

# Charakterystyka porównawcza bioreaktorów stosowanych do biosyntezy kwasu cytrynowego w skali technicznej

Władysław Leśniak

Jerzy Pietkiewicz

Waldemar Podgórski

Katedra Biotechnologii Żywności

Akademia Ekonomiczna

Wrocław

## 1. Wstęp

W procesach biosyntezy prowadzonych metodą hodowli wglębnej najważniejszym problemem jest zapewnienie efektywnego natlenienia podłoża oraz sterylnych warunków przebiegu procesu. Wymagania te spełniają najlepiej ciśnieniowe bioreaktory zbiornikowe z mieszadłem, wykonane ze stali kwasoodpornej. Intensywność natleniania w tych bioreaktorach zależy głównie od rodzaju układu mieszająco-napowietrzającego oraz właściwości fizykochemicznych podłoża. W bioreaktorach zbiornikowych z mieszadłem energia zużywana jest zarówno na mieszanie jak i napowietrzanie roztworu, a zatem ich konkurencyjność w stosunku do innych typów bioreaktorów maleje wraz ze wzrostem objętości, ze względu na szybko rosnące zużycie energii. Z tego względu w ostatnich latach obserwuje się intensyfikację badań w zakresie konstrukcji nowych bioreaktorów zapewniających dobrą wymianę masy i ciepła przy niższym zużyciu energii.

Do takich bioreaktorów należą m.in. bioreaktory bezmieszadłowe z naturalną cyrkulacją cieczy, zwane bioreaktorami barbotażowymi, saturacyjnymi lub *air-lift*. W bioreaktorach tego typu w wyniku powstałej różnicy ciśnień występuje cyrkulacja roztworu co zapewnia intensywną wymianę tlenu przy stosunkowo niskim zużyciu energii (3).

W procesach biosyntezy kwasu cytrynowego problem dostatecznego wnikiwania tlenu do komórek drobnoustrojów nabiera szczególnego znaczenia, gdyż jego stosunkowo mała rozpuszczalność w podłożu jest zmniejszana dodatkowo przez dużą, rosnącą w czasie procesu biosyntezy lepkość podłoża fermentacyjnego (4). Niewielka ilość tlenu rozpuszczonego w podłożu, dostępna dla drobnoustrojów stwarza także wysokie wymagania w stosunku do warunków hydrodynamicznych w jakich prowadzony jest proces. Praktyka wykazuje bowiem, że zakłócenia w dostarczaniu tlenu do podłoża hodowlanego wynikające np. z nieprawidłowego rozmieszczenia lub kąta ustawienia łopatek mieszadła,

szybkości obrotowej wału mieszadła itp. przyczyniają się do powstawania tzw. „stref martwych” co w konsekwencji wpływa niekorzystnie na aktywność metaboliczną drobnoustrojów.

Z drugiej strony, prawie wszystkie bioreaktory, stosowane w Polsce do biosyntezy kwasu cytrynowego, były projektowane do innych celów, głównie do biosyntezy antybiotyków, a zatem nie są one optymalne do biosyntezy kwasu, ze względu chociażby na inny rodzaj stosowanych drobnoustrojów oraz odmienny skład i właściwości reologiczne podłoża hodowlanych.

W trakcie naszych badań dotyczących wdrażania opracowanej technologii biosyntezy kwasu cytrynowego w kilku zakładach w kraju, przeprowadzono również ocenę zainstalowanych tam bioreaktorów pod kątem ich przydatności do biosyntezy kwasu. Dotyczyły one głównie charakterystyki hydrodynamicznej oraz określenia objętościowego współczynnika wnikania tlenu ( $k_{La}$ ) w celu ustalenia optymalnego schematu natleniania (5, 6). W pracy przedstawiono porównanie różnych bioreaktorów przemysłowych stosowanych do biosyntezy kwasu cytrynowego z punktu widzenia ich hydrodynamiki i wymiany masy oraz uzyskiwanych w nich wydajnościach i produktywnościach biosyntezy kwasu cytrynowego.

Charakterystyką objęto następujące typy bioreaktorów:

- bioreaktory zbiornikowe z mieszadłem o poj. 10 m<sup>3</sup> („Biorol” Wałcz), 30 m<sup>3</sup> („Polfa” Kraków), 50 m<sup>3</sup> i 150 m<sup>3</sup> (WKC Racibórz),
- bioreaktor zbiornikowy typu *air-lift* o poj. 26 m<sup>3</sup> („Polfa” Kraków).

## 2. Materiały i metody badań

### 2.1. Pomiar czasu cyrkulacji ( $t_c$ ) i czasu mieszania ( $t_m$ )

Do pomiaru tych parametrów zastosowano pH-metr z szybkobieżną taśmą rejestracyjną firmy Radelkis, jako wskaźnika używano stężonego kwasu siarkowego. Sposób pomiaru tych parametrów prowadzono zgodnie z podaną metodyką (6,7).

### 2.2. Pomiar współczynnika zatrzymywania gazu ( $E_G$ )

Współczynnik  $E_G$  obliczano przez pomiar wysokości słupa cieczy przy różnych szybkościach napowietrzania wg podanej metodyki (6,7).

### 2.3. Pomiar stężenia tlenu rozpuszczonego w roztworze oraz zawartości tlenu w gazach odlotowych

Stężenie tlenu rozpuszczonego w podłożu w czasie biosyntezy kwasu mierzono za pomocą galwanicznego czujnika tlenowego z membraną oraz urządzenia do pomiaru zwanego Oxysterem. Zawartość tlenu w gazach odlotowych mierzono za pomocą paramagnetycznego analizatora tlenu „Permolyt 2”.

W oparciu o te parametry obliczono objętościowy współczynnik wnikania tlenu ( $k_{L,a}$ ), stosując metodę bilansową. Szczegółowe zasady pomiaru tych wielkości zob. poz. (6, 7).

### 3. Wyniki badań i ich omówienie

Charakterystykę konstrukcyjną badanych bioreaktorów przedstawiono w tab. 1. Należy tu zwrócić uwagę przede wszystkim na dwa parametry, a mianowicie na: stosunek wysokości bioreaktora do jego średnicy, który wahał się od 2,3:1 ( $30 \text{ m}^3$ ) do 3,5:1 ( $10 \text{ m}^3$ ) oraz na szybkość obwodową mieszadła, która była znacznie zróżnicowana, wahając się od 2,5 m/s dla bioreaktora o pojemności  $10 \text{ m}^3$  do 6,3-7,8 m/s dla bioreaktora o pojemności  $150 \text{ m}^3$ . Zróżnicowanie to znalazło swoje odzwierciedlenie w kształtowaniu się parametrów hydrodynamicznych bioreaktorów, które przedstawiono w tab. 2.

Szybkość cyrkulacji w bioreaktorach mieszadłowych wahała się od około 30 cm/s do około 70 cm/s w zależności od typu bioreaktora oraz szybkości napowietrzania. Najniższymi szybkościami cyrkulacji charakteryzował się bioreaktor o pojemności  $10 \text{ m}^3$ , a najwyższymi bioreaktor o pojemności  $30 \text{ m}^3$ . Natomiast czas mieszania wahał się od około 60 s dla bioreaktora  $10 \text{ m}^3$  do około 120 - 180 s dla bioreaktora  $30 \text{ m}^3$ . Bioreaktory o wyższych pojemnościach ( $50 \text{ m}^3$  i  $150 \text{ m}^3$ ) wykazywały wartości pośrednie. Parametry te zmie-

TABELA 1  
CHARAKTERYSTYKA GEOMETRYCZNA BADANYCH BIOREAKTORÓW

Bioreaktor	$10 \text{ m}^3$	$30 \text{ m}^3$	$50 \text{ m}^3$	$150 \text{ m}^3$	* $26 \text{ m}^3$
średnica, m	1,7	2,6	3,0	4,0	1,8
wysokość, m	5,68	5,96	8,5	13,44	10,8
stos. wysokości do średnicy	3,5:1	2,3:1	2,85:1	3,35:1	6:1
śred. mieszadła, m	0,4	0,7	1,0	1,2-1,5	—
liczba mieszadeł, sztuk	4	2	3	4	—
obroty mieszadła, $\text{min}^{-1}$	120	120	100	100	—
szybkość obwod. mieszadła, m/s	2,5	4,4	5,23	6,3-7,8	—

\* — bioreaktor bezmieszadłowy typu *air-lift* (rura cyrkulacyjna kwadratowa o boku 1,25 m i wysokości 9,0 m)

niały się wraz ze zmianą szybkości napowietrzania. W przypadku bioreaktora typu *air-lift* parametry te były wyższe i zmieniały się w zależności od szybkości napowietrzania w granicach szybkości cyrkulacji od 22,0 do 57,0 cm/s, a czas mieszania od 240 do 72 s.

TABELA 2

KSZTAŁTOWANIE SIĘ NIEKTÓRYCH PARAMETRÓW HYDRODYNAMICZNYCH BIOREAKTORÓW PRZY STAŁYCH OBROTACH MIESZADŁA I RÓŻNYCH SZYBKOŚCIACH NAPONIETRZANIA

		Szybkość napowietrzania (Vp) [vvm]							
parametr	bioreaktor	0	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60
szybkość	10 m <sup>3</sup>	34	36	32	31	32	45	49	34
cyrkulacji	30 m <sup>3</sup>	68	63	61	60	58	66	69	78
(Uc)	50 m <sup>3</sup>	55	47	50	55	44	51	66	—
[cm/sek]	150 m <sup>3</sup>	42	35	42	37	55	57	48	—
	*26 m <sup>3</sup>	—	—	220	300	360	420	470	570
czas	10 m <sup>3</sup>	120	65	66	66	54	46	61	70
mieszania	30 m <sup>3</sup>	118	108	115	120	160	178	196	—
(tm)	50 m <sup>3</sup>	74	82	96	148	138	85	56	—
[sek]	150 m <sup>3</sup>	92	96	90	94	72	69	68	—
	*26 m <sup>3</sup>	—	—	240	180	130	110	96	72
współczynnik	10 m <sup>3</sup>	1,2	4,5	6,2	9,0	11,1	14,7	16,5	18,0
zatrzymywania	30 m <sup>3</sup>	0,0	2,9	5,7	8,4	10,2	12,8	15,0	16,3
gazu (E <sub>G</sub> )	50 m <sup>3</sup>	0,0	1,6	3,2	6,0	9,3	13,0	14,0	—
[%]	150 m <sup>3</sup>	1,0	12,5	14,5	17,0	18,0	19,0	21,0	—
	*26 m <sup>3</sup>	—	—	7,0	7,8	9,0	10,2	11,3	12,0

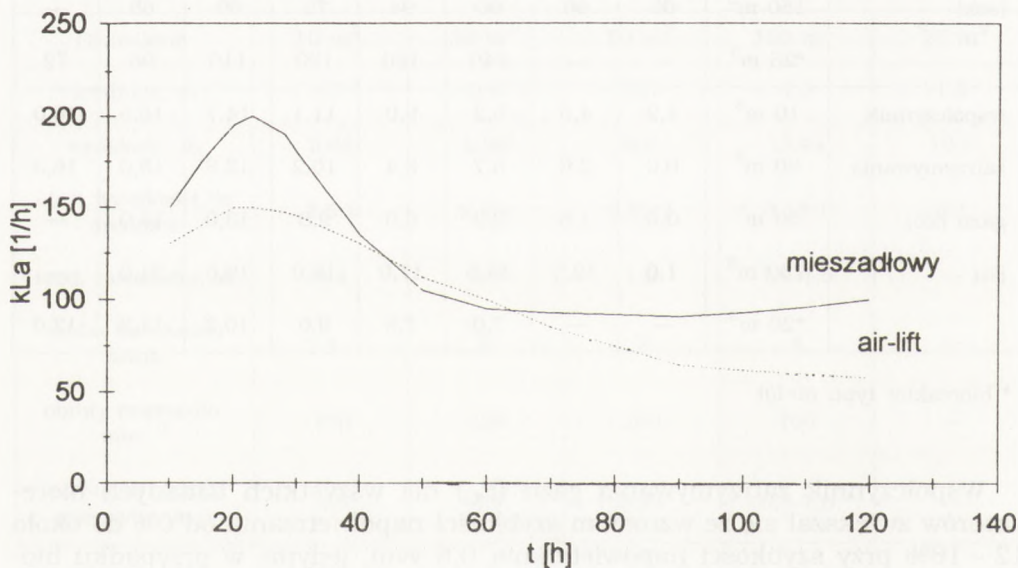
\* bioreaktor typu *air-lift*

Współczynnik zatrzymywania gazu (E<sub>G</sub>) dla wszystkich badanych bioreaktorów zwiększał się ze wzrostem szybkości napowietrzania od 0% do około 12 – 16% przy szybkości napowietrzania 0,5 vvm, jedynie w przypadku bioreaktora 150 m<sup>3</sup> wynosił on aż 21%, co świadczy o jego wysokiej zdolności zatrzymywania gazu.

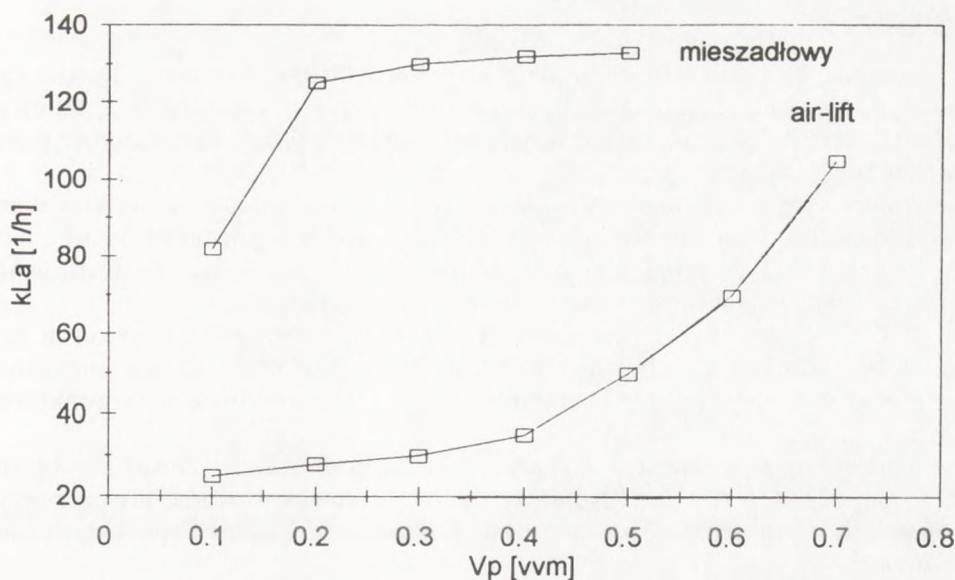
Objętościowy współczynnik wnikania tlenu ( $k_{La}$ ) mierzony w czasie biosyntezy kwasu cytrynowego w dobranych warunkach napowietrzania, zmieniał się w czasie, osiągając najwyższe wartości rzędu  $130 - 150 \text{ h}^{-1}$  w drugiej dobie fermentacji, a następnie obniżał się do około  $60 \text{ h}^{-1}$  przy końcu procesu biosyntezy (rys. 1). Było to spowodowane prawdopodobnie zmianą właściwości reologicznych podłoża, związanych ze wzrostem grzybni *Aspergillus niger*, a zwłaszcza wzrostem lepkości płynu hodowlanego. Odmienne natomiast kształtował się współczynnik  $k_{La}$  w zależności od szybkości napowietrzania (rys. 2). Wyniki wskazują, że współczynnik  $k_{La}$  mierzony w drugiej dobie procesu wzrasta stopniowo ze wzrostem szybkości napowietrzania do około  $100 - 120 \text{ h}^{-1}$  w zależności od typu i objętości bioreaktora, a następnie utrzymuje się na stałym poziomie mimo wzrostu szybkości napowietrzania.

Badania te wykazały również, że optymalne wartości szybkości napowietrzania wynosiły około  $0,3 \text{ vvm}$  dla bioreaktorów mieszadłowych oraz około  $0,6 - 0,8 \text{ vvm}$  dla bioreaktora typu *air-lift*. Wynika z tego, że stosowanie w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego w bioreaktorach mieszadłowych szybkości napowietrzania wyższych aniżeli  $0,3 - 0,4 \text{ vvm}$  nie powoduje już zwiększenia szybkości wnikania tlenu do podłoża, a zatem jest nieefektywne. Natomiast w przypadku bioreaktorów bezmieszadłowych typu *air-lift* należy stosować znacznie wyższe szybkości napowietrzania, rzędu  $0,6 - 0,8 \text{ vvm}$  co jest zrozumiałe ze względu na brak mieszania mechanicznego.

Otrzymywane w poszczególnych bioreaktorach wydajności i produktywność biosyntezy kwasu cytrynowego, przedstawione w tab. 3, wskazują, że najle-



Rys. 1. Kształtowanie się objętościowego współczynnika wnikania tlenu ( $k_{La}$ ) w czasie fermentacji.



Rys. 2. Kształtowanie się objętościowego współczynnika unikania tlenu ( $k_{La}$ ) przy różnych szybkościach napowietrzania ( $V_p$ ).

psze wyniki uzyskiwano w bioreaktorach mieszadłowych o pojemności 50 i 150 m<sup>3</sup>, natomiast nieco niższe o pojemności 10 m<sup>3</sup> i 30 m<sup>3</sup> oraz bioreaktorze typu *air-lift*. Było to spowodowane gorszymi warunkami wymiany masy w tych bioreaktorach wskutek bądź zbyt małych obrotów (bioreaktor 10 m<sup>3</sup>), bądź też z powodu braku mieszadła bioreaktor *air-lift*.

TABELA 3  
KSZTAŁTOWANIE SIĘ PODSTAWOWYCH PARAMETRÓW BIOSYNTETY KWASU CYTRYNOWEGO  
W BADANYCH BIOREAKTORACH

Parametry biosyntezy	Typ bioreaktora				
	10 m <sup>3</sup>	30 m <sup>3</sup>	50 m <sup>3</sup>	150 m <sup>3</sup>	26 m <sup>3</sup> *
wydajność w stosunku do cukru, %	85	85	90	90	80
produktywność, kg/m <sup>3</sup> h	0,80	0,80	1,0	1,0	0,75

\* — bioreaktor typu *air-lift*

## 4. Wnioski

1. Spośród badanych bioreaktorów stosowanych do biosyntezy kwasu cytrynowego w skali technicznej najkorzystniejszymi parametrami geometrycznymi (konstrukcyjnymi) charakteryzowały się bioreaktory mieszadłowe o pojemności 50 i 150 m<sup>3</sup>.

2. Największą szybkością cyrkulacji charakteryzował się bioreaktor bezmieszadłowy, a wśród mieszadłowych — bioreaktor o pojemności 30 m<sup>3</sup>, lecz te duże szybkości cyrkulacji w tych bioreaktorach wcale nie gwarantowały im najniższych czasów mieszania, a wręcz przeciwnie.

3. Najlepsze efekty pod względem szybkości wymieszania i uzyskania homogenności środowiska charakteryzowane przez najniższe czasy mieszania uzyskiwano w bioreaktorach o pojemności 10 i 150 m<sup>3</sup> oraz w bioreaktorze 50 m<sup>3</sup>.

4. Najwyższą zdolnością zatrzymywania gazu charakteryzował się bioreaktor o pojemności 150 m<sup>3</sup>. Świadczy to o wysokim rozdrobnieniu pęcherzyków powietrza i dobrym napowietrzeniu podłoża fermentacyjnego w tym bioreaktorze.

5. Objętościowy współczynnik wnikania tlenu  $k_{La}$  zmieniał się w czasie trwania fermentacji od około 150 do 120 h<sup>-1</sup>, osiągając optimum w 30 godzinie fermentacji dla bioreaktorów mieszadłowych, oraz od 125 do 60 h<sup>-1</sup> dla bioreaktora typu *air-lift*.

6. Badanie zależności objętościowego współczynnika wnikania tlenu ( $k_{La}$ ) od szybkości napowietrzania wykazało, że optymalna szybkość napowietrzania w bioreaktorach mieszadłowych wynosi około 0,3 vvm, a dla bioreaktora *air-lift* powyżej 0,6 vvm.

7. Najlepsze wyniki biosyntezy kwasu cytrynowego uzyskiwano w bioreaktorach mieszadłowych o pojemności 50 i 150 m<sup>3</sup>.

## Literatura

1. Kafarow W. W., Winarow A. J., Gordiejew L. S., (1983), Modelowanie reaktorów biologicznych, Warszawa, WNT.
2. Prokop A., (1981), Acta Biotechnol., 1, 3, 269.
3. Caurago-Rubic E., Ormelas-Vale A., Nogai S., et al., (1977), J. Ferment. Technol., 55, 1, 56.
4. Kwapisz E., Jakubowska J., (1983), w: Materiały Sesyjne I Ogólnokrajowej Sesji Naukowej „Postępy w Inżynierii Bioreaktorowej”, Łódź, 101.
5. Leśniak W., Podgórski W., Pietkiewicz J., (1985), w: Materiały Sesyjne II Ogólnokrajowej Sesji Naukowej „Postępy Inżynierii Bioreaktorowej”, Łódź, 1, 68 – 79.
6. Leśniak W., Podgórski W., Pietkiewicz J., (1987), w: Materiały Sesyjne III Ogólnokrajowej Sesji Naukowej „Postępy Inżynierii Bioreaktorowej”, Łódź, 83 – 94.
7. Podgórski W., Pietkiewicz J., Leśniak W., (1989), Prace Naukowe AE Wrocław, Technologia, 476, 63 – 76.

## Comparative characteristic of bioreactors used for citric acid biosynthesis in industrial scale

### Summary

The mixing and mass transfer have been investigated in industrial bioreactors of capacity 10, 30, 50 and 150 m<sup>3</sup> used for citric acid fermentation. Hydrodynamic parameters were examined on water using mineral acid as a trace. Volumetric mass transfer coefficient ( $k_L a$ ) was determined by balance method. It was found that the examined bioreactors have similar hydrodynamic parameters despite their different capacities. The differences were found in maximum values of  $k_L a$  (from 150 to 200 h<sup>-1</sup>) which corresponded to the citric acid yield and productivity.

### key words:

citric acid, bioreactors, mixing, mass transfer.

### *Adres dla korespondencji:*

Władysław Leśniak, Katedra Biotechnologii Żywności, Akademia Ekonomiczna, ul. Komandorska 118/120, 53-345 Wrocław.