

Inżynieryjne aspekty hodowli pleśni *A. Niger* w fermentorze wieżowym typu *air-lift*

Paweł Głuszczyński

Teresa Jamroz

Henryk Michalski

Barbara Sencio

Wydział Inżynierii Środowiskowej

i Ochrony Środowiska

Politechnika Łódzka

Łódź

1. Wprowadzenie

Kwas cytrynowy jest podstawowym czynnikiem zakwaszającym i regulującym pH, szeroko stosowanym w różnych gałęziach przemysłu. Obecnie 70% światowej produkcji kwasu cytrynowego wykorzystywane jest w przemyśle spożywczym, 18% w przemyśle farmaceutycznym i 12% przeznaczane się na inne cele techniczne (w przemyśle chemicznym, skórzanym, metalurgicznym). Zapotrzebowanie na kwas cytrynowy stale wzrasta, między innymi w związku z tendencją zastępowania nim fosforanów w produkcji środków piorących. Według oceny japońskich ekonomistów światowe zapotrzebowanie na cytrynian sodu dla produkcji detergentów kształtuje się na poziomie 400 tys. ton rocznie (1).

Najbardziej rozpowszechnionym mikroorganizmem do produkcji kwasu cytrynowego jest *Aspergillus niger*, którego fizjologia i mechanizm biosyntezy został najlepiej poznany. Proces biosyntezy kwasu cytrynowego ma wyraźnie zróżnicowany, dwuetapowy przebieg: zaczyna się fazą intensywnego wzrostu grzybnicy, po której następuje faza biosyntezy produktu.

Znane są dwie metody otrzymywania kwasu cytrynowego na drodze mikrobiologicznej: fermentacja powierzchniowa i fermentacja węgłna. Tradycyjnie kwas cytrynowy na skalę przemysłową otrzymuje się metodą fermentacji powierzchniowej, która nadal jest szeroko stosowana jako sprawdzona i niezawodna. Jednak bardziej efektywna ekonomicznie jest metoda biosyntezy węgłnej, prowadzonej w fermentorach w całej objętości cieczy, przy intensywnym napowietrzaniu i mieszaniu medium hodowlanego. O przewadze tej metody fermentacji nad metodą powierzchniową świadczy wiele czynników, z których do najważniejszych należą (2):

- około połowy krótszy czas fermentacji,
- prawie dwukrotnie wyższa wydajność kwasu cytrynowego,
- mniejsze zapotrzebowanie na powierzchnię produkcyjną,
- znaczne zmniejszenie pracochłonności oraz poprawa warunków zdrowotnych pracowników,
- możliwość mechanizacji, a nawet automatyzacji procesu,
- łatwość utrzymania sterylnych warunków przebiegu fermentacji,
- mniejsza ilość odpadów i ścieków,
- niższe nakłady inwestycyjne na budowę zakładu (o ok. 20 – 30%).

Biosynteza kwasu cytrynowego jest procesem tlenowym i wymaga ciągłego dostarczania tlenu niezbędnego do właściwego wzrostu i metabolizmu pleśni. Warunki aeracji we wglębnej hodowli grzybów nitkowatych uzależnione są nie tylko od stężenia biomasy, ale i od jej formy wzrostu. Struktura grzybni decyduje zarówno o wielkości zapotrzebowania na tlen, jak i o szybkości jego wnikania (3). Szybkość wnikania tlenu jest jednym z ważniejszych czynników wpływających na biosyntezę kwasu cytrynowego w procesie fermentacji wglębnej. Charakteryzowana jest ona przez objętościowy współczynnik wnikania tlenu, $k_L a$, i zależy od wielu czynników, między innymi od konstrukcji fermentora i urządzeń napowietrzających, intensywności napowietrzania i mieszania oraz od właściwości reologicznych zawiesiny.

Właściwości reologiczne zawiesiny grzybni *A. niger* zmieniają się w czasie fermentacji w szerokich granicach. Lepkość podłoża fermentacyjnego jest na początku procesu bliska lepkości wody, a w czasie fermentacji wzrasta ponad sto razy (4). Dysponując wynikami pomiarów właściwości reologicznych zawiesiny w czasie procesu biosyntezy można kontrolować warunki hydrodynamiczne w fermentorze i w razie potrzeby odpowiednio je korygować, zapewniając optymalne warunki dla metabolizmu drobnoustroju. Ponadto znajomość wartości bezwzględnych tych parametrów i ich zmian jest niezbędna przy projektowaniu fermentora i urządzeń pomocniczych (5).

Projektowanie aparatury dla hodowli grzybów nitkowatych stwarza trudności z punktu widzenia inżynierii bioprocessowej. Wszystkie znane dotąd prawa rządzące wymianą masy i ciepła w fermentorach stosują się do płynów newtonowskich; dla zawiesin grzybów nitkowatych wykazujących właściwości nienewtonowskie wymagają weryfikacji.

Oprócz najbardziej rozpowszechnionych fermentorów zbiornikowych z mieszaniem mechanicznym coraz częściej w przemyśle stosuje się fermentory bezmieszadłowe. W tej grupie aparatów dużym zainteresowaniem cieszą się wieżowe bioreaktory cyrkulacyjne typu *air-lift*, w których, niezależnie od różnic konstrukcyjnych, efekt mieszania i cyrkulacji podłoża osiąga się wyłącznie dzięki odpowiedniemu napowietrzaniu cieczy (6, 7). Aparaty tego typu stosowano już także do prowadzenia procesu biosyntezy kwasu cytrynowego (8 – 13).

Mimo coraz szerszego stosowania bioreaktorów typu *air-lift* do procesów biotechnologicznych na skalę przemysłową, wiedza na temat zasad projektowania takich aparatów jest ciągle niedostateczna. Wnikliwego zbadania wymagają nadal takie problemy jak np. lokalny rozkład stężenia tlenu w fazie

ciekłej i gazowej, czas przebywania faz, hydrodynamika i warunki wymiany masy w płynach nienewtonowskich i wysokolepkich, czy powiększanie skały, szczególnie w przypadku złożonych układów biologicznych.

Przedmiotem niniejszej pracy było określenie zmian parametrów procesowych, warunków hydrodynamicznych i szybkości wnikania tlenu do cieczy w czasie hodowli pleśni *A. niger* w bioreaktorze cyrkulacyjnym typu *air-lift* z obiegiem zewnętrznym.

2. Aparatura doświadczalna

Zastosowany do badań fermentor cyrkulacyjny zbudowany jest z powtarzalnych elementów o wys. 1,85 m wykonanych ze stali kwasoodpornej 1H18N9T, ze szklanymi wziernikami umożliwiającymi obserwację wizualną wnętrza aparatu. Każdy element zaopatrzony jest w króćce umożliwiające zainstalowanie przyrządów pomiarowych. Na szczycie reaktora znajduje się zbiornik, pełniący rolę separatora gazu oraz przestrzeni buforowej dla piany powstającej w wyniku intensywnego napowietrzania podłoża hodowlanego.

Podstawowe wymiary aparatu są następujące:

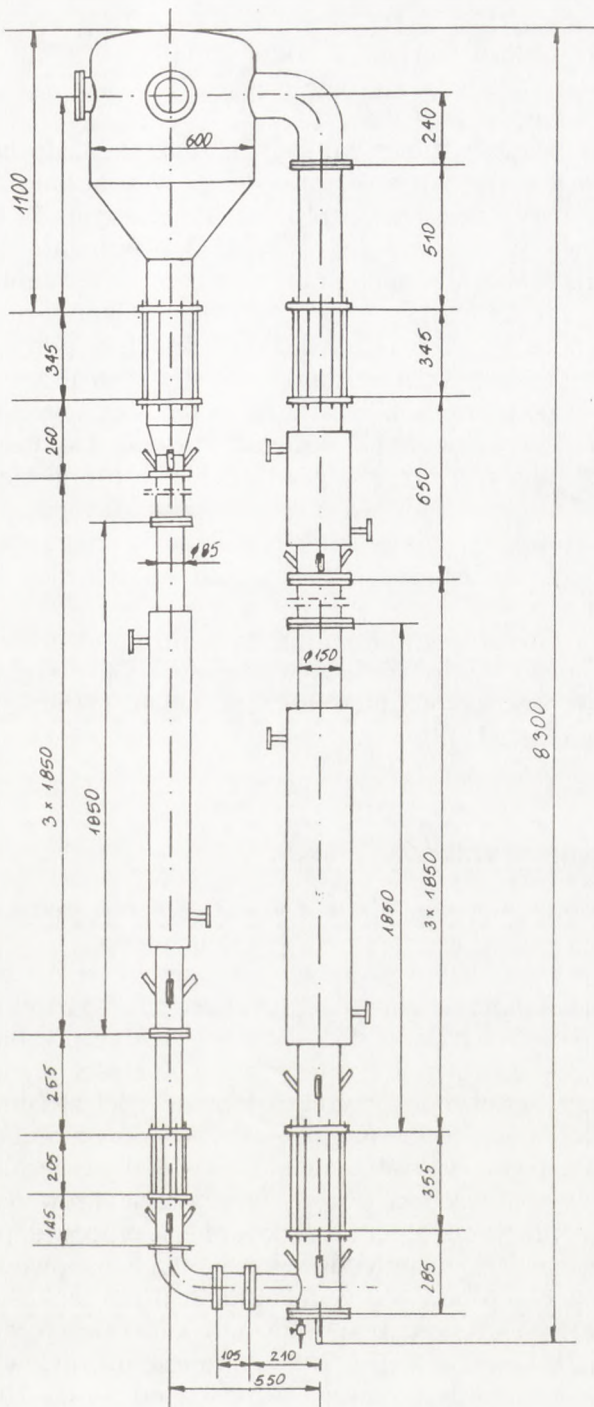
— maksymalna wysokość całkowita	8,2 m
— objętość przestrzeni roboczej	0,25 m ³
— średnica wewnętrzna fermentora	0,15 m
— średnica zewnętrznej rury cyrkulacyjnej	0,085 m
— współczynnik smukłości fermentora H/D	52
— stosunek przekrojów poprzecznych A_d/A_r	0,32

Powietrze doprowadzane jest u podstawy fermentora. Jego konstrukcja umożliwia zastosowanie różnych typów urządzeń napowietrzających (bełkotki, płytki ze spieków porowatych, dysze). W pracy stosowano klasyczną bełkotkę wykonaną z rurek perforowanych w kształcie krzyża. Każde z czterech ramion krzyża posiadało 40 otworów o średnicy 1,5 mm. Ogólny schemat fermentora przedstawiono na rys. 1.

3. Metodyka badań

W badaniach procesu biosyntezy kwasu cytrynowego stosowano szczep *Aspergillus niger* Z/IB. Proces prowadzono na podłożu zawierającym 10% cukru białego. Przeprowadzono serię fermentacji, z których każda trwała 7 dni. W czasie procesu oznaczano wartości następujących parametrów:

- stężenia biomasy (metodą wagową),
- stężenia cukru białego (metodą antronową),
- kwasowości ogólnej (metodą miareczkową),
- szybkości zużywania tlenu i wydzielania dwutlenku węgla przez drobnoustroje (metodą bilansową).



Rys. 1. Schemat fermentora doświadczalnego.

Ponadto wykonywano pomiary następujących parametrów fizykochemicznych:

- lepkości pozornej brzeczki hodowlanej,
- stopnia zatrzymania gazu w cieczy,
- szybkości cyrkulacji cieczy,
- objętościowego współczynnika wnikania tlenu do fazy ciekłej.

Krzywe płynięcia płynu fermentacyjnego wyznaczano za pomocą przepływowego reometru rotacyjnego z rotorem ślimakowym (5). Pomiary przeprowadzano okresowo, w pierwszych trzech dniach fermentacji co 12 godzin, następnie raz na dobę. Jednocześnie pobierano z fermentora próbkę w celu oznaczenia stężenia biomasy. Krzywą płynięcia płynu fermentacyjnego wyznaczoną za pomocą reometru przybliżano modelem potęgowym Ostwalda de Waele i metodą regresji wyznaczano parametry reologiczne K i n . Na podstawie uzyskanych współczynników równania potęgowego wyznaczano lepkość pozorną zawiesiny odpowiadającą danemu stężeniu biomasy.

Pomiary stopnia zatrzymania gazu przeprowadzano metodą manometryczną.

Prędkość cyrkulacji cieczy mierzono metodą znacznikową, stosując jako znacznik roztwór NaOH, zaś jako czujniki — elektrody pH (prod. INGOLD-Szwajcaria).

Objętościowy współczynnik wnikania tlenu do cieczy wyznaczano na podstawie mierzonego wzdłuż długości aparatu profilu stężenia tlenu rozpuszczonego w podłożu, metodą identyfikacji modelu matematycznego fermentora cyrkulacyjnego (14, 15).

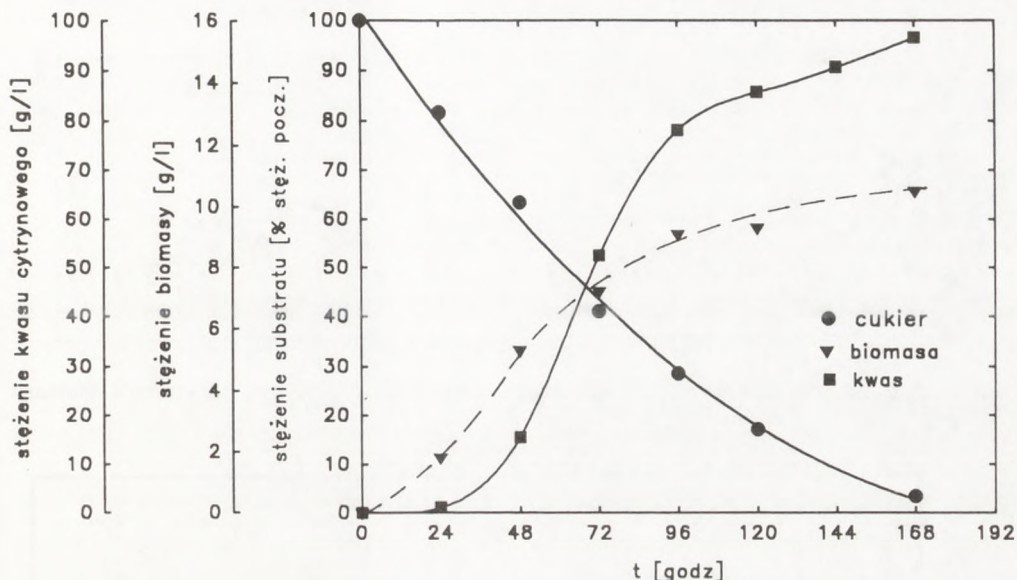
4. Omówienie wyników

Przedstawione w pracy dane są wartościami średnimi wyników badań z czterech procesów biosyntezy kwasu cytrynowego.

Podczas hodowli obserwowano, że intensywny wzrost biomasy rozpoczynał się po okresie adaptacyjnym trwającym ok. 24 godziny od momentu wprowadzenia inokulum i trwał 2 doby. Wzrost grzybni przebiegał prawidłowo; jej stężenie przyrastało równomiernie w całej objętości płynu. Po 72 godzinach następowało zahamowanie przyrostu biomasy; jej stężenie już tylko nieznacznie rosło do końca fermentacji, obserwowano natomiast intensywne tworzenie kwasu cytrynowego. W drugiej i trzeciej dobie fermentacji występowało silne pienienie się brzeczki. Każdą fermentację prowadzono przez ok. 168 godzin. Fermentor wraz z oprzyrządowaniem pracował przez cały czas bezawaryjnie, potwierdzając przydatność instalacji badawczej *air-lift* do prowadzenia procesów aerobowych w warunkach dużej lepkości podłoża.

W omawianych procesach uzyskiwano końcowe stężenie biomasy od 7,8 do 14,8 g sm/l, średnio 10,5 g/l. Po zakończeniu hodowli ilość otrzymanego jednowodnego kwasu cytrynowego wynosiła od 94 do 100 g/l, średnio 96,6 g/l, przy średniej wydajności w stosunku do zużytego substratu 94%.

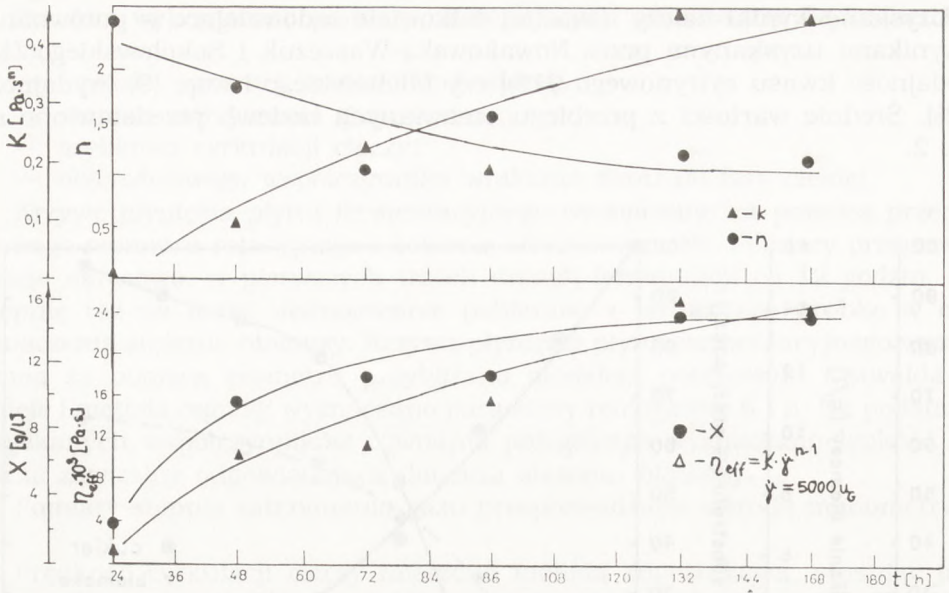
Uzyskane wyniki należy uznać za całkowicie zadowalające w porównaniu z wynikami uzyskanymi przez Nowakowską-Waszczuk i Sokołowskiego (16) (wydajność kwasu cytrynowego 91%) czy Michalskiego i wsp. (9) (wydajność 95%). Średnie wartości z przebiegu omawianych hodowli przedstawiono na rys. 2.



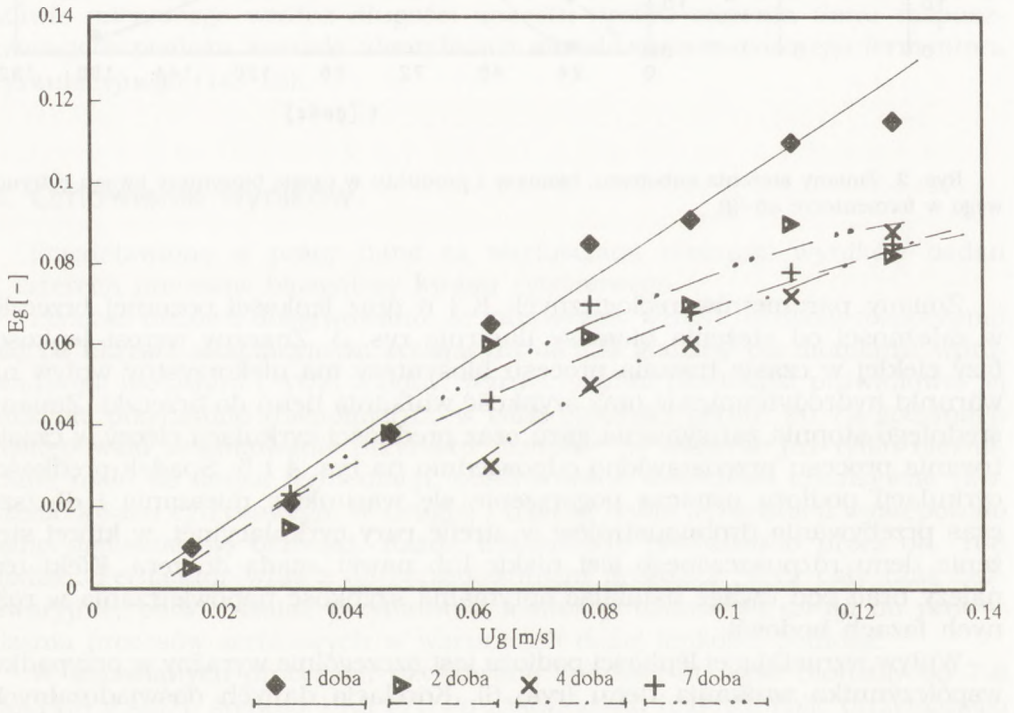
Rys. 2. Zmiany stężenia substratu, biomasy i produktu w czasie biosyntezy kwasu cytrynowego w fermentorze *air-lift*.

Zmiany parametrów reologicznych K i n oraz lepkości pozornej brzezki w zależności od stężenia biomasy ilustruje rys. 3. Znaczny wzrost lepkości fazy ciekłej w czasie trwania procesu biosyntezy ma niekorzystny wpływ na warunki hydrodynamiczne oraz szybkość wnikania tlenu do brzezki. Zmiany średniego stopnia zatrzymania gazu oraz prędkości cyrkulacji cieczy w czasie trwania procesu przedstawiono odpowiednio na rys. 4 i 5. Spadek prędkości cyrkulacji podłoża oznacza pogorszenie się warunków mieszania i dłuższy czas przebywania drobnoustrojów w strefie rury cyrkulacyjnej, w której stężenie tlenu rozpuszczonego jest niskie lub nawet spada do zera. Efekt ten należy brać pod uwagę ustalając optymalną szybkość napowietrzania w różnych fazach hodowli.

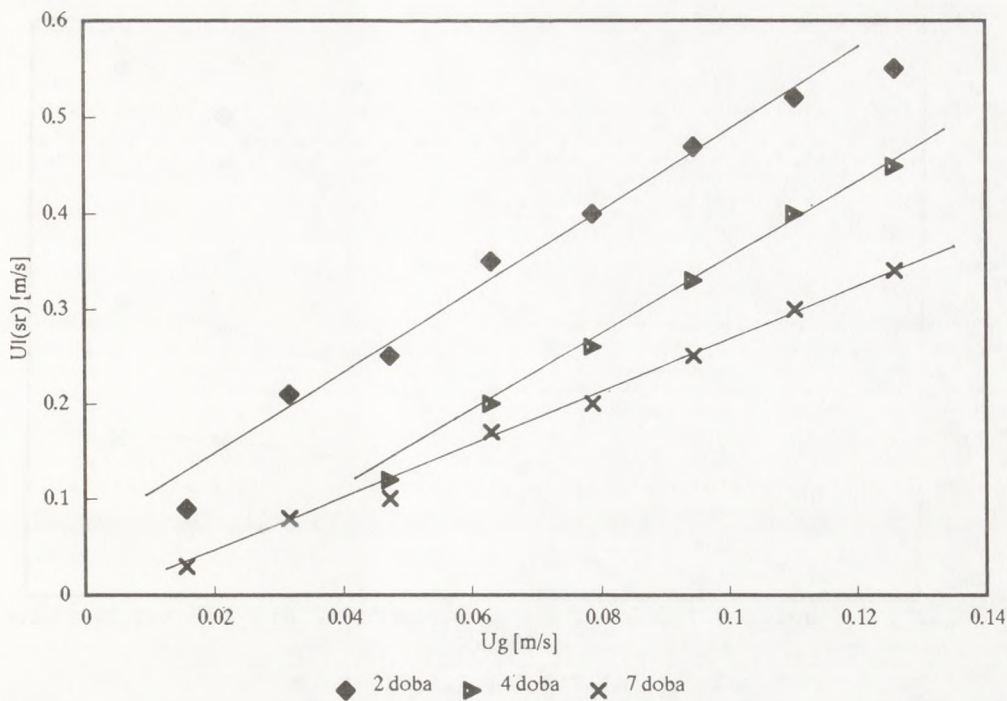
Wpływ wzrastającej lepkości podłoża jest szczególnie wyraźny w przypadku współczynnika wnikania tlenu (rys. 6). Korelacja danych doświadczalnych uzyskana w pracy wiąże współczynnik k_{LA} z lepkością pozorną podłoża w potęgze $-0,98$.



Rys. 3. Zależność parametrów reologicznych brzezki fermentacyjnej od stężenia biomasy w kolejnych dobach procesu.



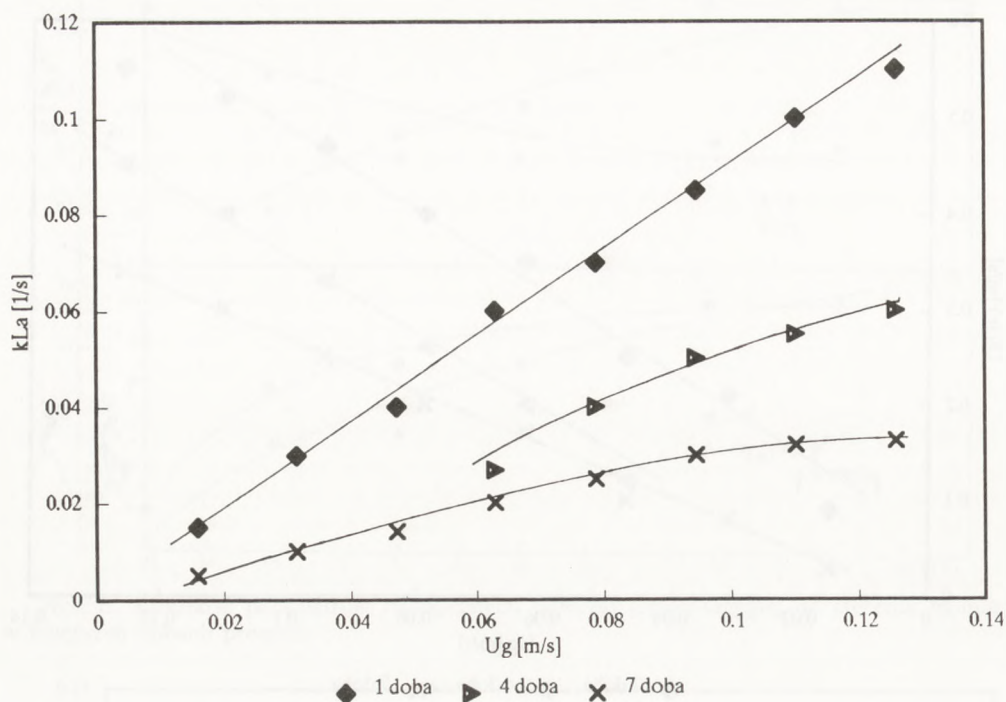
Rys. 4. Zmiany zależności stopnia zatrzymania gazu w cieczy od szybkości napowietrzania w czasie fermentacji.



Rys. 5. Zmiany zależności średniej prędkości cyrkulacji cieczy od szybkości napowietrzania w czasie fermentacji.

Zjawisko znacznego obniżania się wartości współczynnika $k_{L,a}$ wraz ze wzrostem stężenia biomasy ma duże znaczenie w czasie fermentacji prowadzonej w aparacie typu *air-lift*. W fazie intensywnego wzrostu grzybni zapotrzebowanie na tlen szybko rośnie, a jednocześnie spada szybkość jego wnikania z fazy gazowej. Utrzymanie stężenia tlenu rozpuszczonego w cieczy powyżej stężenia krytycznego, limitującego wzrost grzybni, wymaga znacznie intensywniejszego napowietrzania, tj. nakładu energii. Zwiększenie współczynnika wnikania innymi metodami (mieszadła statyczne, efektywniejszy aerator) pozwoliłoby na obniżenie kosztów prowadzenia procesu. Problem ten będzie przedmiotem dalszych badań prowadzonych w celu doskonalenia i optymalizacji bioreaktorów *air-lift* do biosyntezy kwasu cytrynowego.

Osobnym zagadnieniem jest ustalenie wartości współczynników wnikania tlenu w poszczególnych strefach bioreaktora. Tak jak wynika z wcześniejszych prac (13,17) mogą one znacznie różnić się między sobą. Z praktycznego punktu widzenia w czasie fermentacji stwarza to niebezpieczeństwo spadku stężenia tlenu w cieczy podczas przepływu przez rurę cyrkulacyjną poniżej wartości krytycznej, choć średnie wartości $k_{L,a}$, obliczane dla całego aparatu metodą bilansową, mogą być dostatecznie duże. Ustalenie udziału każdej ze stref bioreaktora wieżowego w całkowitym efekcie przenikania tlenu z fazy gazowej



Rys. 6. Zmiany zależności średniego współczynnika wnikania tlenu od szybkości napowietrzania w kolejnych fazach fermentacji.

do ciekłej jest możliwe przy zastosowaniu przytoczonej w pracy metody modelowania matematycznego procesu wymiany masy w bioreaktorze. Zagadnienia te są przedmiotem odrębnych badań.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego nr 303039101, finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Literatura

1. Karklinsz R.J., Lepinsz T.K., (1993), Mikrobnyj biosintez limonnoj kisloty, Znanje, Riga.
2. Leśniak W., (1985), Przem. Ferm. Owoc.-Warzyw., 29(12), 32 - 33.
3. Kwapisz E., (1978), Zagadnienia aeracji we wglębnej fermentacji cytrynowej, praca doktorska, Politechnika Łódzka, Łódź.
4. Kembłowski Z., Budzyński P., Owczarż P., (1990), Reol. Acta, 29, 588 - 593.
5. Budzyński P., (1992), Reometr rotacyjny typu „on-line” do pomiaru własności reologicznych zawiesin fermentujących, praca doktorska, Politechnika Łódzka, Łódź.
6. Patent PRL 43441, (1988).
7. Patent PRL 43584, (1988).
8. Allen D., Robinson C.W., (1989), Biotechnol. Bioeng., 34, 731 - 740.

9. Michalski H., Kaczmarowicz G., Rymarczyk T., (1984), Citric acid biosynthesis in the air-lift external-loop bioreactor, Mat. 3 Europ. Kongresu Biotechnologii, Monachium, II – 283.
10. Eikmeier H., Rehm H.J., (1984), Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 365 – 370.
11. Kaczmarowicz G., Michalski H., Sokołowski A., (1985), Biosynteza kwasu cytrynowego w bioreaktorze pilotowym air-lift z cyrkulacją zewnętrzną, Mat. II Ogólnopol. Sesji Nauk. „Postępy Inżynierii Bioreaktorowej”, Łódź, 68 – 79.
12. Leśniak W., Podgórski W., Pietkiewicz J., (1985), Wnikanie tlenu w bioreaktorze air-lift o poj. 26 m³ w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego, Mat. II Ogólnopol. Sesji Nauk. „Postępy Inżynierii Bioreaktorowej”, Łódź, 81.
13. Głuszcz P., Starzak M., Michalski H., (1992), Hydrodynamics and oxygen transfer in *A. niger* fermentations in a pilot-plant air-lift bioreactor, Mat. Miedzynar. Konf. “Biotechnology in Central Europ. Initiative Countries”, Graz, Austria, P60.
14. Starzak M., Głuszcz P., Michalski H., (1990), Biotechnologia, 4(10), 28 – 38.
15. Głuszcz P., Michalski H., (1993), Modelling of oxygen transfer in external-loop *air-lift* bioreactor during *A. niger* cultivation, Mat. 6 Europ. Kongresu Biotechnologii, Florencja, 159.
16. Nowakowska-Waszczyk J., Sokołowski A., (1987), Appl. Microbiol. Biotechnol., 26, 363 – 371.
17. Głuszcz P., Starzak M., Michalski H., (1988), Acta Biotechnol., 8, 117 – 129.

Engineering aspects of the *A. Niger* cultivation in a tower *air-lift* bioreactor

Summary

Changes of the main hydrodynamical and oxygen transfer parameters during *A. niger* cultivation in a pilot plant external-loop *air-lift* bioreactor were investigated. The final average concentrations of biomass and citric acid obtained in experimental fermentations were 10.5 g/l and 96.6 g/l, respectively. Significant influence of the increasing biomass concentration on the apparent viscosity of the broth, gas holdup, liquid velocity and volumetric oxygen transfer coefficient was found.

key words

air-lift bioreactor, *A. niger* cultivation, citric acid biosynthesis, apparent broth viscosity, gas holdup, liquid velocity, volumetric oxygen transfer coefficient.

Adres dla korespondencji:

Paweł Głuszcz, Katedra Inżynierii Bioprocessowej, Politechnika Łódzka, ul. Wólczajska 175, 90-924 Łódź.