



## Wnikanie tlenu w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego w bioreaktorach STR o pojemności 7 i 15 000 dm<sup>3</sup>

Waldemar Podgórski, Władysław Leśniak

Katedra Biotechnologii Żywności, Instytut Chemii i Technologii Żywności, Akademia Ekonomiczna, Wrocław

### Oxygen transfer during citric acid biosynthesis in 7 and 15 000 liters stirred tank reactors

#### Summary

In laboratory scale, submerged citric acid fermentation enabled to obtain similar to the industrial bioreactor volumetric oxygen transfer rate ( $k_L a$ ) amounted to 240 h<sup>-1</sup>. Nevertheless, such level of  $k_L a$  seems not to be necessary for the process. Bioreactors used for the production of citric acid using *Aspergillus niger* W78B strain, assuring  $k_L a$  at the 120 h<sup>-1</sup> level in an overproduction phase, allowed achieving the oxygen uptake rate by cells in the range 12-15 mmol dm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> and a product on substrate yield factor ( $Y_{p/s}$ ) higher then 0.8 g g<sup>-1</sup>. Thus, the resignation from the widespread in literature strategy of pO<sub>2</sub> maximization as an essential prerequisite for high citric acid yield, allowed obtaining the significant 20% improvement in the yield of product formation in the case of molasses media and 7% on synthetic one. Therefore, it can be stated that excessive media aeration during submerged citric acid biosynthesis is not suitable for yield and/or cost of product formation.

#### Key words:

citric acid, biosynthesis, *Aspergillus niger*, volumetric oxygen transfer rate, laboratory and industrial bioreactors.

## 1. Wprowadzenie

Natlenianie podłoży hodowlanych w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego metodą wgłębną z udziałem grzybów strzępkowych jest zagadnieniem istotnym, decydującym o efektywności

#### Adres do korespondencji

Waldemar Podgórski,  
Katedra Biotechnologii  
Żywności,  
Instytut Chemii  
i Technologii Żywności,  
Akademia Ekonomiczna,  
ul. Komandorska 118/120,  
53-345 Wrocław;  
e-mail:  
waldemar.podgorski@ae.  
wroc.pl

tego procesu (1-5). Niedostateczna aeracja, lub nawet chwilowe przerwy w napowietrzaniu, negatywnie wpływają na wzrost grzybni i powodują obniżenie jej aktywności kwasotwórczej (1). Uważa się także, że ograniczona szybkość wnikania tlenu jest czynnikiem ograniczającym szybkość i wydajność nadprodukcji kwasu cytrynowego (2,3,6). Z tego też powodu, wzrost rozpuszczalności tlenu i szybkość jego przyswajania przez drobnoustroje są często utożsamiane ze wzrostem efektywności tego procesu (2,7).

Hodowla grzybów strzępkowych metodą wglębną nie jest zgodna z naturą ich rozwoju, obserwowanego w warunkach naturalnych. Zatem utrzymanie określonego nadmiaru tlenu w środowisku hodowlanym jest czynnikiem istotnym także z punktu widzenia efektywności biosyntezy kwasu cytrynowego. Dotyczy to zwłaszcza produkcyjnych szczepów *Aspergillus niger* charakteryzujących się szczególną wrażliwością na zmiany zawartości tlenu w podłożu. Nawet krótki czas ekspozycji kultury *Aspergillus niger* na zmniejszone stężenie tlenu rozpuszczonego, może spowodować nieodwracalne zmiany w szybkości jego przyswajania, wpływając na spadek efektywności nadprodukcji kwasu cytrynowego przy utrzymaniu dotychczasowego tempa wzrostu biomasy (2). Przyczyn obniżenia aktywności kwasotwórczej upatruje się w nieodwracalnej dezaktywacji przemian alternatywnego łańcucha oddechowego *Aspergillus niger* odpowiedzialnego za nadprodukcję cytrynianu, przejawiającego szczególną wrażliwość na wahania w stężeniu tlenu rozpuszczonego (2,8).

Nie wszystkie doniesienia literaturowe są zgodne z tymi tezami (9). W otrzymanych wynikach badań (10) dokumentuje się, że maksymalizacja stężenia tlenu rozpuszczonego w podłożach definiowanych prowadzi do nieefektywnego wzrostu zużycia powietrza, a co za tym idzie, wzrostu bezpośrednich kosztów produkcyjnych. W podłożach melasowych natomiast, wysokie natlenianie środowiska może być szkodliwe niosąc w efekcie znaczne obniżenie wydajności substratowej procesu (11). Badania te dają podstawę do weryfikacji wysokich wymagań dotyczących zdolności aeracyjnej bioreaktorów stosowanych w przemysłowej produkcji kwasu cytrynowego, których konstrukcja, jak się uważa, limitując szybkość wnikania tlenu ogranicza wydajność i produktywność fermentacji. O przesadnej trosce o szybkość wnikania tlenu w omawianych procesach świadczą także wcześniejsze prace autorów (12) donoszące o pozytywnych efektach zastosowania reaktorów typu *air-lift* o pojemności 26 m<sup>3</sup> do przemysłowej produkcji kwasu cytrynowego z udziałem strzępkowej formy grzybni *Aspergillus niger*, a zatem w warunkach dużej lepkości płynu hodowlanego.

Celem pracy było wykazanie niecelowości maksymalizacji wartości objętościowego współczynnika wnikania tlenu w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego w podłożach definiowanych, a zwłaszcza w podłożach kompleksowych z melasą oraz określenie wartości  $k_L a$  i szybkości wnikania tlenu jakim powinien charakteryzować się ten proces zapewniając wysoką – na tle wyników literaturowych – wydajność kwasu cytrynowego.

## 2. Metodyka

### 2.1. Bioreaktory

W badaniach laboratoryjnych stosowano bioreaktor zbiornikowy z mieszadłem (STR) Biomer 10 o pojemności całkowitej 7 dm<sup>3</sup> (13). W próbach w skali technicznej stosowano bioreaktor typu STR o pojemności 15 000 dm<sup>3</sup>. Próby te przeprowadzono w jednostce pilotowej OPOK w Leopoldowie na Słowacji w ramach współpracy naukowej Katedry Biotechnologii Żywności Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu z Instytutem Naukowym LIKO w Bratysławie. Charakterystykę bioreaktorów przedstawiono w tabeli.

Tabela

Charakterystyka bioreaktorów stosowanych w badaniach

Objętość całkowita	Objętość robocza	Wysokość	Średnica	Stosunek wysokości do szerokości	Średnica mieszadła	Typ mieszadła	Liczba mieszadeł	Moc silnika	N	Rodzaj napędu
dm <sup>3</sup>	%	cm	cm	–	cm	–	szt.	KW	1/min	–
7	71	40	19	2,1	7,4	Rushton	3	0,18	200-800	górny
15 000	80	560	200	2,8	120	Rushton	3	30,50	20-120	górny

### 2.2. Mikroorganizmy

W badaniach stosowano szczep *Aspergillus niger* W78B pochodzący z kolekcji Katedry Biotechnologii Żywności Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu.

Podłoża hodowlane po ich sterylizacji i ochłodzeniu do temperatury niższej od 36°C, szczepiono bezpośrednio zawiesiną konidiów w sterylnym roztworze (1:10 000) Tweenu 80 w takiej ilości, by ich koncentracja wyniosła 1·10<sup>5</sup> cm<sup>-3</sup>. Ilość zarodników oznaczano metodą bezpośrednią w komorze Thoma.

#### 2.2.1. Podłoże kompleksowe z melasą trzcinową

Melasę trzcinową rozcieńczono wodą wodociągową do 13% stężenia cukrów oznaczonych po hydrolizie kwasowej jako substancje redukujące. Do rozcieńczonej melasy dodawano: heksacyanożelazian (II) potasu (K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O) – 1,0 g dm<sup>-3</sup>, dwuwodorofosforan potasu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) – 0,2 g dm<sup>-3</sup> oraz metanol (CH<sub>3</sub>OH) po sterylizacji podłoża w ilości 2% objętości. Nie stosowano korekcji wartości pH podłoża.

### 2.2.2. Podłoże definiowane z cukrem białym

Stosowano podłoże definiowane o składzie: cukier biały 130 g, azotan amonu ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) – 2  $\text{g}/\text{dm}^3$ , dwuwodorofosforan potasu ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) – 0,2  $\text{g}/\text{dm}^3$ , siarczan magnezu ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) – 0,2  $\text{g}/\text{dm}^3$ , woda wodociągowa do objętości 1  $\text{dm}^3$ . Do ustalenia  $\text{pH} = 2,7$  stosowano 5n kwas solny (HCl). Podłoża sterylizowano w temperaturze 121°C przez 30 minut.

## 2.3. Metody analityczne

### 2.3.1. Stężenie biomasy

Płyn hodowlany w ilości 25  $\text{cm}^3$  poddawano filtracji próżniowej. Biomase przeplukiwano wodą destylowaną do zaniku odczynu kwaśnego i suszono w temperaturze 105°C przez 24 godziny.

### 2.3.2. Stężenie kwasu cytrynowego

Stężenie kwasu cytrynowego oznaczano metodą kapilarnej izotachoforezy (14) oraz metodą pirydynową według Saffrana i Denstedta z modyfikacjami (15).

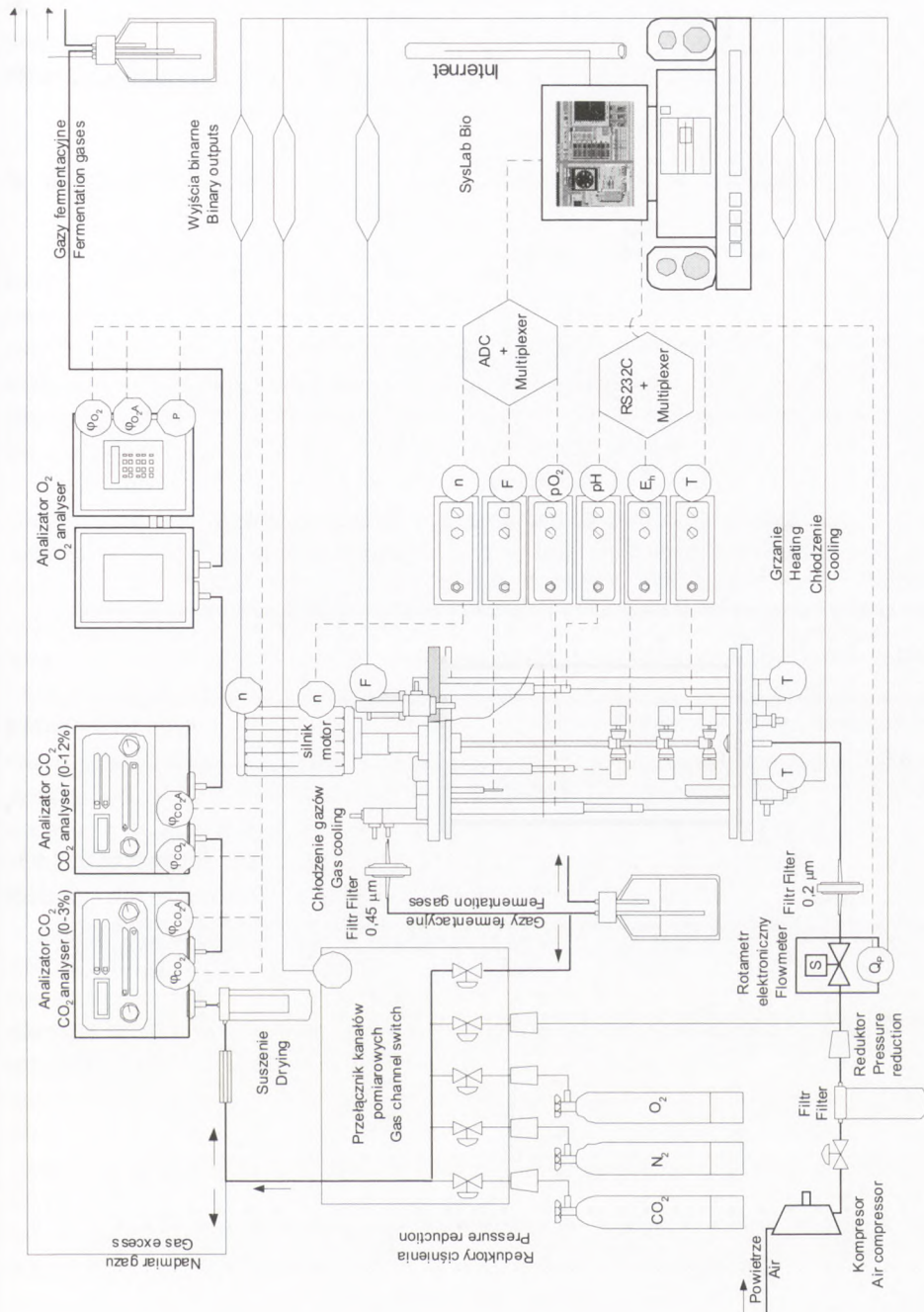
### 2.3.3. Pomiary ciągłe

Parametry  $\text{pO}_2$ ,  $\text{QO}_2$  i  $k_L a$  mierzone były w sposób ciągły przez system komputerowego sterowania procesami biotechnologicznymi *SysLab Bio* (16) wyposażony m.in. w następujące urządzenia (rys. 1):

1. Regulator BioReg  $\text{pO}_2$  kontroler (KBŻ AE, Wrocław) z elektrodą membranową TU-4 (TelEko, Wrocław), mierzący w sposób ciągły stężenie względne tlenu rozpuszczonego ( $\text{pO}_2$ ),

2. Paramagnetyczny analizator tlenu Servomex 1100A (Servomex International Ltd, Crowborough, East Sussex, Wielka Brytania), mierzący w sposób ciągły udział tlenu: w gazie natleniającym ( $\varphi_{\text{O}_2\text{A}}$ ) i w gazach fermentacyjnych ( $\varphi_{\text{O}_2}$ ) oraz ciśnienie atmosferyczne  $\text{P}_{\text{bar}}$ .

3. Analizator Guardian II  $\text{CO}_2$  Monitor (Edinburg Sensors Ltd Edinburgh, Szkocja), mierzący w sposób ciągły udział dwutlenku węgla: w gazie natleniającym ( $\varphi_{\text{CO}_2\text{A}}$ ) i w gazach fermentacyjnych ( $\varphi_{\text{CO}_2}$ ) w zakresie 0-3%,



Rys. 1. Schemat laboratoryjnej stacji badawczej.

4. Analizator Gascard Monitor (Edinburg Sensors Ltd Edinburgh, Szkocja), mierzący w sposób ciągły udział dwutlenku węgla: w gazie natleniającym ( $\varphi_{\text{CO}_2\text{A}}$ ) i w gazach fermentacyjnych ( $\varphi_{\text{CO}_2}$ ) w zakresie 3-12%.

5. Regulator poziomu piany RPP (KBŻ AE, Wrocław) do pomiaru i regulacji poziomu piany (F).

Objętościową szybkość przyswajania tlenu ( $Q_{\text{O}_2}$ ) obliczano z równania:

$$Q_{\text{O}_2} = \frac{Q_A}{c_m} \left[ \varphi_{\text{O}_2\text{A}} - \varphi_{\text{O}_2} \left( \frac{1 - \varphi_{\text{O}_2\text{A}} - \varphi_{\text{CO}_2\text{A}}}{1 - \varphi_{\text{O}_2} - \varphi_{\text{CO}_2}} \right) \right]$$

$c_m$  – objętość molowa gazu natleniającego ( $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ),

$Q_A$  – objętościowa szybkość napowietrzania ( $\text{dm}^3 \text{ dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ),

$Q_{\text{O}_2}$  – objętościowa szybkość przyswajania tlenu ( $\text{mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ),

$\varphi_{\text{CO}_2}$  – udział objętościowy dwutlenku węgla w gazach fermentacyjnych,

$\varphi_{\text{CO}_2\text{A}}$  – udział objętościowy dwutlenku węgla w gazie natleniającym,

$\varphi_{\text{O}_2}$  – udział objętościowy tlenu w gazach fermentacyjnych,

$\varphi_{\text{O}_2\text{A}}$  – udział objętościowy tlenu w gazie natleniającym.

#### 2.3.4. Objętościowy współczynnik wnikania tlenu

Objętościowy współczynnik wnikania tlenu ( $k_L a$ ) oznaczano metodą bilansową w oparciu na równaniu:

$$\frac{dc}{dt} = k_L a (c_s - c_t) Q_{\text{O}_2}$$

gdzie :

$dc/dt$  – zmiany stężenia tlenu rozpuszczonego w fazie ciekłej ( $dc$ ) w czasie ( $dt$ ),

$c_s$  – stężenie tlenu rozpuszczonego w fazie ciekłej, równowagowe względem ciśnienia cząstkowego tlenu w fazie gazowej ( $\text{g dm}^{-3}$ ),

$c_t$  – stężenie tlenu rozpuszczonego w fazie ciekłej w czasie ( $t$ ) ( $\text{g dm}^{-3}$ ).

Zakładając, że w czasie procesu istnieje równowaga między szybkością zużywania tlenu a szybkością jego przenikania z pęcherzyków powietrza do fazy ciekłej, to:

$$\frac{dc}{dt} = 0$$

stąd

$$k_L a = \frac{Q_{\text{O}_2} \cdot 32}{c_s - c_t}$$

$k_L a$  – objętościowy współczynnik wnikania tlenu,  $\text{h}^{-1}$ ,

$Q_{\text{O}_2}$  – szybkość przyswajania tlenu,  $\text{mol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ,

32 – przelicznik udziału molowego na masowy.

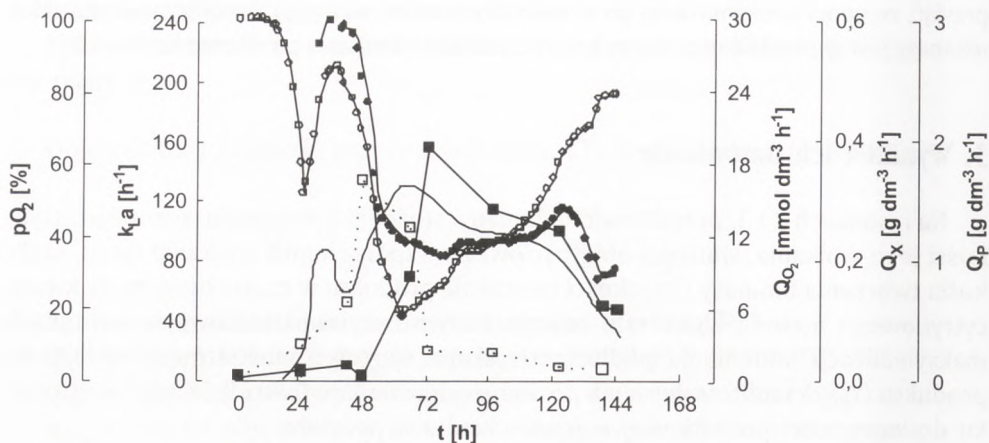
Współczynnik  $k_{L,a}$  w tym równaniu jest w zasadzie współczynnikiem przenikania masy. Z uwagi jednak na słabą rozpuszczalność tlenu w podłożu fermentacyjnym można przyjąć, że opory wnikania tlenu po stronie fazy gazowej są małe i współczynnik przenikania masy jest w przybliżeniu równy współczynnikowi wnikania po stronie fazy ciekłej.

### 3. Wyniki i ich omówienie

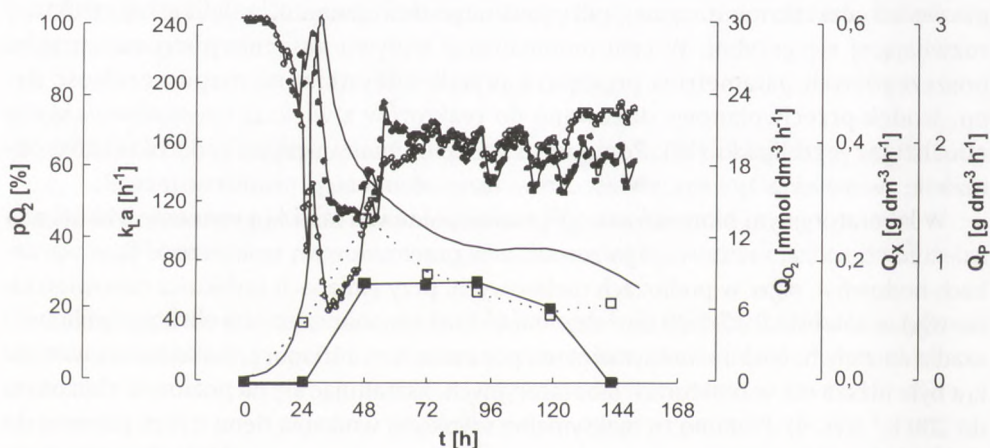
Na rysunkach 2 i 3, przedstawiono zmiany: stężenia tlenu rozpuszczonego, szybkości jego wnikania, wartości objętościowego współczynnika wnikania tlenu, szybkości tworzenia biomasy i szybkości tworzenia produktu w czasie biosyntezy kwasu cytrynowego metodą węgelną z cukrem białym i melasą trzcinową w warunkach maksymalizacji natlenienia podłoża. Uzyskane wartości substratowej wydajności produktu ( $Y_{P/S}$ ) kształtowały się na poziomie odpowiednio 0,80 i 0,58 g g<sup>-1</sup> w stosunku do zawartości początkowej węglowodanów w pożywce.

Intensywne natlenianie hodowli zapewniało w początkowej fazie procesu stosunkowo łatwe utrzymanie stężenia tlenu rozpuszczonego na wysokim poziomie co wynikało ze stosunkowo małej zawartości grzybni w podłożu. Przyrost stężenia biomasy powodował jednak wzrost lepkości płynu hodowlanego (17) i wzrost szybkości przyswajania tlenu ( $Q_{O_2}$ ) zwiększając w konsekwencji trudności utrzymania wysokiego stężenia  $pO_2$ . Duża szybkość napowietrzania ( $Q_A = 0,20-0,25 \text{ dm}^3 \text{ dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) i częstość obrotów mieszadła ( $n = 700 \text{ min}^{-1}$ ) były przyczyną wzmożonego pienienia się brzezki fermentacyjnej, potęgowanego defragmentacją delikatnej struktury rozwijającej się grzybni. W celu minimalizacji wpływu gaszenia piany na wartości poszczególnych parametrów procesu, a przede wszystkim na rozpuszczalność tlenu, środek przeciw pianowy dozowano do reaktorów z większą częstotliwością minimalizując jego dawki (18). Pomimo to gaszenie piany wpływało na okresowe obniżanie wartości  $pO_2$  i  $k_{L,a}$  zwłaszcza w fazie akumulacji produktu (rys. 3).

W laboratoryjnym bioreaktorze STR maksymalne wartości  $k_{L,a}$  wyniosły 240 h<sup>-1</sup> niezależnie od rodzaju stosowanego surowca. W przemysłowym reaktorze STR, w warunkach hodowli *A. niger* w podłożach melasowych, przy zmianach szybkości napowietrzania ( $Q_A$ ) w zakresie 0,15-0,20 dm<sup>3</sup> dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup> i utrzymaniu częstości obrotów wału mieszadła na stałym, bliskim maksymalnemu poziomowi  $n = 110 \text{ min}^{-1}$ , maksymalna wartość  $k_{L,a}$  była niższa niż w reaktorach laboratoryjnych, kształtując się na poziomie zbliżonym do 200 h<sup>-1</sup> (rys. 4). Pomimo to maksymalne szybkości wnikania tlenu z fazy gazowej do ciekłej były w obu typach reaktorów podobne ( $Q_{O_2} \approx 30 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ). Przyczyną niższych wartości maksymalnych, objętościowego współczynnika wnikania tlenu w reaktorze przemysłowym mogły być ograniczenia wzrostu szybkości napowietrzania hodowli ( $Q_A$ ) wskutek intensywnego pienienia się brzezki fermentacyjnej, stwarzające niebezpieczeństwo wydostania się zawartości reaktora na zewnątrz. Uzyskane wartości  $k_{L,a}$  były jednak zbliżone do wartości otrzymywanych w podłożach definiowanych z cukrem białym, w fermentorach przemysłowych o pojemności 50 i 150 m<sup>3</sup> (19).

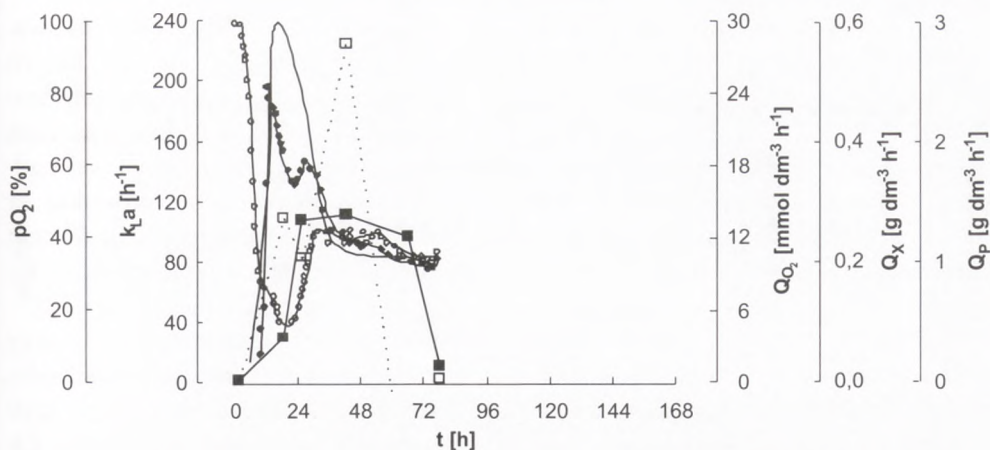


Rys. 2. Kształtowanie się stężenia tlenu rozpuszczonego (O), objętościowego współczynnika wnikania tlenu (●), szybkości wnikania tlenu (—), szybkości tworzenia biomasy (□) i szybkości tworzenia produktu (■) w czasie biosyntezy kwasu cytrynowego metodą wglębną z cukrem białym w skali laboratoryjnej w warunkach maksymalizacji natleniania. ( $Q_A = 0,20-0,25 \text{ dm}^3 \text{ dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $n = 700 \text{ min}^{-1}$ ).



Rys. 3. Kształtowanie się stężenia tlenu rozpuszczonego (O), objętościowego współczynnika wnikania tlenu (●), szybkości wnikania tlenu (—) szybkości tworzenia biomasy (□) i szybkości tworzenia produktu (■) w czasie biosyntezy kwasu cytrynowego metodą wglębną z melasą trzcinową w skali laboratoryjnej w warunkach maksymalizacji natleniania. ( $Q_A = 0,20-0,25 \text{ dm}^3 \text{ dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $n = 700 \text{ min}^{-1}$ ).





Rys. 4. Kształtowanie się stężenia tlenu rozpuszczonego (○), objętościowego współczynnika wnikania tlenu (●), szybkości wnikania tlenu (—), szybkości tworzenia biomasy (□) i szybkości tworzenia produktu (■) w czasie biosyntezy kwasu cytrynowego metodą węglaną z melasą trzcinową w skali przemysłowej w warunkach maksymalizacji natleniania. ( $Q_A = 0,15-0,20$ ,  $n = 110 \text{ min}^{-1}$ ).

Wraz z zaawansowaniem procesu fermentacji, wartości  $k_{L,a}$  malały, stabilizując się w przypadku podłoży definiowanych na poziomie  $100 \text{ h}^{-1}$ . W podłożach melasowych, wartość współczynnika  $k_{L,a}$  stopniowo obniżała się osiągając na koniec procesu wartość  $140 \text{ h}^{-1}$ . W bioreaktorze przemysłowym utrzymanie podobnie wysokich wartości  $k_{L,a}$  nie było możliwe (rys. 4).

Abstrahując od rodzaju zastosowanego surowca, wyższą wydajność kwasu cytrynowego uzyskano w hodowli charakteryzującej się gorszymi warunkami tlenowymi środowiska. W fermentacji o wyższej wydajności ( $Y_{P/S} = 0,80 \text{ g g}^{-1}$ ), stężenie tlenu rozpuszczonego rosło w fazie akumulacji kwasu cytrynowego z 16% osiągając na koniec procesu wartość 70% stanu nasycenia brzezki tlenem, przy wartościach  $k_{L,a}$  rzędu  $100 \text{ h}^{-1}$  (rys. 2). Niższą wydajność produktu ( $Y_{P/S} = 0,58 \text{ g g}^{-1}$ ) uzyskano natomiast przy stałych, wysokich wartościach:  $pO_2 \approx 70\%$  i  $k_{L,a} \approx 160 \text{ h}^{-1}$  (rys. 3). Odnotowano ponadto duże różnice w szybkościach wnikania tlenu oraz ilości tlenu przyswojonego przez grzybnię w trakcie obu rozpatrywanych procesów. Wyniosły one odpowiednio 16 i  $30 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$  oraz 1387 i  $1720 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

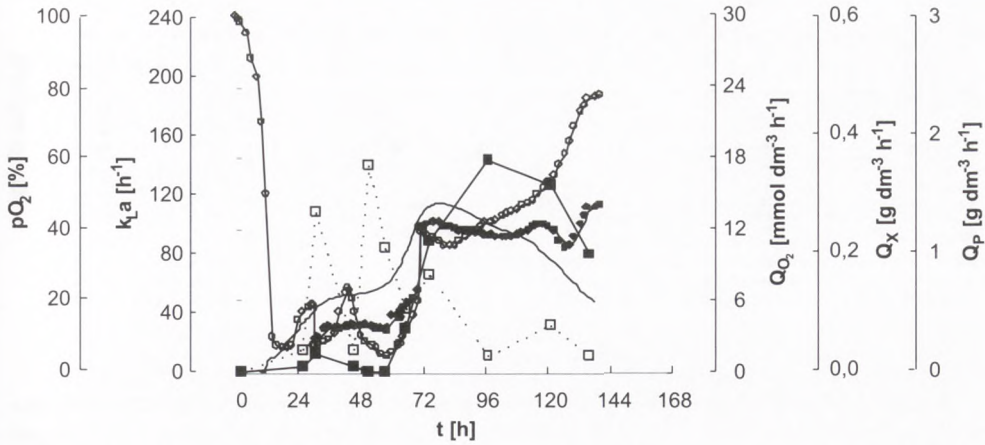
Jedną z przyczyn niższej wydajności kwasu cytrynowego w fermentacji w podłożu melasowym była wyższa szybkość tworzenia biomasy ( $Q_X$ ), co ograniczało ilość substratu mogącego ulec konwersji do kwasu cytrynowego. Wysokie natlenianie sprzyjało zatem w warunkach Nielimitowanego składu podłoża melasowego, wzrostowi biomasy kosztem jej aktywności kwasotwórczej, co zaowocowało mniejszą szybkością tworzenia produktu (rys. 3). Potwierdzeniem tej tezy mogą być wyniki badań przedstawione na rysunku 6, w których wyższe wartości  $Q_P$  otrzymano w warunkach limitowanego natleniania środowiska przy zastosowaniu tego samego rodzaju substratu.

Przeprowadzone doświadczenia charakteryzują się odmiennością obserwowanych zależności w stosunku do wniosków prezentowanych w doniesieniach innych autorów sugerujących wprost proporcjonalną korelację pomiędzy natlenianiem środowiska i wydajnością biosyntezy kwasu cytrynowego (2,5,20). Autorzy ci twierdzą że intensywność natleniania podłoży hodowlanych decyduje o efektywności nadprodukcji kwasu cytrynowego, a czynnikiem limitującym tworzenie produktu są ograniczenia w szybkości wnikania tlenu do komórek *Aspergillus niger* (2,20). W celu otrzymania wysokich wydajności kwasu cytrynowego niezbędne jest zatem, utrzymanie w czasie procesu jak najwyższego stężenia tlenu rozpuszczonego (2,21-22).

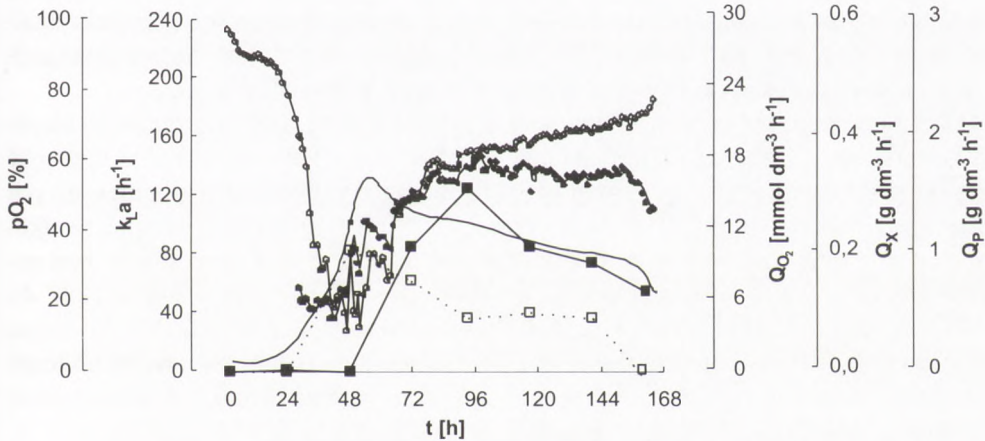
Zależności te, jak się wydaje, nie są jednak tak oczywiste i uniwersalne. Autorzy (23) udowodnili, że transport tlenu z fazy gazowej do komórek drobnoustrojów może zachodzić także w warunkach zerowego stężenia tlenu rozpuszczonego, czyli w warunkach transportu tlenu do komórek grzybni z pominięciem fazy ciekłej. Zatem, szeroko rozpowszechniona w literaturze praktyka charakteryzowania natleniania hodowli metodą wgłębną poprzez prezentację wartości  $pO_2$  lub wartości parametrów  $Q_A$  i  $n$  jest w gruncie rzeczy niewystarczająca. Nie zawsze też, wyższe natlenianie, czy stężenie tlenu rozpuszczonego w podłożu hodowlanym prowadzi do poprawy efektywności fermentacji (11). Sygnały o negatywnym wpływie intensywnej aeracji środowiska na proces biosyntezy kwasu cytrynowego płyną także z doniesień niektórych innych autorów (23-25). Autorzy (26) sugerują, że przyczyną negatywnego oddziaływania wyższej szybkości napowietrzania na aktywność kwasotwórczą *Aspergillus niger* jest nadmierne usuwanie dwutlenku węgla z podłoża, ulegającego wiązaniu w procesie formowania cytrynianu. Intensywne natlenianie może być też przyczyną wzmożonej syntezy niepożądanych metabolitów pierwotnych, zwłaszcza kwasu glukonowego (11) lub wręcz utraty zdolności kwasotwórczej drobnoustrojów na skutek zbyt dużej szybkości wzrostu biomasy w początkowym stadium hodowli (rys. 4).

Na rysunkach 5 i 6 przedstawiono zmiany wartości stężenia tlenu rozpuszczonego, objętościowego współczynnika wnikania tlenu i szybkości wnikania tlenu w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego w podłożach z cukrem białym i z melasą trzcinową, prowadzonych w warunkach obniżonej intensywności natleniania. Uzyskane wydajności ( $Y_{P/S}$ ) ukształtowały się na poziome odpowiednio 0,87 i 0,80 g g<sup>-1</sup> liczonej w stosunku do zawartości początkowej węglowodanów w podłożu. Wyniki te były zatem lepsze odpowiednio o 0,07 g g<sup>-1</sup> (7%) przy stosowaniu podłoży definiowanych i o 0,22 g g<sup>-1</sup> (22%) w przypadku podłoży melasowych w stosunku do fermentacji, w których podstawą regulacji natleniania była jej maksymalizacja.

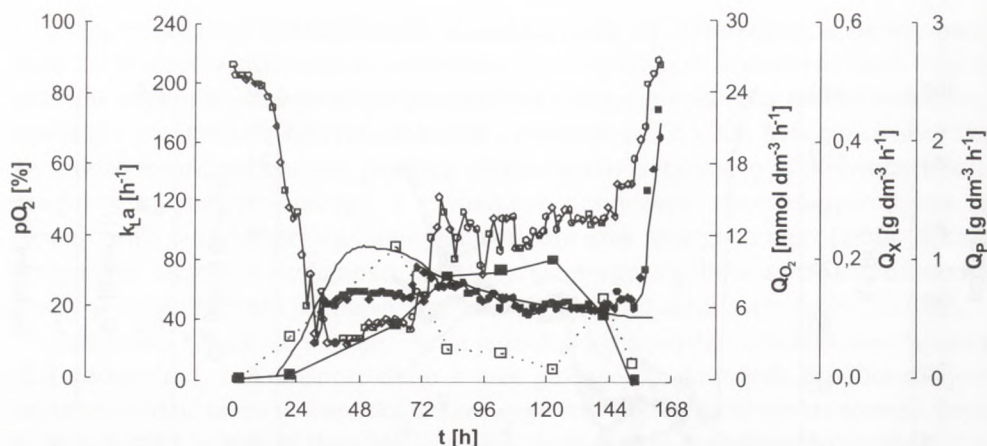
Istotą sterowania natlenianiem środowiska w czasie tych procesów było ograniczenie szybkości wnikania tlenu w pierwszej fazie hodowli poprzez stosowanie niskich wartości  $Q_A$  (0,02-0,04 dm<sup>3</sup> dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>) i  $n$  (300 min<sup>-1</sup>) oraz stopniowy wzrost wartości tych parametrów ( $Q_A = 0,02-0,10$  dm<sup>3</sup> dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>,  $n = 300-600$  min<sup>-1</sup>) w fazie drugiej procesu przyczyniający się w ten sposób do intensyfikacji szybkości nadprodukcji kwasu cytrynowego. W hodowlach prowadzonych w bioreaktorach labo-



Rys. 5. Kształtowanie się stężenia tlenu rozpuszczonego (O), objętościowego współczynnika wnikania tlenu (●), szybkości wnikania tlenu (—), szybkości tworzenia biomasy (□) i szybkości tworzenia produktu (■) w czasie biosyntezy kwasu cytrynowego metodą wgłębną z cukrem białym w skali laboratoryjnej w warunkach umiarkowanego natleniania. ( $Q_A = 0,02-0,10 \text{ dm}^3 \text{ dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $n = 300-600 \text{ min}^{-1}$ ).



Rys. 6. Kształtowanie się stężenia tlenu rozpuszczonego (O), objętościowego współczynnika wnikania tlenu (●), szybkości wnikania tlenu (—), szybkości tworzenia biomasy (□) i szybkości tworzenia produktu (■) w czasie biosyntezy kwasu cytrynowego metodą wgłębną z melasą trzcinową w skali laboratoryjnej w warunkach umiarkowanego natleniania. ( $Q_A = 0,02-0,10 \text{ dm}^3 \text{ dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $n = 300-600 \text{ min}^{-1}$ ).



Rys. 7. Kształtowanie się stężenia tlenu rozpuszczonego (O), objętościowego współczynnika wnikańia tlenu (●), szybkości wnikańia tlenu (—), szybkości tworzenia biomasy (□) i szybkości tworzenia produktu (■) w czasie biosyntezy kwasu cytrynowego metodą wgłębną z melasą trzcinową w skali przemysłowej w warunkach umiarkowanego natleniania. ( $Q_A = 0,02-0,10$ ,  $n = 40-80 \text{ min}^{-1}$ ).

ratoryjnych maksymalne wartości  $k_{L,a}$  uległy obniżeniu w stosunku do wariantu z maksymalizacją natleniania z  $240 \text{ h}^{-1}$  do około  $120 \text{ h}^{-1}$  w przypadku podłoży definiowanych i do około  $140 \text{ h}^{-1}$  w fermentacji w podłożach melasowych. Modyfikacji uległ także czas osiągnięcia maksymalnych wartości tego współczynnika przemieszczając się z fazy początkowej intensywnego wzrostu grzybni do fazy intensywnej akumulacji kwasu cytrynowego. W bioreaktorze przemysłowym (rys. 7), maksymalne wartości współczynnika  $k_{L,a}$  były jeszcze niższe, kształtując się na poziomie  $75 \text{ h}^{-1}$  zapewniając wydajność kwasu cytrynowego ( $Y_{P/S} = 0,75 \text{ g g}^{-1}$ ).

Zmniejszenie intensywności natleniania podłoży przyczyniło się także do około 50% redukcji szczytowego zapotrzebowania hodowli na tlen. Maksymalna szybkość przyswajania tlenu przez drobnoustroje w fermentacji w podłożach kompleksowych zmalała bowiem z około  $30$  do  $12-15 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ . Porównując natomiast całkowitą ilość tlenu przyswojonego przez grzybnię w trakcie obu procesów w hodowlach laboratoryjnych, stwierdzono, że zmalały one odpowiednio o 24% (z  $1387$  do  $1047 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) w przypadku procesu prowadzonego w podłożu definiowanym i o 23% (z  $1720$  do  $1325 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) w hodowlach z udziałem melasy. W hodowli w skali przemysłowej ilość przyswojonego tlenu w fermentacji z wydajnością  $0,75 \text{ g g}^{-1}$  wyniosła  $1075 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

#### 4. Wnioski

1. Wysoka efektywność nadprodukcji kwasu cytrynowego z udziałem *Aspergillus niger* wymaga rezygnacji ze strategii maksymalizacji stężenia tlenu rozpuszczonego

w podłożu na korzyść dostosowania szybkości wnikania tlenu do fazy rozwoju hodowanych drobnoustrojów.

2. Zbyt wysokie natlenianie środowiska w czasie biosyntezy kwasu cytrynowego metodą wglębną obniża wydajność tego procesu i zwiększa zużycie energii na napowietrzanie.

– Obniżenie intensywności natleniania hodowli *Aspergillus niger* W78B w podłożu definiowanym z cukrem białym wpłynęło na wzrost wydajności kwasu cytrynowego  $Y_{P/S}$  o około 7% w stosunku do procesów, w których podstawą regulacji natleniania była jej maksymalizacja.

– Obniżenie intensywności natleniania hodowli *Aspergillus niger* W78B w podłożu kompleksowym z melasą wpłynęło na wzrost wydajności  $Y_{P/S}$  o około 20% w stosunku do procesów, w których podstawą regulacji natleniania była jej maksymalizacja.

3. Z przeprowadzonych badań wynika, że w laboratoryjnych reaktorach STR możliwe jest uzyskanie wartości objętościowego współczynnika wnikania tlenu ( $k_{L,a}$ ) na poziomie zbliżonym do wartości charakterystycznych dla skali technicznej ( $240 \text{ h}^{-1}$ ).

4. Stwierdzono, że bioreaktory charakteryzujące się wartością współczynnika  $k_{L,a}$  w zakresie  $120\text{-}140 \text{ h}^{-1}$  zapewniają szybkość wnikania tlenu w fazie akumulacji kwasu cytrynowego w zakresie  $12\text{-}15 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , pozwalając na uzyskanie wydajności kwasu cytrynowego  $Y_{P/S}$  na poziomie nie niższym niż  $0,80 \text{ g g}^{-1}$ .

5. W skali przemysłowej produkcji kwasu cytrynowego w bioreaktorze charakteryzującym się wartością współczynnika  $k_{L,a}$  rzędu  $75 \text{ h}^{-1}$  zapewniającym szybkość wnikania tlenu w fazie akumulacji kwasu cytrynowego na poziomie  $10 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , możliwe jest uzyskanie wydajności kwasu cytrynowego  $Y_{P/S}$  na poziomie  $= 0,75 \text{ g g}^{-1}$ .

## Symbole

- $c_m$  – objętość molowa gazu natleniającego ( $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ )  
 $c_s$  – stężenie tlenu rozpuszczonego w fazie ciekłej, równowagowe względem ciśnienia cząstkowego tlenu w fazie gazowej ( $\text{g dm}^{-3}$ )  
 $c_t$  – stężenie tlenu rozpuszczonego w brzeczce w czasie  $t$  ( $\text{g dm}^{-3}$ )  
 $dc/dt$  – zmiany stężenia tlenu rozpuszczonego w fazie ciekłej  $dc$  w czasie  $dt$   
 $k_{L,a}$  – objętościowy współczynnik wnikania tlenu ( $\text{h}^{-1}$ )  
 $n$  – częstość obrotów mieszadła ( $\text{min}^{-1}$ )  
 $P$  – produkt ( $\text{g dm}^{-3}$ )  
 $pO_2$  – stężenie względne tlenu rozpuszczonego (%)  
 $Q_A$  – objętościowa szybkość napowietrzania ( $\text{dm}^3 \text{ dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ )  
 $Q_{O_2}$  – objętościowa szybkość przyswajania tlenu ( $\text{mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ )  
 $Q_X$  – objętościowa szybkość tworzenia biomasy ( $\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ )  
 $Q_P$  – objętościowa szybkość tworzenia produktu ( $\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ )

- S – substrat (stężenie węglowodanów w substracie) ( $\text{g dm}^{-3}$ )  
t – czas (h)  
 $Y_{P/S}$  – współczynnik substratowej wydajności produktu ( $\text{g g}^{-1}$ )  
 $\varphi_{\text{CO}_2}$  – udział objętościowy dwutlenku węgla w gazach fermentacyjnych  
 $\varphi_{\text{CO}_2A}$  – udział objętościowy dwutlenku węgla w gazie natleniającym  
 $\varphi_{\text{O}_2}$  – udział objętościowy tlenu w gazach fermentacyjnych  
 $\varphi_{\text{O}_2A}$  – udział objętościowy tlenu w gazie natleniającym  
 $P_{\text{bar}}$  – ciśnienie barometryczne (hPa)

## Literatura

1. Kovats J., Gackowska L., (1977), *Przem. Ferm. Rolny*, 21, 16-18.
2. Kubicek C. P., Zehentgruber O., El-Kalak H., Roehr M., (1980), *Eur. J. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 101-115.
3. Kwapisz E., (1978), *Zagadnienia aeracji we wglębnej fermentacji cytrynowej*, praca doktorska, Politechnika Łódzka, Łódź.
4. Podgórski W., Pietkiewicz J., Leśniak W., (1992), *Materiały Sesyjne XXIII Sesji Naukowej KTichŻ PAN*, 161-164.
5. Rymowicz W., Wojtatowicz M., Robak M., Jurgielewicz W., (1993), *Materiały Sesyjne XXIV Sesji Naukowej KTichŻ PAN*, 302-306.
6. Rohr M., Kubicek C., Kominek J., (1983), *Citric acid Biotechnology*, Eds. Rehm H. J., Reed G., Verlag Chemie, Weinheim.
7. Fiedurek J., (1999), *Acta Biotechnol.*, 19, 179-186.
8. Kirimura K., Hirowatari Y., Usami S., (1987), *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1299-1303.
9. Dawson M., Maddox I., Brooks J., (1986), *Enzyme Microb. Tech.*, 8, 37-40.
10. Podgórski W., Pietkiewicz J., Leśniak W., (1993), *Materiały Sesyjne XXIV Sesji Naukowej KTichŻ PAN*, 297-301.
11. Podgórski W., (2002), *Prace Nauk.* 914, Wyd. AE, Wrocław.
12. Leśniak W., Podgórski W., Pietkiewicz J., (1985), *Materiały Sesyjne II Ogólnokrajowej Sesji Naukowej Postępy Inżynierii Bioreaktorowej*, 68-79.
13. Pietkiewicz J., Podgórski W., Leśniak W., (1987), *Materiały Sesyjne III Ogólnokrajowej Sesji Naukowej Postępy Inżynierii Bioreaktorowej*, 38-46.
14. Kaiser K. P., Hupf H., (1979), *Dtsch. Lebensm.-Rundschr.*, 75, 300-304.
15. Leśniak W., Kutermankiewicz M., (1990), *Podstawy produkcji kwasu cytrynowego*, STC, Warszawa.
16. Podgórski W., Leśniak W., (1999), *Materiały Sesyjne VI Krajowej Konferencji Komputerowe Wspomaganie Badań Naukowych*, 89-94.
17. Berovic M., Cimerman A., Steiner W., Koloini T., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 579-581.
18. Podgórski W., Leśniak W., Pietkiewicz J., (1987), *Przem. Ferm. Owoc. Warzyw.*, 31, 30-32.
19. Leśniak W., Pietkiewicz J., Podgórski W., (1993), *Biotechnologia*, 22, 48-55.
20. Papagianni M., Matthey M., Kristiansen B., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16, 929-934.
21. Dawson M., Maddox I., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 220-226.
22. Karim M., Ariff A., Yusof K., (1995), *ASEAN Food J.*, 10, 90-93.
23. Sobotka M., Votruba J., Prokop A., (1981), *Acta Biotechnol.*, 1, 3-8.
24. Roukas T., (1991), *J. Ind. Microbiol.*, 7, 221-226.
25. Sobotka M., Machon V., Seichert L., Ujcova E., Marschalkova Z., (1985), *Folia Microbiol.*, 30, 381-392.
26. Seichert L., Ujcova E., Musilkova M., Fencel Z., (1982), *Folia Microbiol.*, 27, 333-334.