii sa všetko vyberie a nechá sa vychladiť na teplotu okolia.
- 7) Potom sa pripoja všetky káble na meracie sondy, elektromotor a vyhrievacie telesá, napojí sa prívod vzduchu, chladiacej vody do riadiacej jednotky.
- 8) Pripoja sa jednotlivé fľaše s roztokmi prostredníctvom hadíc s ihlami.
- 9) Režim bioreaktora „pred kultiváciou“ – nastaví sa otáčky miešadla, ak treba prietok vzduchu, teplota a pH. Dosiahnutie nastavených parametrov zabezpečí riadiaca jednotka. Po nastavení požadovaných parametrov je bioreaktor pripravený na kultiváciu.
- 10) Inokulácia – znamená prípravu kultivačného roztoku s mikroorganizmami a ich zavedenie za sterilných podmienok do bioreaktora.



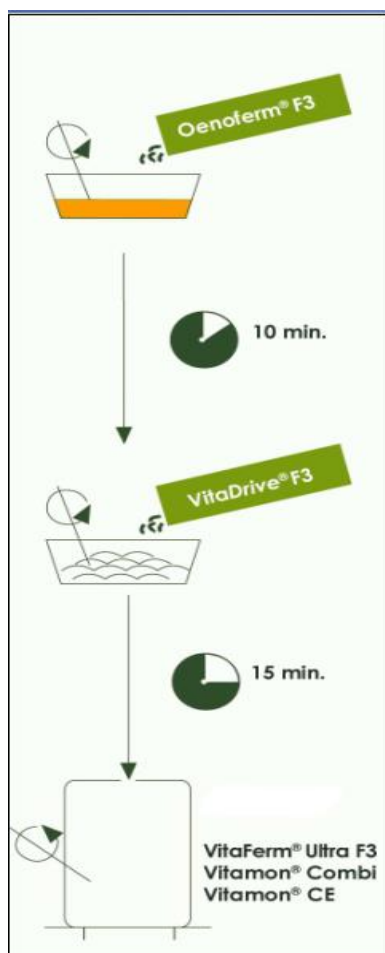
Obr. 7 Kvasinky a roztok na ich prípravu (roztok so živnou soľou a cukrom)



Obr.8 Mikrogranulát – nejaký čas sa musí rozpúšťať, aby sa uvoľnili mikroorganizmy

INOKULÁCIA

Na inokuláciu použijeme kvasinky **OenofermStructure**. Tie prednostne zvýrazňujú tie látky, ktoré spôsobujú vo víne vôňu čerešní, jahôd a orieškov v harmónii s tanínmi.



Aróma – Čerešne, jahody a vôňa orieška v harmónii s tanínmi

Odporúčanie – Pre silné, intenzívne a tanínové vína. Vína s potenciálom na zrenie v sudoch a precuvée.

Odporúčané odrody – Dornfelder, Syrah, Cabernety, Merlot, Svätovavrinské, Frankovka

Kmeň – Cerevisiae

Dávkovanie v g/hl – 20 – 30

Začiatok kvasenia v h – 10 – 15

Priebeh kvasenia – nepretržité

Teplota kvasenia – 18 – 28 °C

Spotreba dusíka – priemerná

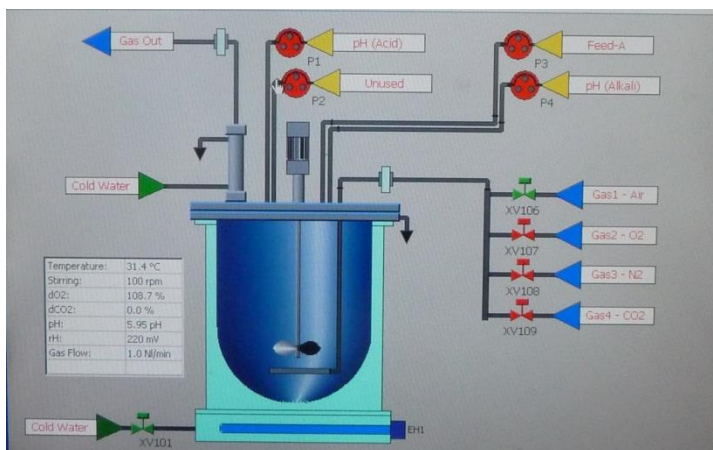
Odporúčaná výživa – VitaDrive® F3, VitaFerm Ultra® F3, (my sme použili VitamonCombi)

- 11) Prebieha aeróbný proces – množia sa najmä mikroorganizmy, etanol v menšej miere.
- 12) Na displeji sa zaznamenáva redox, dO_2 , dCO_2 a v 24-hodinových intervaloch sa odoberá vzorka z bioreaktora za sterilných podmienok. Hustomerom sa z nej stanoví koncentrácia cukru. Pomocou odstredivky ($n=400$ ot/min) sa stanoví objem mikroorganizmov, ktoré vznikli kultiváciou v bioreaktore. Potom sa vzorka vráti naspäť. Meria sa počas dvoch dní, teda dokopy 3-krát.



Obr. 9 Pohľad na bioreaktor počas prevádzky s prívodom kyslíka – hadica s mikrofiltrom je umiestnená tak, aby vzduch mohol odchádzať priamo do ovzdušia (nie je použitý kvapalinový uzáver, injekčná striekačka slúži na odber vzorky z bioreaktora pre meranie hustoty roztoku pomocou muštomeru a stanovenie koncentrácie mikroorganizmov v odstredivke

- 13) Anaeróbný režim začne prebiehať po 48 hodinách. Vypne sa prívod kyslíka, dodá sa živný roztok, postup odoberania vzorky sa opakuje – každých 24 hodín po dobu 7 dní.
- 14) Na konci sa stanoví výťažnosť etanolu a množstva mikroorganizmov po celom experimente.



Obr. 10 Schéma zapojenia bioreaktora

6. VYHODNOTENIE

ÚLOHA:

FERMENTÁCIA ETANOLU S VYUŽITÍM AERÓBNEHO A ANAERÓBNEHO REŽIMU PREVÁDZKY BIOREAKTORA

Experiment je zameraný sledovanie vplyvu prietoku vzduchu (kyslíka) na rast biomasy a na tvorbu etanolu pri aeróbnej a anaeróbnej kultivácii.

Testovaným parametrom je prietok vzduchu (kyslíka).

Kultivácia biomasy prebieha aeróbne:

- pred sterilizáciou sa stanoví cukornatosť pomocou normalizovaného hustomeru
- vzorka sa odoberá pravidelne v 24 hodinových intervaloch počas 48 hodín, spracováva sa na odstredivke pre určenie PMV
- po 24 a 48 sa odoberie vzorka pre stanovenie zmeny cukornatosti pomocou normalizovaného hustomeru

Produkcía etanolu prebieha anaeróbne:

- pridá sa 250 ml čerstvého, sterilizovaného roztoku, obsahujúceho cukor a doplnkové živiny
- zastaví sa prívod vzduchu
- experiment pokračuje 120 hodín
- v 24hodinových intervaloch sa odoberá vzorka pre stanovenie cukornatosti a spracováva sa na odstredivke pre určenie PMV
- po skončení sa spraví bilancia rastu biomasy z celého objemu bioreaktora
- stanoví sa objem etanolu metódou zmeny hustoty °NM (normalizovaný muštomer)

Vyhodnocovanie experimentu je podľa metód používajúcich sa vo vinárstve

Experiment sa vyhodnotí prostredníctvom výťažkových faktorov a kinetiky sledovaných veličín pri aeróbných a anaeróbných podmienkach.



Obr. 11 Stanovenie cukornatosti (koncentrácia skvasiteľných cukrov vo vode, zanedbávame koncentráciu živnej soli)

Výt'azkové faktory pre aeróbnny a anaeróbnny režim:

$$\text{výt'azkový koeficient biomasy zo substrátu } Y_{xs} = -\frac{dx}{ds}$$

$$\text{výt'azkový koeficient produktu zo substrátu } Y_{ps} = -\frac{dp}{ds}$$

$$\text{výt'azkový koeficient produktu z biomasy } Y_{px} = \frac{dp}{dx}$$

Kinetika sledovaných veličín pre aeróbnny a anaeróbnny režim:

$$\text{priemerná rýchlosť rastu biomasy } r_x = \frac{dx}{dt}$$

$$\text{priemerná rýchlosť vytvárania produktu (etanolu) } r_p = \frac{dp}{dt}$$

6.1 NÁZOV EXPERIMENTU: Testovanie vplyvu prietoku vzduchu 1,0 NI/min

DÁTUM: 10.3.2015

HODNOTA TESTOVANÉHO PARAMETRA: 1,0 NI/min

SUBSTRÁT

kvapalina: destilovaná voda

objem kvapaliny: 3 litre

hmotnosť cukru: sacharóza 50g/l (150g/3l)

doplňkové živiny: VitamonCombi 50g/100 litrov (1,5g/3l)

hustota roztoku pred sterilizáciou:

1.016 (25,5°C) → 1.018 (15°C) → 5,0 °NM

REGULÁCIA pH

roztok destilovaná voda : HCl → 400 ml : 5 ml

roztok destilovaná voda : NaOH → 400 ml : 15g

Tolerancia regulátora je pH 5,75 ±0,25.

ŽIVNÝ ROZTOK

kvapalina: destilovaná voda

objem kvapaliny: 200 ml

hmotnosť cukru: sacharóza 500 g/l (100 g / 200 ml)

doplňkové živiny: VitamonCombi 50g/100 litrov (0,1g / 200 ml)

pH - bez úpravy

Dávkuje sa celý objem fľaše.

STERILIZÁCIA

teplota: 121°C

čas: 20 minút

STAND BY

teplota: 28 °C

otáčky miešadla: 100 min⁻¹

prietok vzduchu: 1,0 NI / min

pH 5,75

kalibrácia dO₂ sondy na 100% po ustálení teploty

t [hod:min]	dCO ₂ [%]	rH [mV]	poznámka
01:05	-	-	sonda dO ₂ →100% (drift -30)



Obr. 12 Priebeh pH, dO₂ v režime STAND BY (sonda dCO₂ bola nefunkčná)

INOKULUM

kvasinky: OenofermStructure

- kmeň: *Cerevisiae*
- dávkovanie: 20 – 30 g/hl
- začiatok kvasenia: 10 – 15 h
- priebeh kvasenia: nepretržité
- teplota kvasenia 18 – 28 °C
- spotreba dusíka: 2 (zo stupnice 1 – 4)
- odporúčaná výživa: VitaDrive F3 alebo VitaFermUltra F3
- tolerancia na alkohol: do 15%

Substrát

kvapalina: destilovaná voda

objem kvapaliny: 100 ml

cukor: 5g / 100 ml

sterilizácia

teplota: 37 - 42 °C

OenofermStructure

hmotnosť: 0,6 g

doba aktivácie: 10 minút

VitamonCombi

kvapalina: destilovaná voda

objem kvapaliny: 100 ml

hmotnosť: 0,6 g

sterilizácia

teplota: 37 - 42 °C

pridať do roztoku po 10 minútach a nechať pôsobiť ďalších 15 minút

Inokulum

upraviť teplotu na 28°C + 7°C

naliať do reaktora

CULTIVATION

Aeróbna kultivácia:

teplota: 28°C

otáčky miešadla: 100 min⁻¹

prietok vzduchu: 1,0 NI /min

pH: 5,75 ±0,25

celkový čas: 48:18

Anaeróbna kultivácia:

doplňkové živiny vo forme roztoku: celý objem, 250 ml.

teplota: 28°C

otáčky miešadla: 100 min⁻¹

prietok vzduchu: bez vzduchu

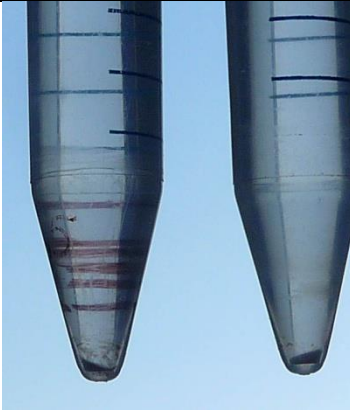
pH: 5,75 ±0,25

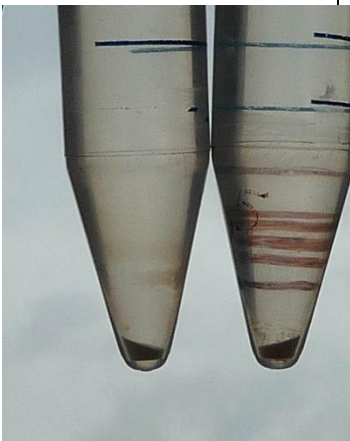
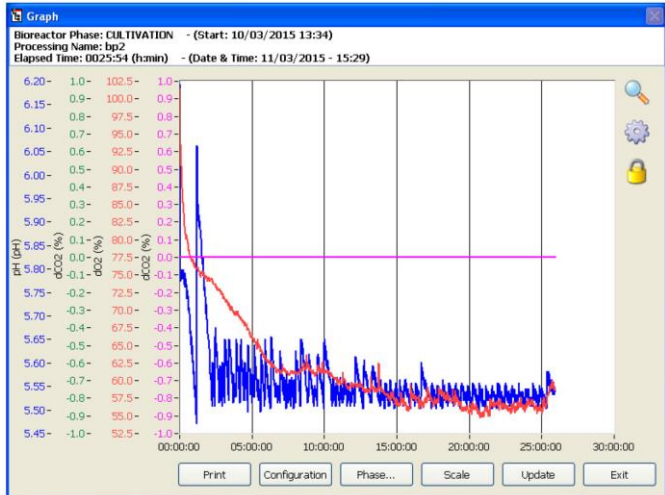
celkový čas: 48:18 – 169:00

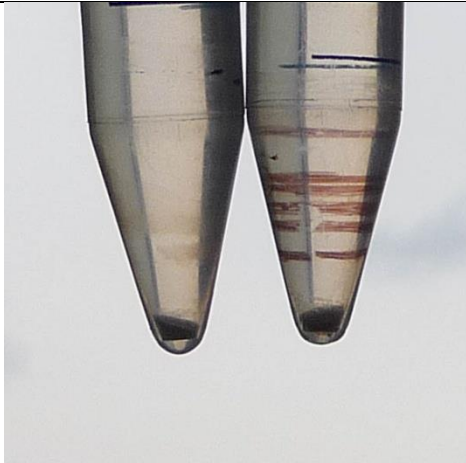
EXPERIMENT

meria sa:

- dO₂
- dCO₂
- pH
- Redox
- spotreba cukru meraná hustomerom
- rast biomasy meraný objemom usadeniny po odstredení

t [hod:min]	dCO ₂ [%]	rH [mV]	poznámka
AERÓBNY PROCES			
00:00	2,7	226	hustomer: 1.0145 (28°C) → 1.017 (15°C) → 4,5°NM
00:03			Inokulum
00:10	3,3	211	
 <p>priemer skúmavky 16 mm r₁ = 1,84 r₂ = 1,72 v = 0,73 $V = \frac{1}{3}\pi v(r_1r_1 + r_1r_2 + r_2r_2) = 7,39 \text{ mm}^3$ <u>koncentrácia z objemu 10ml:</u> x = 0,000739 ml/ml</p>			
00:35	3,3	225	
01:08	3,2	235	
02:14	3,3	236	
03:17	3,3	236	
18:51	3,3	225	

21:33	3,2	224	
25:14	3,2	223	hustomer: 1.0145 (28°C) → 1.017 (15°C) → 4,5°NM
		<p>priemer skúmavky 16 mm</p> <p>$r1 = 2,17$</p> <p>$r2 = 1,72$</p> <p>$v = 1,39$</p> <p>$V = \frac{1}{3}\pi v(r1r1 + r1r2 + r2r2) = 16,71 \text{ mm}^3$</p> <p><u>koncentrácia z objemu 10ml:</u></p> <p>$x = 0,00167 \text{ ml/ml}$</p>	
			
27:55	3,1	220	
42:33	2,9	171	
45:04	2,9	163	
46:00	2,9	161	
48:18	2,9	159	<p>odobrala sa vzorka 250 ml pre stanovenie hustoty, ale vzorka sa už nevrátila späť</p> <p>hustomer: 1.013 (30°C) → 1.016 (15°C) → 4,3°NM</p>



priemer skúmavky 16 mm

$$r1 = 2,15$$

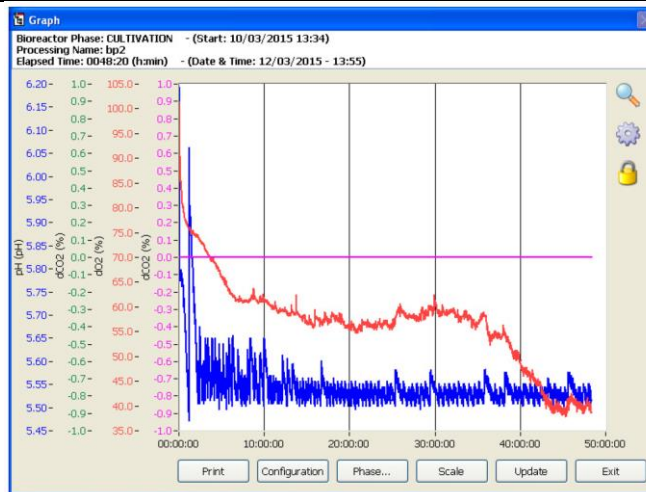
$$r2 = 1,725$$

$$v = 1,8$$

$$V = \frac{1}{3}\pi v(r1r1 + r1r2 + r2r2) = 21,03 \text{ mm}^3$$

koncentrácia z objemu 10ml:

$$x = 0,00213 \text{ ml/ml}$$



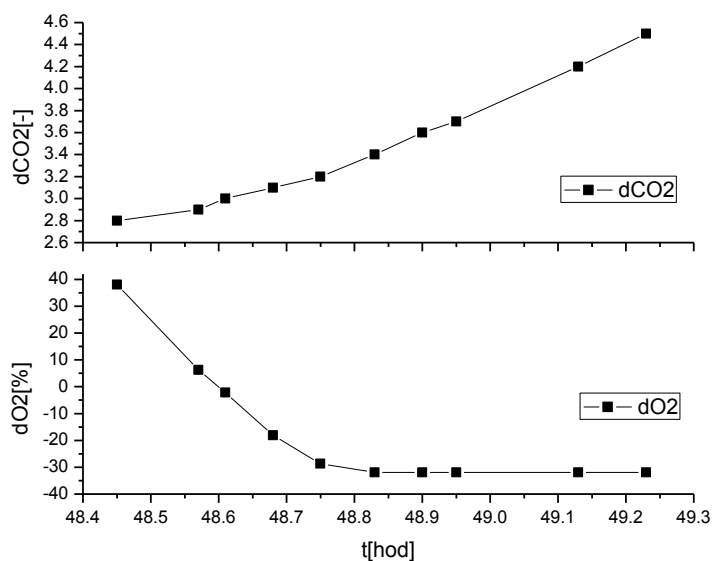
ANAERÓBNY PROCES

48:27

vypnuté O₂





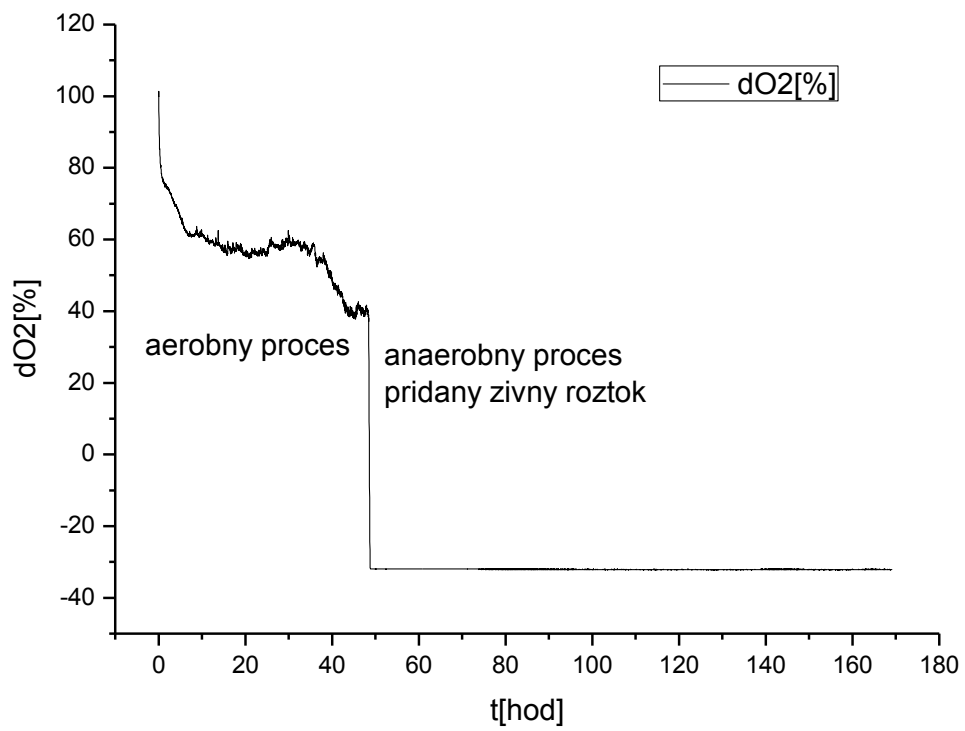
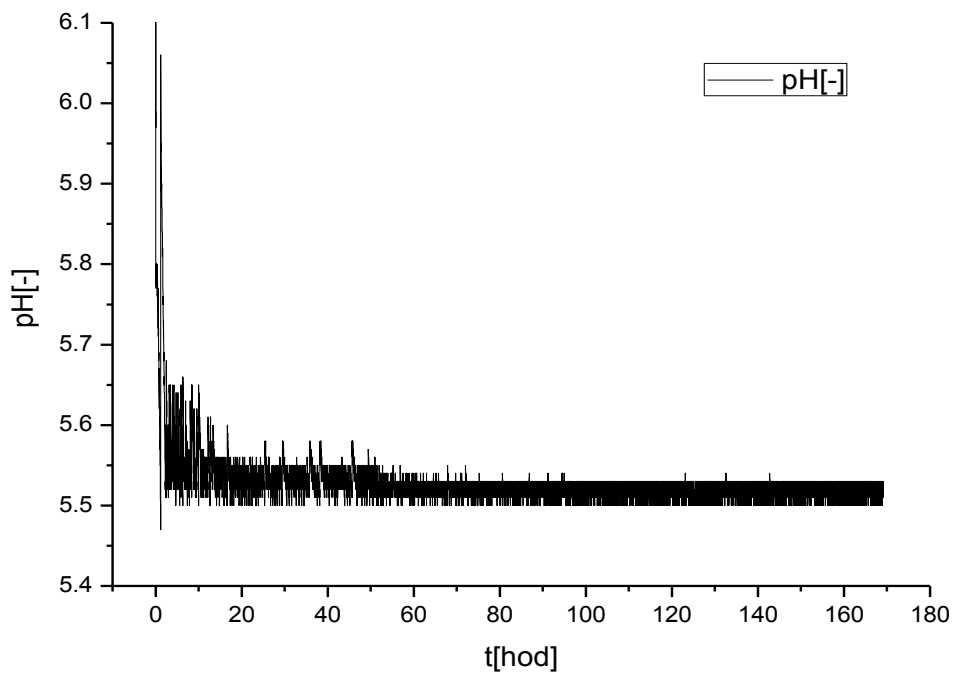
Detail priebehu vyčerpania O₂ pri jeho vypnutí, krivka spotreby O₂ po vypnutí prívodu vzduchu.

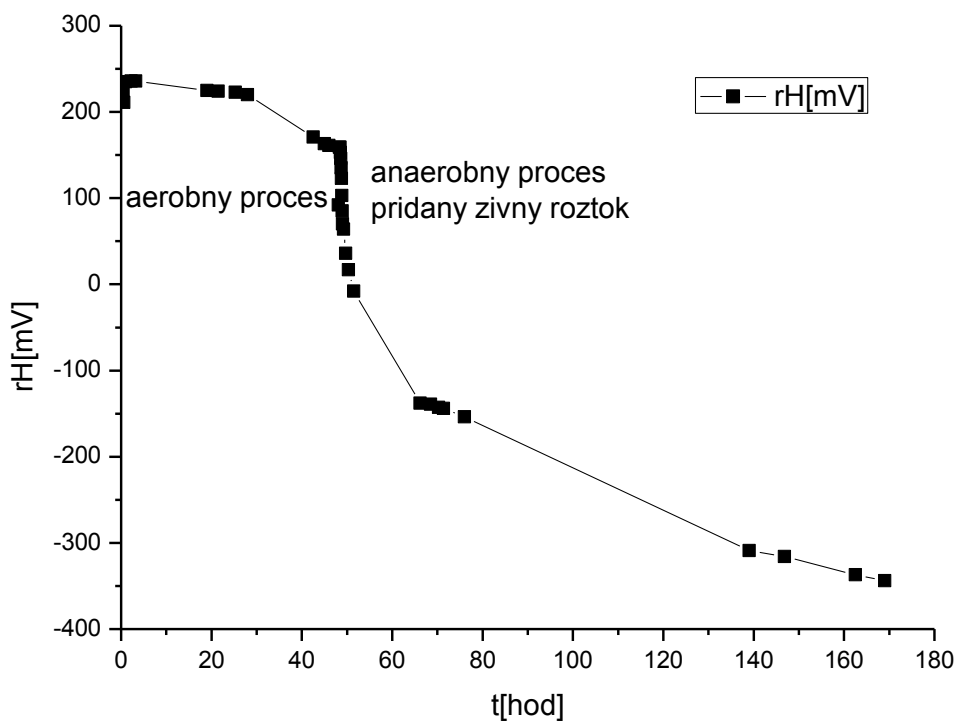
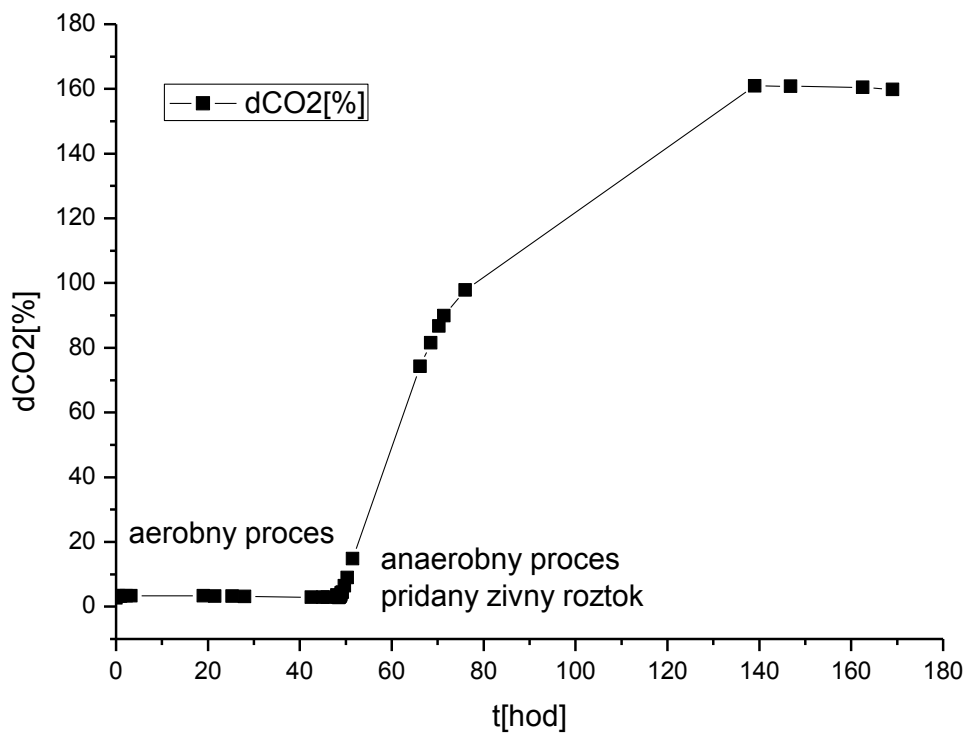


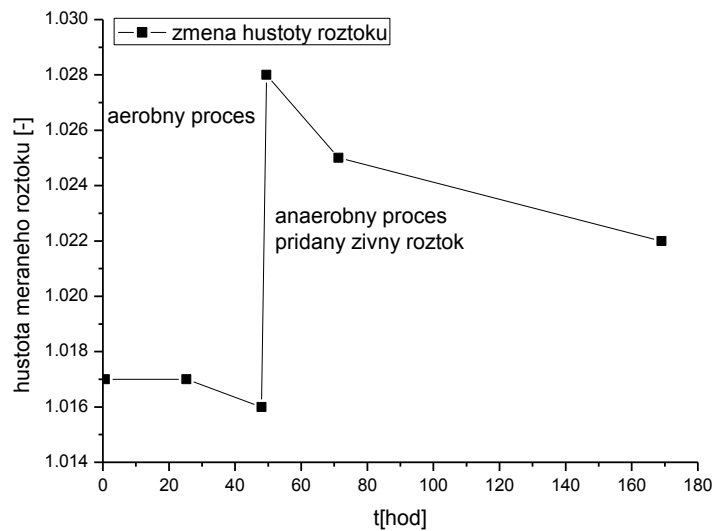
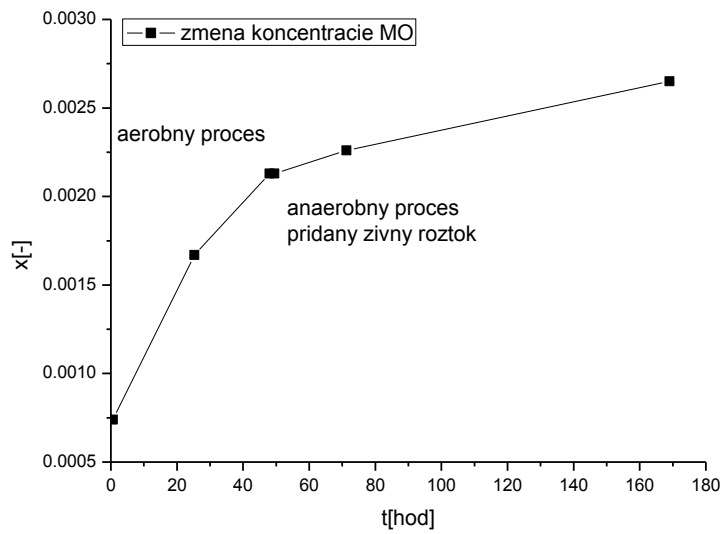
Detail priebehu dCO₂ po vypnutí O₂.

48:27	2,8	159	detail prechodu
48:34	2,9	153	detail prechodu
48:37	3,0	146	detail prechodu
48:41	3,1	135	detail prechodu
48:45	3,2	123	detail prechodu
48:50	3,4	103	detail prechodu
48:54	3,6	92	detail prechodu
48:57	3,7	85	detail prechodu
49:08	4,2	70	detail prechodu
49:14	4,5	64	detail prechodu
49:18			
Doplnený živný roztok, celá náplň fľaše→250 ml			
hustomer: 1.025 (28°C) → 1.028 (15°C) →7.5°NM			
49:46	6,4	36	
50:20	9,0	17	
51:35	14,8	-8	
66:12	74,3	-138	
68:31	81,5	-139	
70:15	86,7	-143	

71:21	89,9	-144	hustomer: 1.022 (29°C) → 1.025 (15°C) → 6.8°NM
			<p>priemer skúmavky 16 mm</p> <p>$r_1 = 2,34$</p> <p>$r_2 = 1,73$</p> <p>$v = 1,73$</p> <p>$V = \frac{1}{3}\pi v(r_1r_1 + r_1r_2 + r_2r_2) = 22,6 \text{ mm}^3$</p> <p><u>koncentrácia z objemu 10ml:</u></p> <p>$x = 0,00226 \text{ ml/ml}$</p>
76:00	97,8	-154	
139:07	160,9	-309	
146:49	160,8	-316	
162:35	160,5	-337	
169:00	159,8	-344	hustomer: 1.019 (28°C) → 1.022 (15°C) → 6.0°NM
			<p>priemer skúmavky 16 mm</p> <p>$r_1 = 2,47$</p> <p>$r_2 = 1,73$</p> <p>$v = 1,90$</p> <p>$V = \frac{1}{3}\pi v(r_1r_1 + r_1r_2 + r_2r_2) = 26,55 \text{ mm}^3$</p> <p><u>koncentrácia z objemu 10ml:</u></p> <p>$x = 0,00265 \text{ ml/ml}$</p>



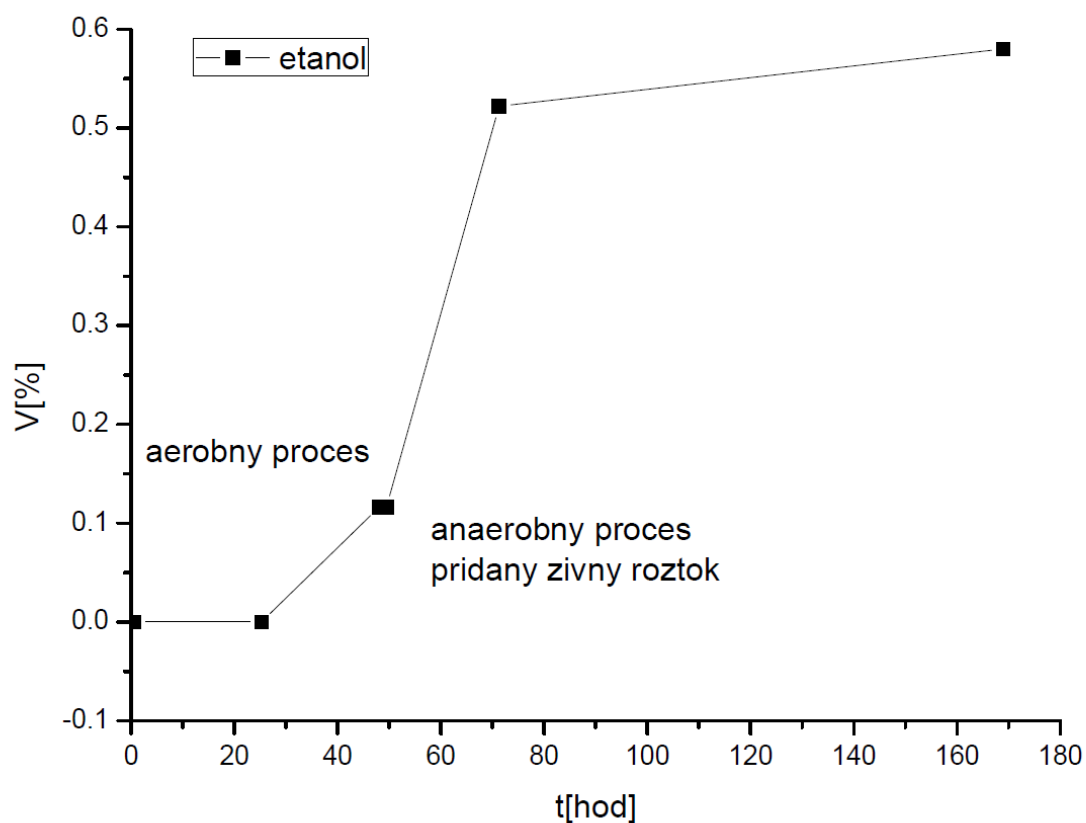




Príklad výpočtu etanolu

Zmerali sme si hustotu vína pomocou hustomeru, 1000 g/cm^3 , čomu odpovedá obsah cukru cca $21 \text{ g/lit.} = 2,1^\circ\text{NM}$, na začiatku fermentácie bola cukornatosť $21,6^\circ\text{NM}$, čiže kvasinky prekvasili $21,6^\circ\text{NM} - 2,1^\circ\text{NM} = 19,5^\circ\text{NM}$. Pri predpoklade, že s 1°NM vznikne cca $0,58 \text{ obj.\%}$ alkoholu, nám vychádza, že vo víne sa nachádza cca $19,5^\circ\text{NM} \times 0,58 = 11,31 \text{ obj.\%}$ alkoholu.

t[min]	ρ [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]	normalizovaný muštomer [$^{\circ}\text{NM}$] per cento necukrov: zanedbateľný vplyv	zmena cukornatosti a tvorba alkoholu V[%]	alkohol celkovo V[%]
AERÓBNY REŽIM				
00:10	$\rho=1,017$ (15°C)	4,5	0,000	0,000
25:14	$\rho=1,017$ (15°C)	4,5	$(4,5-4,5)\cdot 0,58=0,000$	0,000
48:18	$\rho=1,016$ (15°C)	4,3	$(4,5-4,3)\cdot 0,58=0,116$	0,116
ANAERÓBNY REŽIM				
49:18	$\rho=1,028$ (15°C)	7,5		0,116
71:21	$\rho=1,025$ (15°C)	6,8	$(7,5-6,8)\cdot 0,58=0,406$	0,522
169:00	$\rho=1,022$ (15°C)	6,0	$(6,8-6,0)\cdot 0,58=0,464$	0,580
http://www.refraktometer-eshop.sk/cukornatost-mustu				



CELKOVÁ SPOTREBA ROZTOKOV:

živný roztok: 250 ml

roztok HCL: 100 ml

roztok NaOH: 150 ml

ČESKOSLOVENSKÝ NORMALIZOVANÝ MUŠTOMER

udáva počet kg cukru v 100 litroch muštu (°NM). Stupnica je delená od 10°NM do 30°NM po 0,2°NM. Muštomer je vybavený teplomerom o rozsahu -5 až 35°C a je určený na meranie cukornatosti pri 15°C. Má dĺžku 0,37m. Zvýšenie obsahu cukru v mušte o 1°NM sa dosiahne pridaním 1,053 kg cukru na 100 litrov muštu. V tomto množstve však nie je zahrnuté množstvo na pricukrenie zvyškového objemu v dôsledku úpravy cukornatosti. Pre praktické účely rátajme: 1°NM=1,1kg/l muštu, čo je približne 0,55 objemu vzniknutého alkoholu.

Pre ďalšie spracovanie nameraných dát sa vychádza z údaju, že zvýšenie obsahu cukru v mušte o 1°NM sa dosiahne pridaním 1,053 kg cukru na 100 litrov muštu.

VÝŤAŽKOVÉ FAKTORY:

aeróbnny režim:

výťažkový koeficient biomasy zo substrátu (definovaný ako zmena objemu kvasiniek v (ml) z jedného (ml) substrátu na (g) cukru)

$$Y_{xs} = -\frac{dx}{ds} = -\frac{0,000739 - 0,00213}{0,05 - 0,04789} = \frac{0,001391 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1}}{0,00211 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}} = 0,66 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$$

Zmena koncentrácie cukru je vzťahovaná na počiatočnú koncentráciu cukru pri príprave substrátu, teda 50 g cukru na 1 liter destilovanej vody.

výťažkový koeficient produktu zo substrátu

$$Y_{ps} = -\frac{dp}{ds} = -\frac{0 - 0,00116}{0,05 - 0,04789} = \frac{0,00116 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1}}{0,00211 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}} = 0,55 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$$

výťažkový koeficient produktu z biomasy

$$Y_{px} = \frac{dp}{dx} = \frac{0 - 0,00116}{0,000739 - 0,00213} = \frac{0,00116 \text{ ml}}{0,00139 \text{ ml}} = 0,833 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1}$$

anaeróbný režim:

výťažkový koeficient biomasy zo substrátu

$$Y_{xs} = -\frac{dx}{ds} = -\frac{0,00213 - 0,00265}{0,0789 - 0,06318} = \frac{0,00052 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1}}{0,01572 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}} = 0,033 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$$

výťažkový koeficient produktu zo substrátu

$$Y_{ps} = -\frac{dp}{ds} = -\frac{0,00116 - 0,0058}{0,0789 - 0,06318} = \frac{0,00464 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1}}{0,01572 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}} = 0,295 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$$

výťažkový koeficient produktu z biomasy

$$Y_{px} = \frac{dp}{dx} = \frac{0,00116 - 0,0058}{0,00213 - 0,00265} = \frac{0,00464 \text{ ml}}{0,00052 \text{ ml}} = 8,2 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1}$$

KINETIKA:

aeróbný režim:

priemerná rýchlosť rastu biomasy:

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \frac{0,000739 - 0,00213}{48,3} = \frac{0,00139 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1}}{48,3 \text{ hod}} = 0,0000288 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ hod}^{-1}$$

priemerná rýchlosť vytvárania produktu (etanolu)

$$r_p = \frac{dp}{dt} = \frac{0,00 - 0,00116}{48,3} = \frac{0,00116 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1}}{48,3 \text{ hod}} = 0,000024 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ hod}^{-1}$$

anaeróbný režim:

priemerná rýchlosť rastu biomasy:

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \frac{0,00265 - 0,00226}{120,7} = \frac{0,0039 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1}}{120,7 \text{ hod}} = 0,00000323 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ hod}^{-1}$$

priemerná rýchlosť vytvárania produktu (etanolu)

$$r_p = \frac{dp}{dt} = \frac{0,00116 - 0,0058}{120,7} = \frac{0,00464 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1}}{120,7 \text{ hod}} = 0,0000384 \text{ ml} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ hod}^{-1}$$

6.2 NÁZOV EXPERIMENTU: Testovanie vplyvu prietoku vzduchu 3,0 NI/min

DÁTUM: 20.4.2015

HODNOTA TESTOVANÉHO PARAMETRA: 3,0 NI/min

Pri druhom meraní je všetko tak isto ako pri prvom, to znamená, že substrát, nastavenie pH, zloženie živného roztoku sú rovnaké. Rozdiel je len ten, že v režime Stand by a Cultivation sa nastaví prietok vzduchu na 3 NI / min namiesto 1 NI / min. Nemenia sa ani otáčky a teplota

STAND BY

teplota: 28 °C

otáčky miešadla: 100 min⁻¹

prietok vzduchu: 3,0 NI / min

pH 5,75

kalibrácia dO₂ sondy na 100% po ustálení teploty

Pozn. Na grafe je 130%.

t [hod:min]	dCO ₂ [%]	rH [mV]	poznámka
01:02	-	-	sonda d02 →100% (drift 0,00) Na grafe je 130%.



Obr. 13 Priebeh pH, dO₂ v režime STAND BY

CULTIVATION

Aeróbná kultivácia:

teplota: 28°C

otáčky miešadla: 100 min⁻¹

prietok vzduchu: 3,0 Nl /min

pH: 5,75 ±0,25

celkový čas: 48:39

Anaeróbná kultivácia:

doplnkové živiny vo forme roztoku: celý objem, 250 ml.

teplota: 28°C

otáčky miešadla: 100 min⁻¹

prietok vzduchu: bez vzduchu

pH: 5,75 ±0,25


celkový čas: 48:39 – 168:14



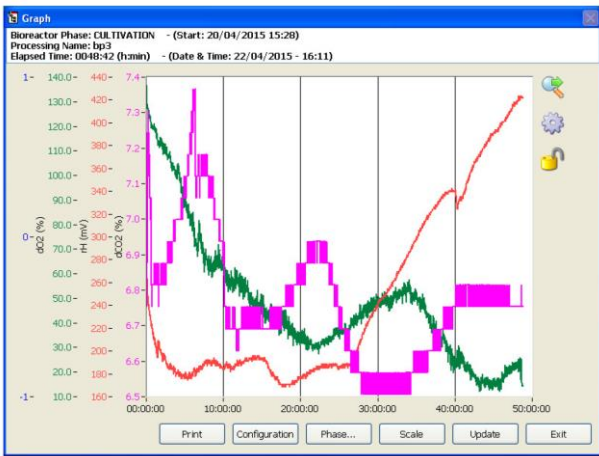
EXPERIMENT

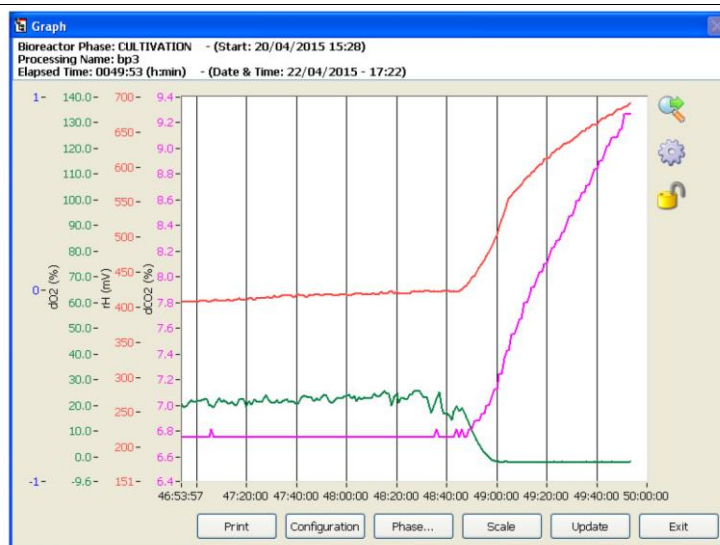
meria sa:

- dO₂
- dCO₂
- pH
- Redox

- spotreba cukru meraná hustomerom
- rast biomasy meraná objemom usadeniny po odstredení

t [hod:min]	dCO2[%]	rH [mV]	poznámka
AERÓBNY PROCES			
00:00			hustomer: 1.014 (28°C) → 1.017 (15°C) →4,5 °NM
00:06			inokulum
00:10	-	-	vzorka PMV
		<p>priemer skúmavky 16 mm</p> <p>$r1 = 2,04$</p> <p>$r2 = 1,73$</p> <p>$v = 1,15$</p> <p>$V = \frac{1}{3}\pi v(r1r1 + r1r2 + r2r2) = 12,9 \text{ mm}^3$</p> <p><u>koncentrácia z objemu 10ml:</u></p> <p>$x = 0,00129 \text{ ml/ml}$</p>	
24:59	-	-	hustomer: 1.014 (28°C) → 1.017 (15°C) → 4,5°NM

	<p>priemer skúmavky 16 mm</p> $r1 = 2,71$ $r2 = 1,73$ $v = 3,89$ $V = \frac{1}{3}\pi v(r1r1 + r1r2 + r2r2) = 61,6 \text{ mm}^3$ <u>koncentrácia z objemu 10ml:</u> $x = 0,00616 \text{ ml/ml}$		
<p>48:39</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>odobrala sa vzorka 250 ml pre stanovenie hustoty, ale vzorka sa už nevrátila späť hustomer: 1.014 (28°C) → 1.017 (15°C) → 4,5°NM</p>
	<p>priemer skúmavky 16 mm</p> $r1 = 2,73$ $r2 = 1,73$ $v = 2,93$ $V = \frac{1}{3}\pi v(r1r1 + r1r2 + r2r2) = 46,7 \text{ mm}^3$ <u>koncentrácia z objemu 10ml:</u> $x = 0,00467 \text{ ml/ml}$		
			
<p>Pozn. Červená čiara rH (mV) má opačný priebeh v dôsledku nesprávnej kalibrácie.</p>			
<p>ANAERÓBNY PROCES</p>			
<p>48:39</p>			<p>vypnuté O₂</p>





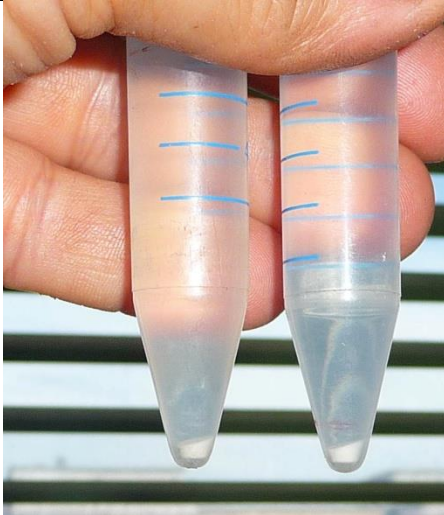
Detail priebehu vyčerpania O₂ pri jeho vypnutí, krivka spotreby O₂ po vypnutí prívodu vzduchu. Pozn. Červená čiara rH (mV) má opačný priebeh v dôsledku nesprávnej kalibrácie.

Doplnený živný roztok, celá náplň fľaše → 250 ml

hustomer: 1.025 (28°C) → 1.028 (15°C) → 7.5°NM

49:57	-	-74	
50:16	-	-88	
51:30	-	-141	
63:29	-	-283	
66:10	-	-294	
69:10	-	-305	
72:19	-	-319	
73:41	-	-325	hustomer: 1.025 (28°C) → 1.028 (15°C) → 7,5°NM

			<p>priemer skúmavky 16 mm</p> <p>$r_1 = 2,34$</p> <p>$r_2 = 1,73$</p> <p>$v = 1,73$</p> <p>$V = \frac{1}{3}\pi v(r_1r_1 + r_1r_2 + r_2r_2) = 49,3 \text{ mm}^3$</p> <p><u>koncentrácia z objemu 10ml:</u></p> <p>$x = 0,00493 \text{ ml/ml}$</p>
76:18	-	-331	
88:45	-	-360	
91:36	-	-364	<p>hustomer: 1.024 (28°C) → 1.027 (15°C) → 7,2°NM</p>
			<p>priemer skúmavky 16 mm</p> <p>$r_1 = 2,62$</p> <p>$r_2 = 1,77$</p> <p>$v = 2,62$</p> <p>$V = \frac{1}{3}\pi v(r_1r_1 + r_1r_2 + r_2r_2) = 40,3 \text{ mm}^3$</p> <p><u>koncentrácia z objemu 10ml:</u></p> <p>$x = 0,00402 \text{ ml/ml}$</p>
99:57	-	-372	
160:42	-	-403	
163:53	-	-403	
168:14	-	-404	<p>hustomer: 1.023 (28°C) → 1.026 (15°C) → 7,0°NM</p>



priemer skúmavky 16 mm

$$r1 = 2,46$$

$$r2 = 1,75$$

$$v = 2,41$$

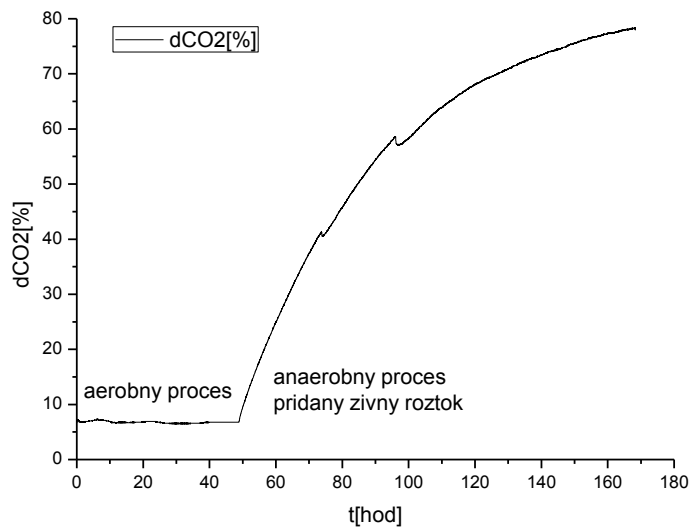
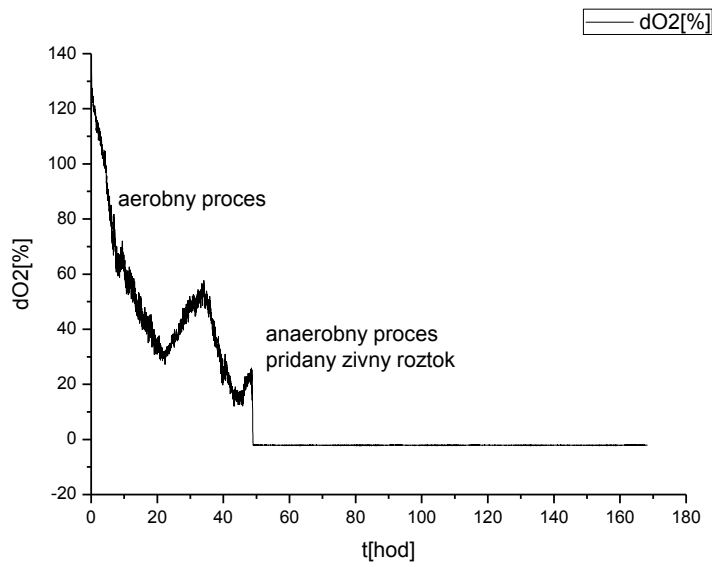
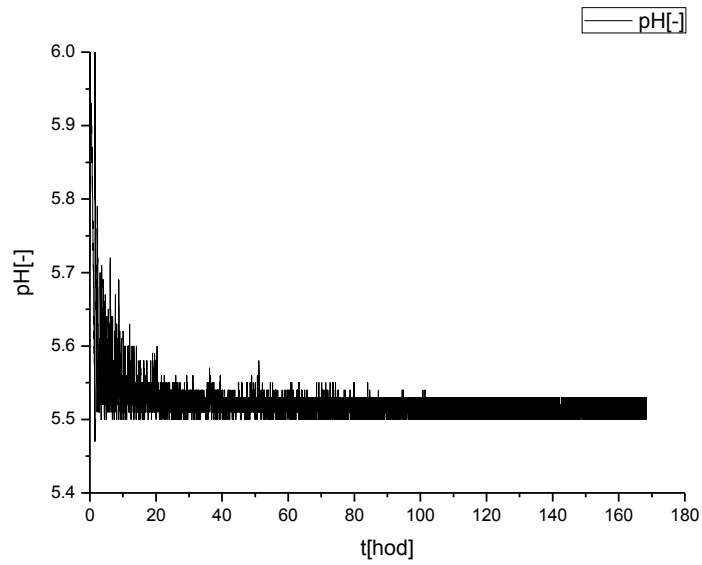
$$V = \frac{1}{3}\pi v(r1r1 + r1r2 + r2r2) = 34,0 \text{ mm}^3$$

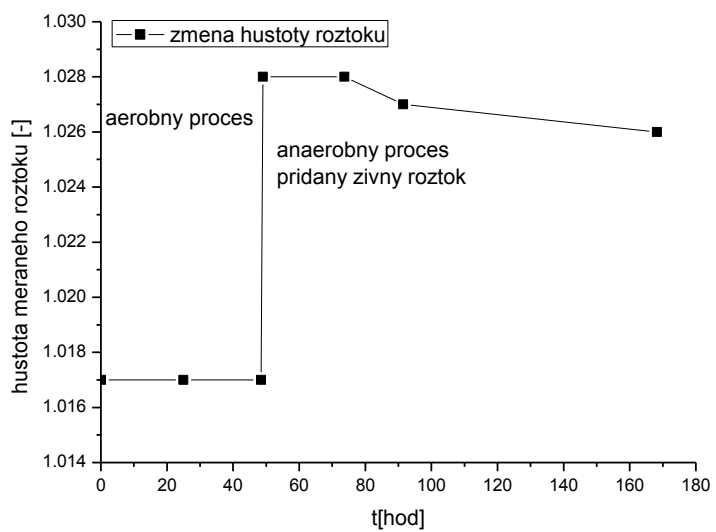
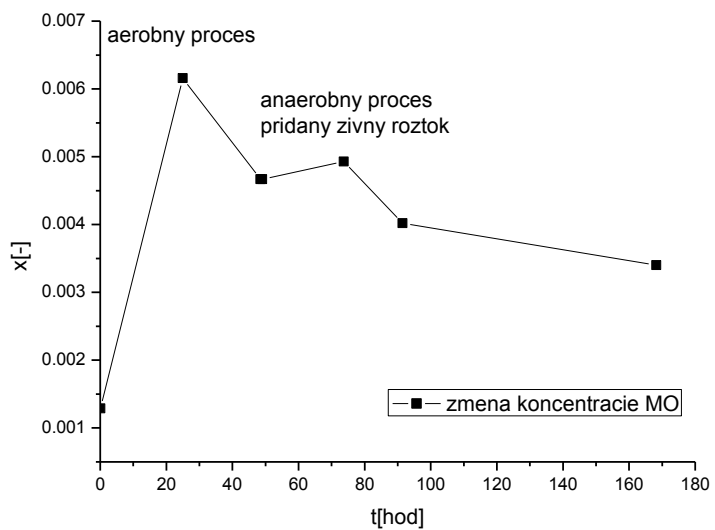
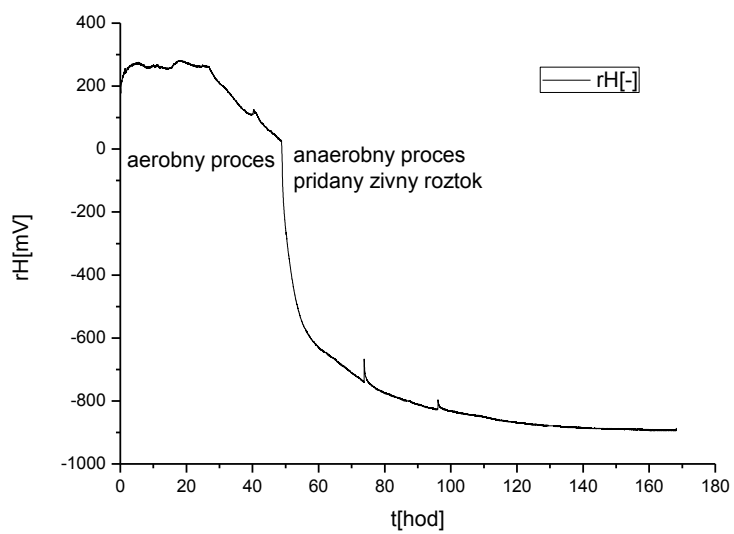
koncentrácia z objemu 10ml:

$$x = 0,00340 \text{ ml/ml}$$

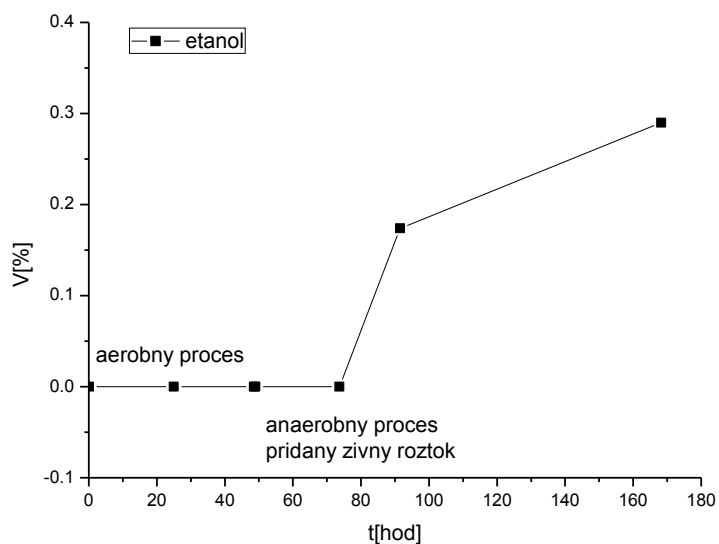


Červená čiara rH (mV) má opačný priebeh v dôsledku nesprávnej kalibrácie.





t[min]	ρ [g.cm ⁻¹]	normalizovaný muštomer[°NM] percento necukrov: zanedbateľný vplyv	zmena cukornatosti a tvorba alkoholu V[%]	alkohol celkovo V[%]
AERÓBNY REŽIM				
00:00	$\rho=1,017$ (15°C)	4,5	0,000	0,000
24:59	$\rho=1,017$ (15°C)	4,5	$(4,5-4,5) \cdot 0,58=0,000$	0,000
48:39	$\rho=1,017$ (15°C)	4,5	$(4,5-4,4) \cdot 0,58=0,000$	0,000
ANAERÓBNY REŽIM				
49:57	$\rho=1,028$ (15°C)	7,5		0,000
73:41	$\rho=1,028$ (15°C)	7,5	$(7,5-7,5) \cdot 0,58=0,000$	0,000
91:36	$\rho=1,027$ (15°C)	7,2	$(7,5-7,2) \cdot 0,58=0,174$	0,174
168:14	$\rho=1,026$ (15°C)	7,0	$(7,2-7,0) \cdot 0,58=0,116$	0,290
http://www.refraktometer-eshop.sk/cukornatost-mustu				



VÝŤAŽKOVÉ FAKTORY:

aeróbnny režim:

výt'azkový koeficient biomasy zo substrátu (definovaný ako zmena objemu kvasiniek v (ml) z jedného (ml) substrátu na (g) cukru)

$$Y_{xs} = -\frac{dx}{ds} = -\frac{0,00129 - 0,00467}{0,05 - 0,04473} = \frac{0,00338 \text{ ml. ml}^{-1}}{0,00527 \text{ g. ml}^{-1}} = 0,641 \text{ ml. g}^{-1}$$

Zmena koncentrácie cukru je vzťahovaná na počiatočnú koncentráciu cukru pri príprave substrátu, teda 50 g cukru na 1 liter destilovanej vody.

výt'azkový koeficient produktu zo substrátu

$$Y_{ps} = -\frac{dp}{ds} = \frac{0 - 0}{0,05 - 0,04473} = \frac{0,00 \text{ ml. ml}^{-1}}{0,0527 \text{ g. ml}^{-1}} = 0,00 \text{ ml. g}^{-1}$$

Nemerateľná tvorba produktu, etanolu.

výt'azkový koeficient produktu z biomasy

$$Y_{px} = \frac{dp}{dx} = \frac{0 - 0}{0,00129 - 0,00467} = \frac{0,00 \text{ ml}}{0,00338 \text{ ml}} = 0,00 \text{ ml. ml}^{-1}$$

Nemerateľná tvorba produktu, etanolu.

anaeróbnny režim:

výt'azkový koeficient biomasy zo substrátu

$$Y_{xs} = -\frac{dx}{ds} = -\frac{0,00467 - 0,0034}{0,0789 - 0,0737} = \frac{0,00127 \text{ ml. ml}^{-1}}{0,0052 \text{ g. ml}^{-1}} = -0,244 \text{ ml. g}^{-1}$$

Nastal pokles koncentrácie kvasiniek. Príčina by si vyžadovala použiť vhodné metódy analytickej chémie. Jednou z možností je premnoženie kvasiniek v aeróbnom procese, v dôsledku čoho mohlo nastať vyčerpanie živných solí podporujúcich ich rast a metabolizmus, čo viedlo k ich úhynu.

výt'azkový koeficient produktu zo substrátu

$$Y_{ps} = -\frac{dp}{ds} = -\frac{0 - 0,0029}{0,0789 - 0,0737} = \frac{0,0029 \text{ ml. ml}^{-1}}{0,0052 \text{ g. ml}^{-1}} = 0,57 \text{ ml. g}^{-1}$$

výtťažkový koeficient produktu z biomasy

$$Y_{px} = \frac{dp}{dx} = \frac{0 - 0,0029}{0,00467 - 0,0034} = \frac{-0,0029ml}{0,00127ml} = -2,28ml \cdot ml^{-1}$$

Tvorba etanolu prebiehala na úkor poklesu koncentrácie kvasiniek. Tento jav môže mať podobné príčiny ako pri určení výtťažkového koeficientu biomasy zo substrátu.

KINETIKA:

aeróbnny režim:

priemerná rýchlosť rastu biomasy:

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \frac{0,00467 - 0,00129}{48,7} = \frac{0,00338ml \cdot ml^{-1}}{48,7hod} = 0,0000694ml \cdot ml^{-1} \cdot hod^{-1}$$

priemerná rýchlosť vytvárania produktu (etanolu)

$$r_p = \frac{dp}{dt} = \frac{0,00 - 0,00}{48,7} = \frac{0,00ml \cdot ml^{-1}}{48,7hod} = 0,00ml \cdot ml^{-1} \cdot hod^{-1}$$

anaeróbnny režim:

priemerná rýchlosť rastu biomasy:

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \frac{0,0034 - 0,00467}{119,53} = \frac{-0,00127ml \cdot ml^{-1}}{119,53hod} = -0,0000106ml \cdot ml^{-1} \cdot hod^{-1}$$

Zmena rýchlosti koncentrácie biomasy je v tomto prípade rýchlosťou ich úhynu.

priemerná rýchlosť vytvárania produktu (etanolu)

$$r_p = \frac{dp}{dt} = \frac{0,0029 - 0,00}{119,53} = \frac{0,0029ml \cdot ml^{-1}}{119,53hod} = 0,0000243ml \cdot ml^{-1} \cdot hod^{-1}$$

aeróbný režim					
prietok vzduchu [Nl.min ⁻¹]	Y_{xs} [ml.g ⁻¹]	Y_{ps} [ml.g ⁻¹]	Y_{px} [ml.ml ⁻¹]	r_x [ml.ml ⁻¹ .hod ⁻¹]	r_p [ml.ml ⁻¹ .hod ⁻¹]
1,00	0,66	0,55	0,833	0,0000288	0,000024
3,00	0,641	0,00	0,00	0,0000694	0,00
anaeróbný režim					
prietok vzduchu [Nl.min ⁻¹]	Y_{xs} [ml.g ⁻¹]	Y_{ps} [ml.g ⁻¹]	Y_{px} [ml.ml ⁻¹]	r_x [ml.ml ⁻¹ .hod ⁻¹]	r_p [ml.ml ⁻¹ .hod ⁻¹]
1,00	0,033	0,295	8,92	0,00000323	0,0000384
3,00	-0,0244	0,557	-2,28	-0,0000106	0,0000243

7. ZÁVER

Ako už bolo spomenuté v texte, prívod kyslíka k bunkám kvasiniek mení metabolizmus buniek týchto mikroorganizmov tak, že sa znižuje produkcia etanolu a zvyšuje rast a rozmnožovanie kvasiniek. Pasteurov efekt je určujúci pre proces technológie výroby droždia. Výsledky experimentov sú v zhode s týmto javom.

Pri prietoku vzduchu 1,00 Nl.min⁻¹ nastáva pri aeróbnom režime rýchly nárast biomasy, kvasiniek. Opisuje ho parameter rýchlosť rastu biomasy r_x . Rýchlosť rastu biomasy sa spomalí pri anaeróbnom režime.

Pri prietoku vzduchu 3,00 Nl.min⁻¹ nastáva pri aeróbnom režime niekoľkonásobne rýchlejšia rast biomasy, kvasiniek. Pri anaeróbnom režime výsledky ukazujú opačnú tendenciu, teda znižuje sa koncentrácia mikroorganizmov, čo by svedčilo o ich úhyne a rozklade.

Tento ja by si vyžadoval hlbšie skúmanie prostredníctvom analytických metód pre stanovenie chemického a mikrobiálneho zloženia substrátu. Príčinou môže byť napr. vysoká koncentrácia kvasiniek, čo môže viesť k rýchlemu vyčerpaniu živnej soli so stopovými prvkami a tým k spomaleniu činnosti a úhynu kvasiniek. Druhou príčinou môže byť rast konkurenčnej mikroflóry, ktorá potláča rast kvasiniek Oenoferm Structure.

Rýchlosť tvorby produktu r_p , etanolu, je pri aeróbnom stupni, pri prietoku vzduchu $3\text{NL}\cdot\text{min}^{-1}$ nemeateľná prostredníctvom normalizovaného muštomeru. Pri prietoku vzduchu $1\text{NL}\cdot\text{min}^{-1}$ dosahuje menšie hodnoty ako v aeróbnom stupni. Ak sa porovná produkcia v anaeróbnom stupni, je pri prietoku $1\text{NL}\cdot\text{min}^{-1}$ vyššia ako pri $3\text{NL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Porovnaním výťažkového faktora Y_{ps} je možné konštatovať, že pri prietoku vzduchu $1\text{NL}\cdot\text{min}^{-1}$ v aeróbnom režime sa vyprodukuje viac etanolu ako pri prietoku $3\text{NL}\cdot\text{min}^{-1}$. V anaeróbnom stupni sa však dosahuje vyššia konverzia cukru (substrátu) na etanol. Vzájomná súvislosť zvyšných parametrov je uvedená v tabuľke.

8. ZDROJE

1. http://is.muni.cz/th/270274/prif_b/finalni_bakalarska_prace.pdf
2. Klemm, Dieter; Heublein, Brigitte; Fink, Hans-Peter; Bohn, Andreas (2005). "Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material". *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (22). doi:10.1002/anie.200460587
3. http://geo3.fsv.cvut.cz/vyuka/kapr/SP/2008_2009/busta_fiedlerova/vyroba.html
4. Machaňová D., Předúpravatextilií – Návod y na cvičení, skriptum TU, Liberec 2007, ISBN 978-80-7372-240-1
5. Kačík F., Kačíková D., Jablonský M., Katuščák S.: *Polymer Degradation and Stability*, 2009, 94, 1509-1514
6. BLAŽEJ, A. – KRKOŠKA, P.: *Technológia výroby papiera*. Praha:ALFA-Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1989, ISBN 80-05-00119-3, s.581
7. <http://nadobrejvlne.sk/sk/content/11-prize-na-pleteni>
8. <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/energeticke-vyuzitie-rastlinnej-biomasy-1-chemicke-zlozenie-a-technologie>
9. JANÍČEK, F. et al. *Obnoviteľné zdroje energie 1 : Technológie pre udržateľnú budúcnosť*. Pezinok : Renesans, s. r. o., 2007. 176 s. ISBN 978-80-969777-0-3.
10. <http://kekule.science.upjs.sk/chemia/sutaz/recyklacia.pdf>
11. Enzymatická hydrolýza celulóзовých a lignocelulóзовých materiálov Ing. Bohuslav BEZÚCH CSc., Výskumný ústav papiera a celulózy, Lamačská 3, 815 20 Bratislava
12. *Papírenská příručka*, Ing. Dr. Václav Hnětkovský a kolektiv, Praha 1983, Nakladatelství technické literatury
13. Doc. Ing. Mária Linkešová, CSc., Ing. Ivona Paveleková, CSc., 2007, *Vybrané kapitoly z chemickej a potravinárskej technológie*

14. www.viks.sk/chk/papacel_3_88_15_17.doc
15. JitKangLim [online]. 2002 [cit. 2011-04-05]. Fermentation of ethanol. Dostupné z WWW:<<http://www.andrew.cmu.edu/user/jitkangl/Fermentation%20of%20Ethanol/Fermentation%20of%20Ethanol.htm>>.
16. <http://www.tempeh.info/fermentation/alcohol-fermentation.php>
17. Doc. Ing. Mária Linkešová, CSc., Ing. Ivona Paveleková, CSc., 2007
18. Vybrané kapitoly z chemickej a potravinárskej technológie
19. <http://foodreference.about.com/od/Food-Additives/a/What-Is-Cellulose.htm>
20. <http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E460>

Ďalšie zdroje:

Linko, M., Anevaluation of enzymatic hydrolysis of cellulosic materials, in *Advances in Biochemical Engineering*, **5**, 39, 1977.

http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XX_5_cl3.pdf

http://greenthefuture.com/CELLETHANOL_HOWITWORKS_PROCESS_CELLULOLYSIS.html

<http://www.equark.sk/index.php?cl=article&iid=707>

Obrázky:

Obr. 1 <http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/101/consumer/faq/what-is-cellulose.shtml>

Obr. 2 <http://www.constroxplus.ca/en/isolation/>

Obr. 3 <http://empoweredhomeschooler.com/the-6-most-horrifying-lies-the-food-industry-is-feeding-you/>

Obr. 4 http://www.alibaba.com/product-detail/CMC-Carboxymethyl-Cellulose-E466-E460-Food_60102320295.html