

INŻYNIERIA BIOREAKTORÓW

Celem ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z podstawowymi zagadnieniami dotyczącymi prowadzenia procesów biochemicznych w urządzeniach zwanych bioreaktorami.

Wstęp

Definicja oraz podstawowe typy bioreaktorów

Bioreaktorem nazywamy urządzenie, które służy do przeprowadzania procesów biochemicznych w warunkach kontrolowanych. W gruncie rzeczy definicję tą rozszerzyć można nie tylko na urządzenia ale także na każdy system, w którym do czynienia mamy z reakcjami biochemicznymi rozpatrując go jako całość lub dzieląc na elementy składowe. I tak komora osadu czynnego (KOCZ) jest bioreaktorem, pojedynczy kłaczek, komórka bakteryjna, a w niej – organella komórkowe. Śledząc niektóre procesy zachodzące na poziomie molekularnym, po kolejnych etapach doświadczeń dojść można do takiej kontroli procesu, aby przyniósł on nam pożądany efekt w skali przemysłowej - np. pozyskania produktu przemiany materii danego organizmu lub ich grupy.

Najszerze zastosowanie bioreaktorów na chwilę obecną, z uwagi na rosnące zapotrzebowanie mnożącej się populacji człowieka, obejmuje przemysł spożywczy. Z nim również wiążą się najstarsze typy bioreaktorów, czyli tzw. fermentory. Bioreaktory stosowane są również we wszelkich odmianach przemysłu chemicznego, inżynierii środowiska, energetyce i wielu innych.

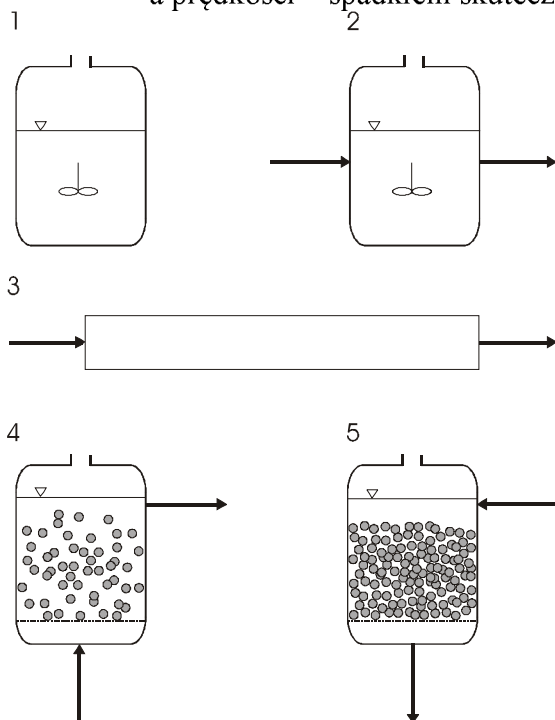
Bioreaktory odpowiadają tym samym prawom co reaktory chemiczne. Różnica polega jednak na złożoności systemu jakim jest żywy organizm, reakcje biologiczne są bardziej wrażliwe i mniej stabilne, zatem wymagają większej dbałości o kontrolę procesu oraz analizy większej ilości czynników niż w przypadku reakcji chemicznych.

Istnieje wiele podziałów bioreaktorów, podstawowy podział reaktorów używanych w inżynierii chemicznej, które stosuje się również dla procesów biologicznych obejmuje następujące typy:

1. Reaktor wsadowy (porcjowy) o idealnym wymieszaniu – reaktor ten, którego wielkości mogą się wahać od litrów do metrów sześciennych wyposażony jest w system mieszania, którego zadaniem jest utrzymanie tego samego stężenia danego czynnika w całej objętości reaktora. Cykl pracy takiego urządzenia to dopływ – reakcja – odpływ. W przypadku reaktorów biologicznych reaktor taki charakteryzuje się względnie niskim ryzykiem zanieczyszczenia, mutacji, niskimi kosztami inwestycyjnymi w porównaniu do reaktorów przepływowych o tej samej objętości oraz zwiększoną kontrolą fazy wzrostu. Praca w cyklach obniża jednak efektywność procesu ze względu na czas potrzebny na poszczególne etapy takie jak napełnianie, czyszczenie czy sterylizowanie. Niestacjonarny charakter przemian utrudnia również automatyzację całego systemu.
2. Reaktor przepływowy o idealnym wymieszaniu – reaktor również wyposażony jest w mieszadło utrzymujące równomierny rozkład stężenia w objętości komory reaktora. Do komory dopływa jednocześnie taka sama ilość medium jaka z niego odpływa, objętość utrzymywana jest więc na tym samym poziomie. Urządzenie takie w mikrobiologii nazywamy chemostatem. Jego użytkowanie wiąże się z większymi kosztami inwestycyjnymi, które rekompensowane są jednak

możliwością automatyzacji wielu procesów i brakiem bezproduktywnych etapów jak w reaktorze wsadowym. Niewątpliwą wadą tego typu urządzeń jest jednak zwiększone ryzyko zanieczyszczenia medium ze względu na drogą i trudną sterylizację w warunkach przepływu.

3. Reaktor o przepływie tłokowym – ten typ reaktora również może być wyposażony w systemy mieszające, ich zadaniem nie jest jednak utrzymanie jednolitego stężenia w reaktorze, a zapobiega sedymntacji i umożliwia kontakt składników mieszaniny reakcyjnej. Podzielony umownie na nieskończenie wiele elementów może być opisywany jako kaskada reaktorów o pełnym wymieszaniu. Zaletą takiego systemu jest zwiększona efektywność reakcji związana z kinetyką reakcji biochemicznych. Ta sama objętość reaktora tłokowego w porównaniu do reaktora przepływowego o pełnym wymieszaniu daje lepszy efekt w związku z wyższym stężeniem przy wejściu do reaktora tłokowego. Wpływa ono na szybkość reakcji – w reaktorze przepływowym stężenie jest natychmiast uśredniane.
4. Reaktor ze złożem fluidalnym – reaktor wypełniony jest złożem, które unoszone jest za pomocą pompowanego gazu lub wraz z przepływem medium reakcyjnego. Gaz i medium przepływać mogą przeciwnieprądowo lub współprądowo. Na złożu immobilizowane mogą być enzymy czy mikroorganizmy. Zaletami tego typu rozwiązania są, jednolity rozkład temperatury dzięki możliwości ciągłego mieszania złoża i medium oraz możliwość prowadzenia procesu w sposób ciągły. Niewątpliwą wadą są duże koszty eksploatacyjne i inwestycyjne związane z pompowaniem powietrza, medium, zwiększonym ryzykiem mechanicznego uszkodzenia płaszcza (a więc i droższym materiałem do jego wykonania), koniecznością zwiększenia objętości oraz separacji wypłukiwanego złoża.
5. Reaktor z wypełnieniem – zasada działania tego typu reaktora jest zbliżona do reaktora fluidalnego, z tym że wypełnienie osadzone jest na ruszcie lub stanowi element konstrukcyjny. Stosowane są tutaj różne wypełnienia charakteryzujące się zróżnicowaną powierzchnią kontaktu oraz oporami przepływu. W przypadku bioreaktorów do czynienia mamy tutaj ze złożami zraszanymi, medium spływa grawitacyjnie. Wzrost ciśnienia mógłby uszkodzić wrażliwy materiał biologiczny, a prędkości – spadkiem skuteczności.



Rys. 1. Podstawowe typy reaktorów:
1 – reaktor wsadowy o pełnym wymieszaniu,
2 – reaktor przepływowy o pełnym wymieszaniu,
3 – reaktor o przepływie tłokowym, 4 – reaktor fluidalny, 5 – reaktor z wypełnieniem.

Kontrola procesu

Pomiędzy poszczególnymi składnikami mieszaniny reakcyjnej takimi jak organizmy, komórki tkanek, mikroorganizmy, produkty ich metabolizmu, składniki podłoża, czy nośnikami zachodzi szereg reakcji. Biorąc pod uwagę wszystkie przemiany termodynamiczne bioreaktor tworzy skomplikowany system, którego kontrola wymaga stałego monitorowania wielu parametrów takich jak:

- strumień objętości,
- temperatura,
- pH,
- natlenienie,
- szybkość mieszania,
- obecność piany,
- obecność substratów,
- podaż mikro i makroelementów, koenzymów,
- usuwanie produktów ubocznych i końcowych.

Do kontroli natężenia przepływu stosowane są pompy i zawory, bioreaktory wyposażone są zwykle w płaszcze, za pomocą których utrzymywana jest odpowiednia temperatura. Mogą to być płaszcze elektryczne lub wodne, umożliwiające również chłodzenie reaktora. Odczyn regulowany jest poprzez dozowanie odpowiednich ilości kwasów i zasad. Istnieje szereg sposobów mieszania, w zależności od doboru mieszadła (mechaniczne, pneumatyczne, hydrauliczne) uzyskuje się również inne natlenienie podłoża. Powstająca w procesach mikrobiologicznych piana może być usuwana tzw. zbijaczami piany – umieszczane nad roztworem, obrotowe elementy, które rozbijają pianę. Innym, rzadko stosowanym rozwiązaniem jest jej kierowanie do cyklonów oraz zawracanie powstającej w nich cieczy do układu.

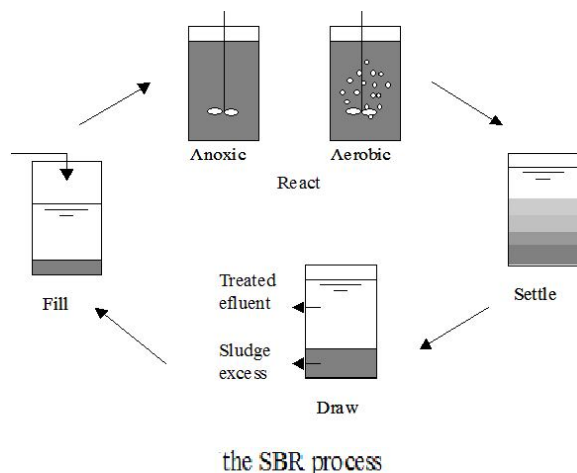
Wybrane przykłady bioreaktorów

Na podstawie omówionych podstawowych typów reaktorów konstruowane są ich kompilacje w mniejszym lub większym stopniu odpowiadające typowi któregoś z nich. Szereg tego typu urządzeń znajduje zastosowanie w dziedzinach takich jak, produkcja farmaceutyków, związków chemicznych, paliwa, bioremediacja, technologia wody i ścieków, desulfuryzacja węgla, biohydrometalurgia i wiele innych.

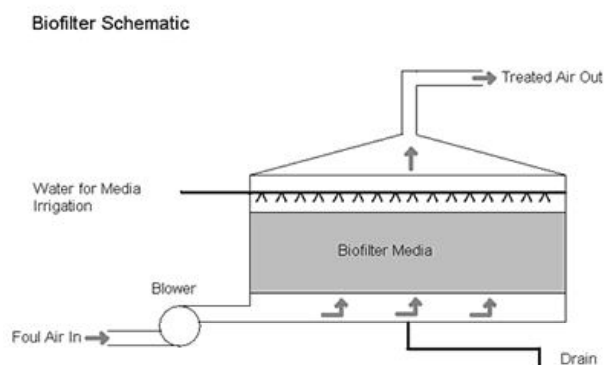
Najlepiej poznanymi reaktorami w inżynierii środowiska są niewątpliwie urządzenia stosowane w technologii wody i ścieków. Stosuje się tu niemal wszystkie rodzaje reaktorów. Jako przykład służyć może reaktor typu SBR (Sequencing Batch Reactor). Reaktor ten jest reaktorem wsadowym o cyklicznym trybie pracy. Każdy pracować on może zarówno w warunkach aerobowych jak i anaerobowych lub anoksycznych (przy odpowiednio dużej objętości komory – reaktory pracują przy ciśnieniu atmosferycznym). Cykl pracy takiego urządzenia składa się z następujących kolejno etapów:

- napełnianie reaktora – ścieki powoli wypełniają komorę reaktora, mieszanie odbywa się przy małej prędkości turbiny, napowietrzanie jest wyłączone,
- faza reakcji podczas napełniania – ścieki są mieszane i napowietrzane, następuje rozkład materii organicznej oraz nityfikacja, w tej fazie napowietrzanie może być wyłączone w celu podtrzymania warunków beztlenowych,
- faza reakcji (reaktor wypełniony),

- faza sedymentacji – mieszanie i/lub napowietrzanie zostają wyłączone, osad sedymentuje,
- faza dekantacji – sklarowane ścieki zostają odprowadzone z reaktora, osad natomiast kierowany jest do komory zagęszczania osadu.



Rys 2. Przebieg procesu w reaktorze typu SBR, źródło [5].



Rys.3. Schemat działania biofiltru. [6]

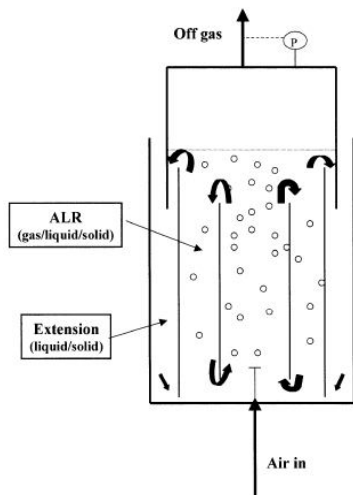
Schemat działania reaktorów typu SBR przedstawiono na rys 3. Warto tutaj dodać, że ze względu na wspomniane wcześniej wady reaktorów wsadowych, reaktory tego typu buduje się zwykle w ilości co najmniej z dwóch reaktorów, podczas gdy w dopływie w jednym z nich jest zamknięty, ścieki kierowane są do drugiego.

Innym, powszechnym typem bioreaktora jest złożo biologiczne (Rys. 3.) – rodzaj bioreaktora, w którym ścieki przepływają grawitacyjnie przez złożo na którym osadzone są mikroorganizmy. Jakkolwiek praca w takim złożu odbywa się w warunkach tlenowych tak gradient tego stężenia jest nierównomierny i mogą pojawiać się strefy beztlenowe, zarówno w przekroju całego złoża jak i błony biologicznej (podobne zjawisko występuje w kłaczkach osadu czynnego). Tradycyjne złoża biologiczne dzielą się na zraszane i spłukiwane w zależności od obciążenia hydraulicznego i obciążenia ładunkiem. Reaktory takie stosowane są głównie w małych oczyszczalniach ścieków.

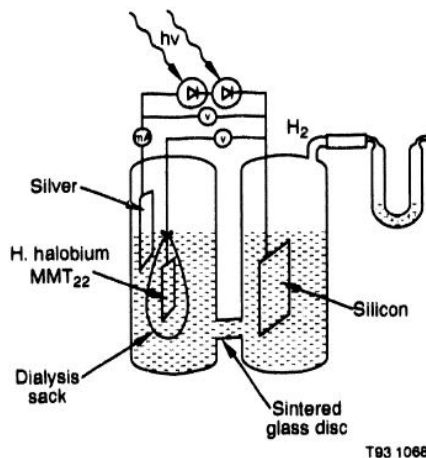
Często spotykanym rozwiązaniem w ostatnich czasach są również reaktory z tzw. podnośnikiem powietrznym (rys. 4.). Mowa tutaj o reaktorach, w których przepływ cieczy kontrolowany jest za pomocą tłoczonego do reaktora powietrza. Przykładem takiego rozwiązania jest reaktor, w którym powietrze tłoczone jest do umieszczonej centralnie rury. Poruszająca się ku górze ciecz zostaje napowietrzana, gaz ulatuje w górnej, otwartej części rury, natomiast ciecz przepływa do jej zewnętrznej części gdzie odbierany jest produkt reakcji. Reaktor taki stosowany może być – poza mikroorganizmami - również do hodowli komórek roślinnych i zwierzęcych. Jego zaletą jest prosta budowa, eliminacja mieszań i innych ruchomych elementów tradycyjnych bioreaktorów co ułatwia eksploatację i utrzymanie reaktora w czystości.

W niektórych bioreaktorach to nie czynniki chemiczne odgrywają główną rolę, a czynniki fizyczne, przykładem takich bioreaktorów są fotobioreaktory (rys. 5.) – wykorzystujemy w nich organizmy fotoautotroficzne. Ich budowa może być różna – od prostych konstrukcji z wąskimi komorami po wielkopowierzchniowe systemy. Najistotniejszym czynnikiem limitującym projekt takiego reaktora jest ograniczona penetracja promieniowania, zmienna w czasie ze względu na zmiany gęstości hodowli w bioreaktorze.

Hodowla glonów w takich bioreaktorach może mieć na celu pozyskanie biomasy wykorzystywanej w celach energetycznych, produktów przemiany materii organizmów fotosyntetyzujących, czy produkcji wodoru cząsteczkowego. Uzyskiwany może być w wyniku działania enzymu odwracalnej hydrogenazy w warunkach braku siarki lub w sprężeniu z procesami elektrochemicznymi.



Rys 4. Bioreaktor z podnośnikiem powietrznym [3].



Rys.5. Reaktor biofotoelektrochemiczny, zastosowanie elektrody umożliwia formowanie gazu z wodoru powstającego w wyniku działania pompy protonowej *Halobacterium halobium* [4].

Literatura

- [1] Williams J.A., Keys to bioreactor selections, CEP, march 2002, pp. 34-41.
- [2] Kleinstreuer C., Poweigha T., Modeling and Simulation of Bioreactor Process Dynamics, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 30/1984, pp. 91-143.
- [3] Turlock C.E., McIlwain M.E., Review of nonconventional bioreactor technology, U.S. Department of energy, Contract DE-AC07-76ID01570, September 1993.
- [4] Merchuk J.C., Airlift Bioreactors: Review of Recent Advances, The Canadian Journal of Chemical Engineering, Vol. 81, 2003, pp. 324-337.
- [5] <http://www.inma.ucl.ac.be/EOLI/>, ostatni dostęp: 24.09.09.
- [6] http://www.toronto.ca/water/wastewater_treatment/treatment_plants/ashbridges/odours.htm, ostatni dostęp: 24.09.09.

Wykonanie ćwiczenia

Aparatura

- Bioreaktor
- Zlewka 200 cm³
- próbówki chemiczne (20 szt.);
- pipeta automatyczna
- szkło: pipety o pojemności: 1, 2, 5 i 10 cm³, kolbki miarowe 10 cm³ i 25 cm³ (4 szt.),
- kolbka stożkowa, lejek, zlewki (2 szt.);
- łaźnia wodna 100°C;
- spektrofotometr;
- Szpatułka

- Bagietka

Odczynniki

- Glukoza
- Osad czynny lub zawiesina drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
- wzorcowy roztwór glukozy (4,0 mg/cm³);
- odczynnik **A**: 250 mM ZnSO₄ (rozpuścić 7,2 g ZnSO₄·7H₂O w 100 cm³ wody);
- odczynnik **B**: 85 mM K₃[Fe(CN)₆] (rozpuścić 2,80 g K₃[Fe(CN)₆] w 100 cm³ wody)
- odczynnik **C**: 1% roztwór DNS (rozpuścić 10 g kwasu 3,5-dinitrosalicylowego w 500 cm³ wody, dodać 200 cm³ 2M NaOH, 300 g winianu sodowo-potasowego i uzupełnić wodą do objętości 1000 cm³;
- 2M NaOH;
- 3M HCl;

1. Reaktor należy wypełnić przygotowanym wcześniej osadem czynnym lub zawiesiną drożdży w podłożu mineralnym w objętości równej 3 dm³.
2. Zapoznać się z bioreaktorem, kontrolą mieszadła, temperatury, dostarczania substratów, utrzymywania pH oraz odpowiedniego natlenienia.
3. Uruchomić mieszanie, pobrać próbkę zaciągając 25 cm³ do strzykawki i oznaczyć zawartość cukrów przed dodaniem substratu (szczegóły – punkt 2. instrukcji).
4. Przygotować w zlewce 100 cm³ roztworu glukozy o stężeniu 50 mg/cm³. Przygotowany roztwór umieścić w cylindrze o objętości 100 cm³. Za pomocą oprogramowania sterującego należy dodać roztworu glukozy do bioreaktora w takiej objętości (zwróć uwagę na podziałkę cylindra), aby jej stężenie w całej objętości osadu czynnego wyniosło 1 g/dm³.
5. Po kilkunastu sekundach należy pobrać pierwszą próbę i oznaczyć zawartość cukru. Ten pomiar, z uwagi na wyrównanie stężenia w całej objętości bioreaktora będzie traktowany jako pomiar w czasie 0. Kolejne próby należy pobierać w odstępach co 20 minut przez pierwszą godzinę oraz co 15 minut przez drugą godzinę. W tych samych odstępach należy również notować odczyn.
6. Po wykonaniu ćwiczenia uzupełnić bioreaktor podłożem mineralnym w objętości wynikającej z ilości pobranych prób. Przykład: 5 prób po 25 cm³ – uzupełnić reaktor 125 cm³ podłoża.

2. Ilościowe oznaczenie glukozy (oraz innych cukrów redukujących)

Odczynniki

- wzorcowy roztwór glukozy (4,0 mg/ cm³);
- odczynnik **A**: 250 mM ZnSO₄ (rozpuścić 7,2 g ZnSO₄·7H₂O w 100 cm³ wody);
- odczynnik **B**: 85 mM K₃[Fe(CN)₆] (rozpuścić 2,80 g K₃[Fe(CN)₆] w 100 cm³ wody)
- odczynnik **C**: 1% roztwór DNS (rozpuścić 10 g kwasu 3,5-dinitrosalicylowego w 500 cm³ wody, dodać 200 cm³ 2M NaOH, 300 g winianu sodowo-potasowego i uzupełnić wodą do objętości 1000 cm³;
- 2M NaOH;
- 3M HCl;

INŻYNIERIA BIOREAKTORÓW

- próbki chemiczne (20 szt.);
- pipeta automatyczna;
- szkło: pipety o pojemności: 1, 2, 5 i 10 cm³, kolbki miarowe 10 i 25 cm³ (4 szt.),
- kolbka stożkowa, lejek, zlewki (2 szt.);
- łaźnia wodna 100°C;
- spektrofotometr;

Przygotowanie próbek: Do 25 cm³ próby w zlewce dodać 1,25 cm³ odczynnika **A** oraz 1,25 cm³ odczynnika **B** i dokładnie wymieszać. Przy pomocy 2M NaOH doprowadzić pH do ok. 8 (wobec papierka wskaźnikowego lub korzystając z pH-metru). Zanotować całkowitą objętość użytego NaOH. Całość przesączyć przez sączek karbowany.

Przygotować dwie próbki (dwa powtórzenia) dla każdego pomiaru. Następnie do każdej dodać po 1 cm³ próby, 1 cm³ odczynnika **C** i po 5 cm³ wody destylowanej. Podobnie przygotować próbę odczynnikową używając 1 cm³ wody destylowanej zamiast próby.

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Uwaga ! Krzywą wzorcową przygotowuje jedynie pierwsza grupa ćwiczeniowa (poniedziałek, 29.11.10, godz. 9:15). Grupa ta, z uwagi na ograniczoną ilość czasu wykonuje pomiary ubytku glukozy tylko przez pierwszą godzinę (pozostałe grupy zgodnie z dalszą częścią instrukcji – prze dwie godziny)

Krzywą wzorcową sporządzić wg poniższej tabeli i przejść do punktu ‘oznaczanie cukrów’.

Roztwór glukozy [cm ³]	Odczynnik C [cm ³]	Woda [cm ³]	Stężenie glukozy, [mg/cm ³]
0	1,0	5,0	0,00
0,125	1,0	5,0	0,50
0,250	1,0	5,0	1,00
0,500	1,0	5,0	2,00
0,750	1,0	5,0	3,00
1,000	1,0	5,0	4,00

Oznaczenie cukrów:

Zawartość wszystkich próbek dokładnie wymieszać, każdą przykryć kawałkiem folii aluminiowej lub korkiem, wstawić na 5 min do wrzącej łaźni wodnej. Następnie próbki ochłodzić w strumieniu zimnej wody i zmierzyć absorbancję przy długości fali 550 nm, stosując jako próbę odniesienia próbę odczynnikową. Na podstawie krzywej wzorcowej wykreślonej w oparciu o absorbancję roztworów wzorcowych obliczyć ilość cukrów redukujących w badanym soku w g/100 cm³ i mmol/100 cm³.

Sprawozdanie

Opracowanie wyników:

Otrzymane wyniki stężenia glukozy oraz pH należy przedstawić w funkcji czasu na wykresie dwuosiowym. W wynikach należy koniecznie uwzględnić ilość cukru w próbce osadu czynnego oznaczoną przed dodaniem roztworu glukozy !

Opcjonalnie (podaje prowadzący):

Określić rząd reakcji, początkową szybkość reakcji oraz wyznaczyć stałą szybkości.