

Vplyv hydrodynamických podmienok na hydrolýzu sacharózy v nehybnej vrstve imobilizovaných kvasiniek 579 663

Doc. Ing. VLADIMÍR BÁLEŠ, CSc., Ing. ALOJZ MÉSZAROS, CSc., Chemickotechnologická fakulta ŠVŠT, 812 37 Bratislava

Kľúčové slová: *bioreaktor, nehybná vrstva, invertáza, hydrodynamika, imobilizované bunky*

ÚVOD

Používanie glukózofruktózových sirupov v našich technológiách stále naráža na ich nedostatok. Preto je o ich produkciu záujem nielen zo strany priemyslu, ale aj výskumu. Bežne praktizovaná kyslá hydrolýza je limitovaná vysokou koncentráciou kyseliny a nežiadúcimi

dekoloračnými efektmi [1]. Pre potravinárske účely je vhodnejšia enzýmová hydrolýza invertázou (β -D-fruktofuranozidáza EC 3.2.1.26), ktorá sa izoluje a čistí z viacerých zdrojov [2, 3, 4]. Izolácia a čistenie enzýmu je ekonomicky náročné. Čiastočne sa tento problém rieši imobilizáciou enzýmu, čo umožňuje jeho viacnásobné použitie [5, 6, 7, 8]. Efektívnejší sa javí prístup s imo-

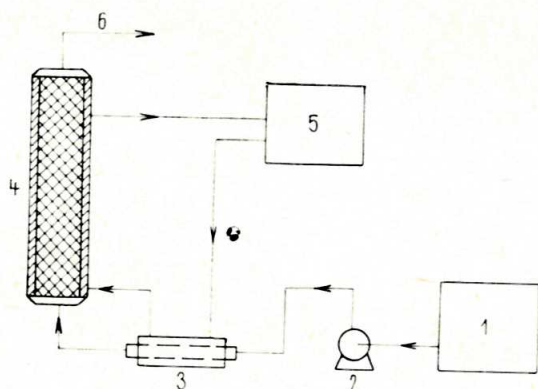
bilizáciou celých buniek, napr. *Saccharomyces cerevisiae* s vysokou invertázovou aktivitou [9, 10, 11, 12, 13], lebo odpadá izolácia a čistenie enzýmu.

Doteraz publikované práce zaoberajúce sa hydrolýzou sacharózy imobilizovanými bunkami malú pozornosť venovali inžinierskym problémom procesu. Prevažná väčšina autorov sa zhoduje v názore, že na uvedený proces je najvhodnejší bioreaktor s nehybnou vrstvou imobilizovaného biokatalyzátora [14, 15]. Súvisí to s faktom, že tento typ reaktora sa používa v prípade inhibičných vplyvov substrátu, ale aj produktu, čo je charakteristické aj pre hydrolýzu sacharózy. V našej práci sme sa sústredili na detailnejšie štúdium hydrodynamických podmienok hydrolýzy sacharózy v nehybnej vrstve imobilizovaných buniek *Saccharomyces cerevisiae*.

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

V práci boli použité kvasínky *Saccharomyces cerevisiae* PZ 43 (Ústav biotechnológie SVŠT). Detaily kultivácie a získania kvasiniek s výraznou invertázovou aktivitou sú uvedené v [10]. Kvasinky boli imobilizované do Ca-alginátového gélu, spôsobom publikovaným v [16]. Častice biokatalyzátora mali priemer $2,66 \text{ mm} \pm 0,20 \text{ mm}$ a koncentráciu biomasy $2,58 \text{ g.l}^{-1}$ alginátu.

V experimentoch bola použitá aparátúra schématicky znázornená na obr. 1. Roztok sacharózy bol dávkaný piestovým mikročerpadlom 2 zo zásobnej nádrže 1 cez



Obr. 1. Schéma experimentálneho zariadenia

1 — zásobná nádoba sacharózového roztoku, 2 — mikročerpadlo, 3 — výmenník tepla, 4 — bioreaktor, 5 — termostát, 6 — výtok z reaktora

výmenník tepla 3 do bioreaktora 4. Výmenník tepla a bioreaktor boli temperované termostatom 5 na teplotu 45°C . Mikročerpadlo udržiavalo prietok v rozsahu do 700 ml.h^{-1} s presnosťou $\pm 1\%$. Prietok bol kontrolovaný na výstupe z reaktora priamou metódou. Bioreaktor (obr. 2) tvorila sklená kolóna o vnútornom priemere 4,5 cm a výške 28 cm. Kolóna bola oplášťovaná, vonkajší priemer plášťa 8 cm. Po výške kolóny bolo umiestnených 5 vzorkovacích otvorov vzdialených od dna 5, 10, 15, 20 a 25 cm. Dno a hlavu kolóny tvorila sklená frita. Výška vrstvy biokatalyzátora vo všetkých experimentoch bola 27 cm.

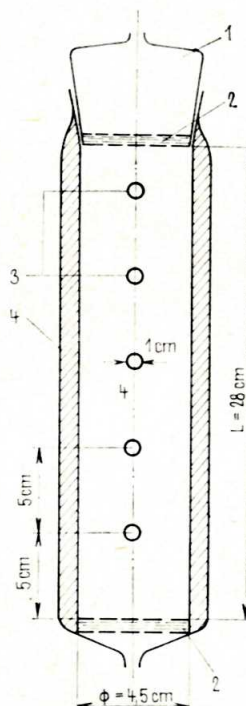
Koncentrácia sacharózy na vstupe do reaktora bola $0,298 \text{ mol.l}^{-1}$. Vzorky roztoku po hydrolýze boli odobierané na výstupe z bioreaktora a vo vzorkovacích otvoroch. Biochemická reakcia bola zastavená prídavkom $0,02 \text{ mol.l}^{-1}$ roztoku NaOH a varením 6 minút. Koncentrácia glukózy vo vzorkách bola stanovená Biolatestom (Lachema Brno) [10].

VÝSLEDKY EXPERIMENTOV A DISKUSIA

Bol sledovaný vplyv prietoku, resp. zdržného času na konverziu sacharózy. Prietok sa menil v rozsahu $0,77 \text{ ml.min}^{-1}$ až $11,6 \text{ ml.min}^{-1}$. Týmto hodnotám zodpovedá Reynoldsovo číslo $Re = D_p w \rho / \mu$ rovné 0,03 až 0,47 kde D_p je priemer guľčiek biokatalyzátora, w — mimo-

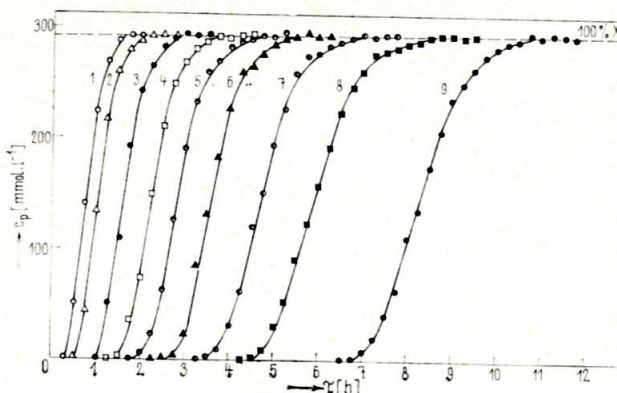
vrstvá rýchlosť média, ρ — hustota a μ — dynamická viskozita média. Pracovali sme teda v laminárnej oblasti prúdenia. Na obr. 3 a obr. 4 sú uvedené koncentračné profily glukózy na výstupe z reaktora pre jednotlivé prietoky. Zaujímavosťou na obrázkoch je skutočnosť, že k prieniku glukózy na výstupe z reaktora do objemového prietoku $6,55 \text{ ml.min}^{-1}$ dochádza v rôznych časoch, kým od prietoku $6,55 \text{ ml.min}^{-1}$ je prienik glukózy na výstupe z bioreaktora prakticky v rovnakom čase 0,5 h. Pri prietoku $6,55 \text{ ml.min}^{-1}$ sa ešte dosiahne 100% konverzia sacharózy (obr. 4), pri vyšších prietokoch je už konverzia nižšia.

Na obr. 5 uvádzame koncentračné profily glukózy po výške vrstvy po dosiahnutí ustáleného stavu pre niektoré sledované prietoky. Z týchto závislostí možno ilustratívne vidieť akú konverziu možno dosiahnuť pre urči-



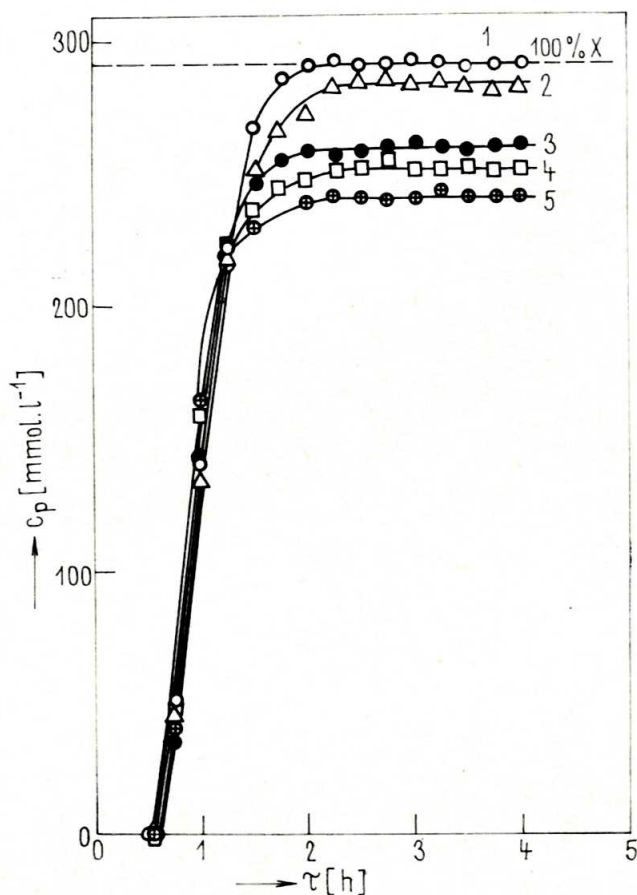
Obr. 2. Teleso bioreaktora

1 — sklená zábrusová zátk, 2 — sklená frita, 3 — vzorkovacie otvory, 4 — plášť bioreaktora



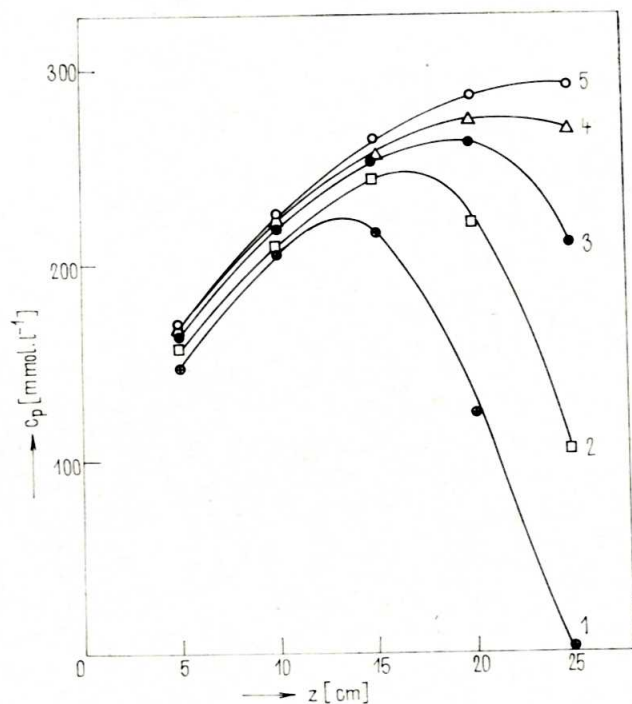
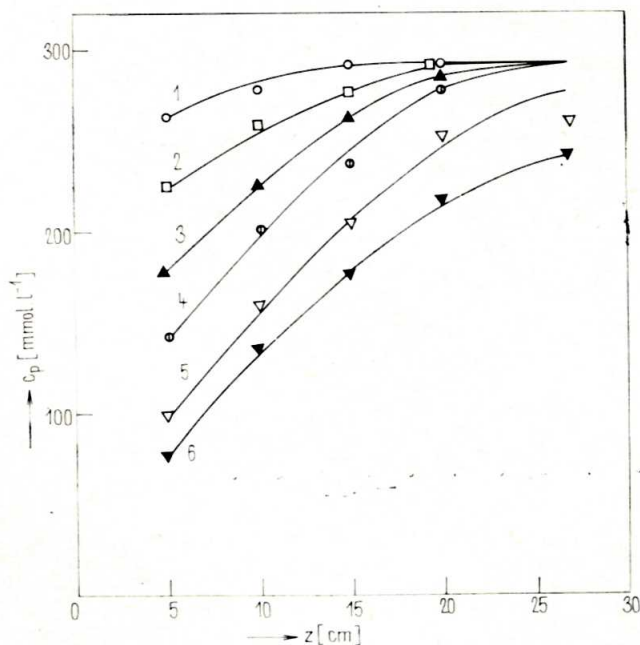
Obr. 3. Zmena koncentrácie glukózy na výstupe z reaktora od času pri rôznych prietokoch fermentačného média. Hodnoty objemového prietoku sú udávané v ml.min^{-1}

1 = 6,55; 2 = 5,95; 3 = 5,105; 4 = 3,11; 5 = 2,31; 6 = 1,85; 7 = 1,55; 8 = 1,18; 9 = 0,77



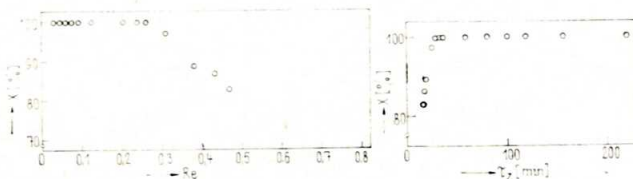
Obr. 4. Závislost zmeny koncentrácie glukózy na výstupe z reaktora od času pri rôznych objemových prietokoch fermentačného média

$T = 45^\circ\text{C}$, $\varepsilon = 0,42$, $L = 0,27\text{ m}$, $D_p = 2,66\text{ mm}$
 $c_{so} = 0,292\text{ mol.l}^{-1}$, $c_x = 2,58\text{ g.l}^{-1}$ alginátu
 1 = $V = 6,55\text{ ml.min}^{-1}$; 2 = $V = 7,05\text{ ml.min}^{-1}$;
 3 = $V = 9,45\text{ ml.min}^{-1}$; 4 = $V = 10,74\text{ ml.min}^{-1}$;
 5 = $V = 11,6\text{ ml.min}^{-1}$



Obr. 6. Koncentračný profil po dĺžke reaktora v neustálenom stave

$V = 3,11\text{ ml.min}^{-1}$, $c_{so} = 0,292\text{ mol.l}^{-1}$
 $c_x = 2,58\text{ g.l}^{-1}$ alginátu, $T = 45^\circ\text{C}$, $\varepsilon = 0,42$, $L = 0,27\text{ m}$, $D_p = 2,66\text{ mm}$
 1 = $\tau = 1,50\text{ h}$; 2 = $\tau = 2,00\text{ h}$; 3 = $\tau = 2,50\text{ h}$; 4 = $\tau = 3,00\text{ h}$; 5 = ustálený stav



Obr. 7. Závislosť konverzie sacharózy od Re čísla, pre vstupnú koncentráciu sacharózy $0,292\text{ mol.l}^{-1}$

Obr. 8. Konverzia sacharózy v závislosti od zdržného času

tú výšku vrstvy biokatalyzátora a príslušný prietok. Pre nábeh reaktora je dôležité poznať priebeh koncentrácií v reaktore v neustálenom stave. Keďže tieto merania sú časovo náročné, prezentujeme koncentračný profil po dĺžke reaktora v neustálenom stave pre objemový prietok $3,11\text{ ml.min}^{-1}$ [obr. 6].

Na obr. 7 je závislosť konverzie sacharózy $X = [(C_{so} - C_s)/C_{so}] \cdot 100$ ako funkcia Re -čísla. (C_{so} — vstupná koncentrácia sacharózy, C_s — koncentrácia sacharózy na výstupe z bioreaktora). Od hodnoty $Re = 0,3$ dochádza k rapidnému poklesu konverzie sacharózy. S týmto obrázkom korešponduje aj obr. 8, kde je vynesená konverzia sacharózy v závislosti od stredného zdržného času τ_z . Od zdržného času 26 min je konverzia sacharózy prakticky 100 %.

←

Obr. 5. Koncentračné profily po dĺžke reaktora v ustálenom stave pri rôznych prietokoch fermentačného média. Hodnoty objemového prietoku sú udávané v ml.min^{-1}

$c_s = 0,292\text{ mol.l}^{-1}$, $c_x = 2,58\text{ g.l}^{-1}$ alginátu
 $\varepsilon = 0,42$, $T = 45^\circ\text{C}$, $L = 0,27\text{ m}$, $D_p = 2,66\text{ mm}$
 1 = 0,77; 2 = 1,85; 3 = 3,11; 4 = 5,105; 5 = 9,45;
 6 = 11,6

ZÁVER

Bola študovaná hydrolýza sacharózy imobilizovanými kvasinkami *S. cerevisiae* s invertázovou aktivitou v reaktore s nehybnou vrstvou biokatalyzátora. Z výsledkov vyplynulo, že pre dané podmienky je treba zachovať režim laminárneho toku v bioreaktore do Reynoldsovo čísla $Re = 0,3$, aby sa dosiahla 100 % konverzia sacharózy na výstupe z reaktora. Tejto hodnote Re -čísla odpovedá zdržný čas 26 minút.

Zoznam symbolov

c_D	— koncentrácia produktu
c_s	— koncentrácia substrátu
c_{so}	— koncentrácia substrátu na vstupe do bioreaktora
c_x	— koncentrácia biomasy
D_D	— priemer častíc biokatalyzátora
L	— výška vrstvy biokatalyzátora
Re	— Reynoldsovo číslo
T	— teplota
V	— objemový prietok
w	— mimovrstvová rýchlosť
ε	— medzerovitost vrstvy
μ	— dynamická viskozita média
ρ	— hustota média
τ	— čas
τ_z	— stredný zdržný čas
x	— konverzie sacharózy
z	— dĺžka reaktora

Literatúra

- [1] GOLDSTEIN, H., et al.: J. Ferment. Technol. **5**, 1977, s. 516.
- [2] DICKENSHEETS R. A., CHEM. L. F., TASO G. T.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 365.
- [3] PAULJUKONIS A. B., DIKČUVENE A. A., ŽEDAS D. V.: Prikl. Bioch. i Mikrob. **16**, 1980, s. 383.
- [4] MARRAZZO N. N., MERSON R. L., MCCOY B. J.: **17**, 1975, s. 1515.
- [5] BÁLEŠ V., ŠTEFUCA V., GEMEINER P.: Kvas. prům., **32**, 1987, s. 11.
- [6] WINGARD L. B., KATCHALSKI E., GOLDMAN L.: Immobilized Enzymes Principles. 1. vyd. Acad. Press., N. Y., 1976.
- [7] ŠTEFUCA V., GEMEINER P., BÁLEŠ V.: Enzyme Microb. Technol. **10**, 1988, s. 306.
- [8] BÁLEŠ V.: Chem. prům., **37/62**, 1987, s. 320.
- [9] D'SOUZA S. F., NADKARNI G. B.: Enzyme Microb. Technol. **2**, 1980, s. 217.
- [10] BUKOVSKÁ A., et al.: Progress in Biotechnology Vol. 4. Enzyme Technology, Elsevier Publ. House, Amsterdam, 1988, p. 353—362.
- [11] TANAKA A., et al.: Ferment. Technol. **55**, 1977, s. 71.
- [12] HASAL P., VOJTIŠEK V., KRUMPHANZL V.: Proc. 4th Eur. Congr. Biotechn. 1987 vol. 2, Amsterdam, 1987, s. 103.
- [13] LORTIE R., THOMAS D.: Biotechnol. Bioeng. **28**, 1986, s. 1256.
- [14] KAREL S. F., LIBICKI S. B., ROBERTSON C. R.: Chem. Eng. Sci. **40**, 1985, s. 1321.
- [15] MAARTENSSON K.: Appl. Biochem. Biotechn. **7**, 1982, s. 11.
- [16] JOHANSEN, A., FLINK, J. M.: Enzyme Microb. Technol. **8**, 1986, s. 145.

Lektoroval Ing. Jan Páca, CSc.

Báleš V. - Mészáros A.: Vplyv hydrodynamických podmienok na hydrolýzu sacharózy v nehybnej vrstve imobilizovaných kvasiniek. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 5, s. 138—141.

V posledných rokoch je čoraz väčší záujem o aplikáciu imobilizovaných kvasiniek s invertázovou aktivitou. Chýbajú však seriózne bioinžinierske práce pre návrh bioreaktorov. V tejto práci sme sa zamerali na štúdium bioreaktora s nehybnou vrstvou imobilizovaných kvasiniek v Ca-alginátovom geli. Pre dané podmienky hydrolýzy je treba v bioreaktore zachovať laminárny režim s Re číslom do 0,3, resp. zdržný čas 26 minút.

Балеш, В. - Месарош, А.: Влияние гидродинамических условий на гидролиз сахарозы в неподвижном слое иммобилизированных дрожжей. Квас. прум., **35**, 1989, № 5, стр. 138—141.

В последние годы встречается все больший интерес к применению иммобилизированных дрожжей с инвертазной активностью. Отсутствуют однако серьезные биоинженерные работы по предложению биореакторов. В этой работе авторы сосредоточились на исследовании биореактора с неподвижным слоем иммобилизированных дрожжей в Са-альгинатовом геле. Для данных условий гидролиза в биореакторе необходимо соблюсти ламинарный режим с Re -числом до 0,3, или же время удерживания 26 минут.

Báleš, V. - Mészáros, A.: Effect of Hydrodynamic Conditions on Saccharose Hydrolysis in Fixed Bed of Immobilized Yeasts. Kvas. prům., **35**, 1989, No. 5, pp 138—141.

An interest of the use of immobilized yeasts with the invertase activity has steadily raised during the last years. However, true bioengineering parameters necessary for the reactor design are lacking up to now. This work is focused on the study of the bioreactor with fixed bed of immobilized yeasts in Ca-alginate gel. To achieve the hydrolysis of saccharose the laminar flow with Re up to 0.3 or the residence time of 26 min, resp. has to be kept in the reactor.

Báleš, V. - Mészáros, A.: Der Einfluss der hydrodynamischen Bedingungen auf die Hydrolyse der Saccharose in der bewegungslosen Schichte der immobilisierten Hefe. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 5, s. 138—141.

In den letzten Jahren interessiert man sich immer mehr um die Applikation immobilisierter Hefe mit Invertaseaktivität. Man hat aber keine ernsthaften Arbeiten aus dem Bioingenieurwesen, die zum Entwurf eines Bioreaktors dienen könnten. In dieser Arbeit haben wir uns auf das Studium des Bioreaktors mit der bewegungslosen Schichte der immobilisierten Hefe in dem Ca-Alginat-gel konzentriert. Für die gegebenen Bedingungen der Hydrolyse muss man in dem Bioreaktor das Regime mit dem Re -Index bis 0,3, resp. die Verzögerungszeit von 26 Minuten erhalten.