

Cirkulačný bioreaktor typu JLR na produkciu kvasničnej biomasy

Ing. L. CHRIAŠTEĽ, Ing. S. MAŠURA, Ing. E. VAVRÍK

Katedra chemických a potravinárskych strojov a zariadení, Strojnícka fakulta STU Bratislava

Ing. M. STREĎANSKÝ, Doc. Ing. E. ŠTURDÍK, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Bratislava

Kľúčové slova: cirkulačný bioreaktor, fermentácie, kvasinky, *Kluyveromyces marxianus*, biomasa

573 663

Vývoj bioreaktorov pre aeróbne procesy sa čoraz viac zameriava na cirkulačné typy. Tieto sa v porovnaní s klasickými miešanými reaktormi vyznačujú vysokým štrihlostným pomerom ($H/D=7$ až 12 oproti $H/D=1$ až 2 pri klasických bioreaktoroch), definovaným prúdením kontinua (kvapalnej fázy) a dobrou distribúciou plynu i tuhej fázy v celom objeme náplne. To má za následok intenzívnejší prestup látky a vyšší nárast biomasy [2, 3].

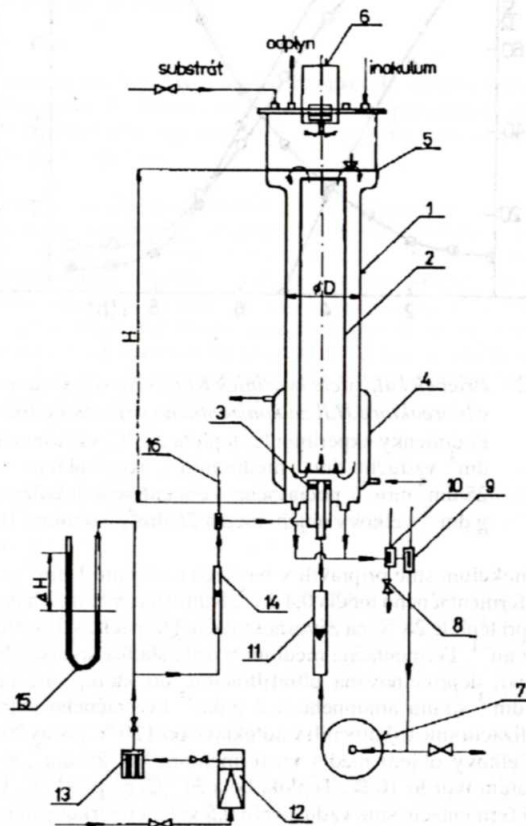
Cirkulačné bioreaktory nachádzajú vzhľadom na svoje prednosti čoraz väčšie uplatnenie vo výrobe nízkomolekulárnych mikrobiálnych metabolitov, pri produkcii proteínov pre potravinárske a krmovinárske účely, ako aj v aeróbnom biologickom čistení odpadných vôd.

Užívatelia zaujímajú porovnanie jednotlivých typov bioreaktorov. Dobrý prehľad v tomto smere publikovali Krebsler a kol. [3], ktorí porovnávali pomocou biotestu v poloprevádzkovom merítku (produkcia kvasiniek *Trichosporon cutaneum*) klasický kotlový bioreaktor s mechanickým miešaním - "stirred tank reactor" (STR) a tri typy cirkulačných bioreaktorov - cirkulačný reaktor s ponornou dýzou "jet loop reaktor" (JLR), cirkulačný reaktor s mechanickým miešadlom - "propeller loop reaktor" (PLR) a prstencový reaktor - "torus reaktor" (TR) z hľadiska špecifického príkonu P/V ($\text{kW} \cdot \text{m}^{-3}$), rýchlosti prestupu kyslíka OTR z bublín vzduchu do fermentačnej kvapaliny ($\text{kg O}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$), rýchlosti produkcie biomasy r_x ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) a najvyššieho prestupného parametra $E = OTR/(P/V)$, ktorý vyjadruje množstvo prestupného kyslíka vztiahnutého na jednotku spotrebovanej energie ($\text{kg O}_2 \cdot \text{kWh}^{-1}$). V tomto smere je výhodný najmä JLR, ktorý dáva najvyššiu hodnotu E , vyznačuje sa technologickou flexibilitou, pomerne jednoduchou konštrukciou a nie je veľmi náročný na údržbu. Je vhodný na kultivácie nevyžadujúce striktné aseptické podmienky, napr. na produkciu biomasy a na biologické čistenie odpadových vôd v stiesnených priestorových podmienkach.

Cieľom tejto práce bolo testovať cirkulačný bioreaktor typu JLR vyvinutý na Katedre chemických a potravinárskych strojov a zariadení (KCHPSZ) Strojníckej fakulty STU v Bratislave [5,6] v procese aeróbnej produkcie biomasy kvasiniek *Kluyveromyces marxianus* na sladkej srvátke. Tento proces je významný z hľadiska efektívneho využitia srvátky, ktorá je v súčasnosti v celosvetovom meradle značne problematická pre životné prostredie, alebo sa využíva málo efektívne, napr. ako zložka krmív. Pretože kvasinky *Kluyveromyces marxianus* sú významným mikrobiálnym zdrojom β -galaktozidázy, sledovali sme aj jej produkciu. β -galaktozidáza týchto kvasiniek je intracelulárny enzým používaný v mliekárstve na výrobu delaktovaného mlieka a mliečnych výrobkov [4].

MATERIÁL A METÓDY

Schéma použitého experimentálneho zariadenia je na obr. 1. Pozostáva z bioreaktora typu JLR o náplni 25 l. Zariadenie je v podstate rovnaké ako v [5 a 6], doplnené o rozbíjač pien.



Obr. 1 Schéma experimentálneho zariadenia:

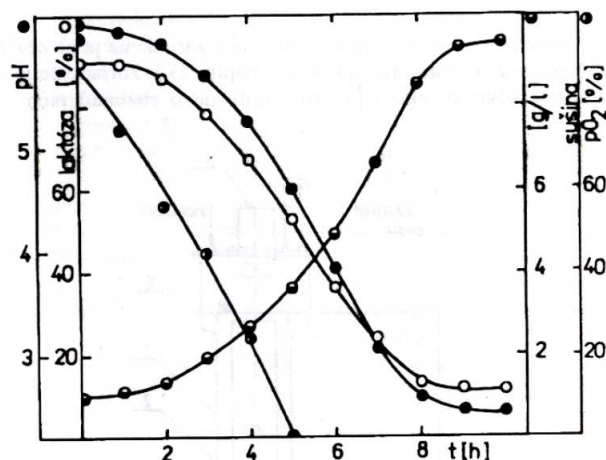
1-vonkajšia rúra, 2-cirkulačná rúra, 3-rozdeľovač vzduchu, 4-duplikátor, 5-odplyňovacia hlava, 6-rozbíjač pien, 7-čerpadlo, 8-vzorkovací ventil, 9-kyslíková sonda, 10-sklený teplomer, 11-rotameter, 12-redukčná stanica, 13-biofilter, 14-rotameter, 15-U-manometer, 16-sklený teplomer.

poháňaný elektromotorom PAL cez magnetickú spojku prevzatú z laboratorného bioreaktora LB 10 vyvinutého tiež na KCHPSZ, sklený duplikátor na teplotu náplne, rozšírenie hornej časti, vzorkovač, kyslíkovú sondu s analyzátorom rozpusteného kyslíka a o termostat na teplotu chladiacej (dohrievacej) vody do duplikátora. Zariadenie sme pred kultiváciou vysterylizovali etanolom.

V procese kultivácie sme sledovali:

- prietok recirkulovanej náplne rotametrom
- prietok sterilného vzduchu rotametrom,
- tlakovú diferenciu na prívide sterilného vzduchu U-manometrom,
- koncentráciu kyslíka vo fermentačnej kvapaline kyslíkovou sondou SOSP 51 A (Chemoprojekt Praha), signál bol vyhodnotený regulátorom kyslíka 4-44-0 (Vývojové dílny ČSAV Praha).

Na fermentáciu sme použili kmeň *Kluyveromyces marxianus* CCY 51-1-1. Kvasinky boli dlhodobo uschovávané na šikmou sladidlovom agare pod parafínom pri teplote 4 °C. Odtiaľ sme kultúru preočkovali na šikmý agar so zložením: laktóza 20 g.dm⁻³, kvasničný extrakt (Fluka, Švajčiarsko) 5 g.dm⁻³, agar (Oxoid, V.Británia) 2 g.dm⁻³.



Obr. 2 Pribeh kultivácie kvasiniek *Kluyveromyces marxianus* v bioreaktore JLR za konštantného prívodu kyslíka.

Podmienky experimentu: teplota 31 °C, vzdušenie 0,5 dm³ vzduchu.dm⁻³ média.min⁻¹, recirkulácia média 25 dm³.min⁻¹, počiatočná koncentrácia laktózy 34,5 g.dm⁻³, celkový objem média 25 dm³, inokulum 10 %.

Inokulum sme pripravili v bankách o objeme 1 dm³ s obsahom fermentačného média 0,4 dm³. Kultivácia v bankách prebiehala pri teplote 28 °C na závesnej rotačnej trepačke s frekvenciou 200 min⁻¹. Fermentačné médium tvorila sladká srvátka (Milex Senica), deproteinovaná ultrafiltráciou, do ktorej sme pridali 10 g.dm⁻³ síranu amónneho a 2 g.dm⁻³ kvasničného extraktu. Sterilizáciu sme uskutočnili v autokláve pri 120 °C počas 20 min.

Celkový objem média vo fermentore bol 25 dm³, z toho inokulum tvorilo 10 %. Teplota bola 31 °C, resp. 34 °C. Počas prvej fermentácie sme vzdušenie 0,5 vvm a recirkuláciu média 1 vvm udržiavali konštantné. Vzdušenie počas druhej fermentácie sme zvyšovali z 0,2 na 1,3 vvm, recirkuláciu média z 1,3 na 1,65 vvm.

Sušinu biomasy sme stanovili gravimetricky po predchádzajúcom odstredení buniek, premytí, rozsuspenderovaní v destilovanej vode a trojhodinovom sušení pri teplote 70 °C. Aktivitu β -galaktozidázy sme stanovovali v permeabilizovaných bunkách. Odstredené a premyté bunky sme rozsuspenderovali v 0,05 mol.dm⁻³ fosforečnanovom tlmivom roztoku (pH 6,5)

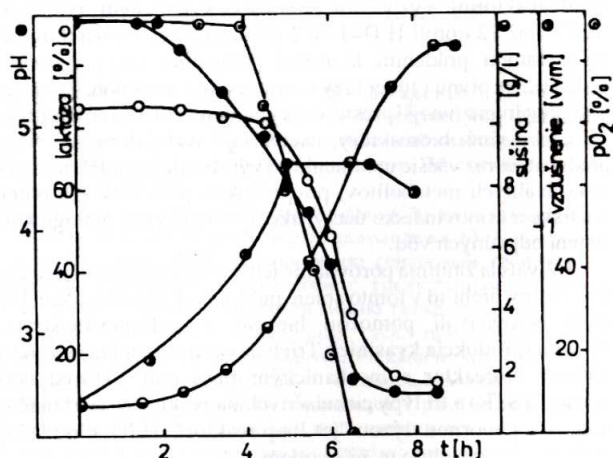
a permeabilizovali toluénom s výslednou koncentráciou 1 % pri laboratórnej teplote 20 min. Aktivitu enzýmu sme stanovili pomocou 2-nitrofenyl- β -D-galaktopyranozidu (2NPG, Lachema Brno). Reakčná zmes obsahovala 0,05 cm³ permeabilizovaných buniek, 0,45 cm³ 4 mmol.dm⁻³ 2NPG v spomínanom tlmivom roztoku s prídavkom 0,1 mmol.dm⁻³ MnCl₂. Reakciu sme po 4 min zastavili 0,2 mol.dm⁻³ roztokom Na₂CO₃. Uvoľnený 2-nitrofenol sme merali spektrofotometricky pri 416 nm [7].

Koncentráciu laktózy sme stanovovali metódou na stanovenie redukujúcich sacharidov pomocou kyseliny dinitrosalicyllovej [8].

Hodnoty pH v odoberaných vzorkách sme merali na pH-metri OP-211/1 (Radelkis, Maďarsko).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Fermentačnú produkciu biomasy *Kluyveromyces marxianus* v bioreaktore typu JLR sme sledovali za podmienok rôzneho vzdušenia, recirkulácie média a teploty. Na rozdiel od teploty, ktorá v rozsahu 31-34 °C málo vplyva na priebeh tejto kultivácie [4,9], množstvo spotrebovaného kyslíka regulovaného vzdušným a recirkuláciou média, malo podstatný vplyv na rast biomasy



Obr. 3 Pribeh kultivácie kvasiniek *Kluyveromyces marxianus* v bioreaktore JLR za vzrastajúceho prívodu kyslíka.

Podmienky pokusu: teplota 34 °C, vzdušenie 0,2-1,3 dm³ vzduchu.dm⁻³ média.min⁻¹, recirkulácia média 33 dm³.min⁻¹ do 4 h a 41 dm³.min⁻¹ po 4 h, počiatočná koncentrácia laktózy 34 g.dm⁻³, celkový objem média 25 dm³, inokulum 10 %.

a produkciu β -galaktozidázy. Priebeh fermentácie, v ktorej množstvo dodávaného kyslíka bolo udržiavané na konštantnej hladine, je znázornený na obr. 2. Koncentrácia kyslíka rozpusteného v médiu klesla po 4,5 h prakticky na nulovú hodnotu, čo spôsobilo limitáciu procesu kyslíkom. V porovnaní s výsledkami dosiahnutými v klasických fermentoroch, ktoré sú uvedené v tab. 1 [9], bola dosiahnutá vyššia špecifická rastová rýchlosť a výťažok biomasy, skrátenie procesu na 9 h, ale nižšia hladina β -galaktozidázy v bunkách. V ďalšej práci sme sa zamerali na zníženie limitácie procesu kyslíkom. Na obr. 3 je znázornený priebeh kultivácie, v ktorej sme postupne zvyšovali vzdušenie z 0,2 na 1,3 vvm a recirkuláciu biomasy z 1,3 na 1,65 vvm. Vysoké hodnoty recirkulácie média rezultujú z konštrukcie stredovej dýzy rozdeľovača, ktorá má podstatne vyšší priemer ako dýzy používané v iných konštrukciách. Limitácia kyslíkom nastala až po 6 h, pričom kultivácia bola ukončená prakticky už po 8 h. Z obr. 3 ako i tab. 1 vidieť, že týmto spôsobom kultivácie sme

Tab. 1 Porovnanie fermentačnej produkcie biomasy a β -galaktozidázy marxianus v rôznych typoch bioreaktorov za rôznych podmienok

Typ reaktora	Objem média [dm ³]	Doba kultivácie [h]	Teplota [°C]	Vzdušenie [vvm]	Koncentrácia biomasy [g.dm ⁻³]	Y _{XS} [-]	μ_{EXP} [h ⁻¹]	β -galaktozidáza [μkat.g ⁻¹]
JLR	25	8	34	0,2 - 1,3	12,46	0,354	0,322	1,47
JLR	25	9	31	0,5	9,50	0,261	0,283	2,71
LF-2	2,2	10	34	0,5	7,31	0,219	0,263	10,07
EFC 24	1000	12	31	0,2	8,69	0,211	0,214	12,63
EFC 24	1000	10	31	0,2*	7,40	0,252	0,251	8,67

+ bez limitácie kyslíkom - rýchlejšie otáčky miešadla

Laboratórny fermentor LF-2 (Vývojové dielne ČSAV Praha), poloprevádzkový (EFC 24L Electrolux, Švédsko) sú klasické miešané bioreaktory, Y_{XS} je výťažok biomasy zo substrátu, μ_{EXP} špecifická rastová rýchlosť v exponenciálnej fáze

dosiahli výrazné zvýšenie špecifickej rastovej rýchlosti a výťažku biomasy, skrátenie doby procesu, ale aj ďalšie zníženie špecifickej aktivity β -galaktozidázy v bunkách. Vykonané úspešné pokusy napovedajú, že JLR je vhodnejší na produkciu kvasničnej biomasy než fermentory klasické, ale menej vhodný z hľadiska produkcie β -galaktozidázy. Pravdepodobne je to zapríčinené lepším prestupom kyslíka v JLR, pretože lepší prestup kyslíka spôsobuje zvýšenie výťažku biomasy a pokles špecifickej aktivity β -galaktozidázy [10].

Bioreaktory typu JLR by mohli účinne prispieť k zavádzaniu biochemických technológií v nenáročných podmienkach poľnohospodárskych a potravinárskych podnikov pri spracovaní rozličných odpadov alebo vedľajších produktov ako sú srvátka, melasa, škrobnaté substráty. Môžu sa využiť predovšetkým pri výrobe mikrobiálnej biomasy pre ľudskú výživu, krmovinárske účely, na produkciu čistých kultúr mikroorganizmov. Taktiež sa dajú výhodne použiť na získavanie biomasy, hlavne kvasničnej, pre účely jej frakcionácie na rôzne bunkové komponenty, napr. bunkový extrakt, bunkové steny, intracelulárne enzýmy, polysacharidy, fosfolipidy, steroly, iné lipidické frakcie a ďalšie biochemikálie.

Chrišťel, L. - Mašura, S. - Vavřík, E. - Středanský, M. - Šturdík, E.: Cirkulačný bioreaktor typu JLR na produkciu kvasničnej biomasy. Kvas. prům., 39, 1993, č.1, s. 7 - 9

Článok zahŕňa výsledky fermentačných testov novovyvinutého cirkulačného bioreaktora s ponornou dýzou JLR o náplni 25 dm³. Výsledky pokusov zameraných na kultiváciu kvasiniek Kluyveromyces marxianus na srvátke ukazujú na vhodnosť jeho použitia v procesoch, kde je cieľom získať biomasu efektívnym spôsobom. Dosiahnutý výťažok biomasy na substrát bol 35,4 % a špecifická rastová rýchlosť v exponenciálnej fáze bola 0,322 h⁻¹.

Хриштель, Л. - Машура, С. - Ваврик, Е. - Стредянски, М. - Штурдик, Е.: Циркуляционный биореактор типа JLR для продукции дрожжевой биомассы. Квас. прум. 39, 1993, № 1, стр. 7 - 9.

Статья включает результаты ферментационных испытаний новоразработанного циркуляционного биореактора с погруженным соплом с насадкой 25 dm³. Результаты экспериментов, направленные на культивирование дрожжей Kluyveromyces marxianus на сыворотке показывают удобность его применения в процессах, целью которых является получение биомассы эффективным способом. Достиженный выход биомассы на субстрат составлял 35,4 % и удельная скорость роста в экспоненциальной фазе была 0,322 ч⁻¹.

Chrišťel, L. - Mašura, S. - Vavřík, E. - Středanský, M. - Šturdík, E.: Jet Loop Reactor (JLR) for Biomass Production. Kvas. prům. 39, 1993, No.1, pp 7 - 9

The results of cultivation tests performed in a plunging jet loop reactor with the working volume of 25 dm³ are described. The yeast Kluyveromyces marxianus were cultivated in whey. The biomass yield achieved was 35.4 % and the specific growth rate in the exponential phase was 0.322 h⁻¹.

Chrišťel, L. - Mašura, S. - Vavřík, E. - Středanský, M. - Šturdík, E.: Zirkulations-Bioreaktor von dem Typ JLR für die Produktion der Biomasse. Kvas. prům. 39, 1993, Nr.1, S. 7 - 9

Der Artikel behandelt die Ergebnisse der Fermentationsteste eines neuentwickelten Zirkulations-Bioreaktors mit der Eintauchdüse JLR mit einer Füllung von 25 dm³. Die Ergebnisse der Versuche, die auf die Kultivierung der Hefen Kluyveromyces marxianus auf Molke orientiert waren, zeigen die Eignung seiner Anwendung in Prozessen, wo das Ziel in der effektiven Biomasse-Gewinnung besteht. Die erzielte Biomasse-Ausbeute auf Substrat betrug 35,4 % und die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit in der exponentiellen Phase war 0,322 h⁻¹.

Literatúra

- [1] BLENKE, H.: Biotechnology, Vol.2 (Ed.H.J.Rehm and G.Reed), VCH Weinheim 1985, s.465
- [2] WIDMER, F.: Swiss Chem., 6, 1987, s.53
- [3] KREBSER, V., ADLER, I., FIECHTER, A.: Chemie-Ing. Tech., 59, 1987, s.514
- [4] FROST, G.M., MOSS, D.A.: Biotechnology, Vol.7A (Ed.H.J. Rehm and G.Reed), VCH Weinheim 1987, s.152
- [5] CHRIŠŤEL, L., VAVŘÍK, E., MAŠURA, S.: Čiastková správa výskumnej úlohy štátneho plánu VII-5-2/05 Sjf, SVŠT Bratislava 1988
- [6] CHRIŠŤEL, L., VAVŘÍK, E.: Potravinárske vedy, 7, 1989, s.65
- [7] CHAMPLUVIER, B., KOMP, B., ROUXHET, P.G.: Enzyme Microb. Technol., 10, 1988, s.611
- [8] BERNFELD, P.: Methods Enzymol. 1, 1955, s.149
- [9] STREĎANSKÝ, M. a kol.: Kvas. prům. 37, 1991, s. 137
- [10] GARCIA-GARIBAY, M. a kol. Biotechnol.Lett., 9, 1987, s.417

Lektoroval doc. Ing. Jan Páca, CSc.
Do redakcie došlo 15.5.1990