

- ubytek aktywności w wyniku denaturacji enzymów lub działania inhibitorów,
  - zmniejszania się powierzchni kontaktu między substratami a materiałem biologicznym w wyniku pokrywania nośnika różnymi substancjami lub nieregularności przepływu płynu przez reaktor,
  - zanieczyszczenie reaktora obcymi drobnoustrojami.
- Szybkość utraty aktywności biologicznej zależy od warunków prowadzenia procesu takich jak: temperatura, skład roztworu, rodzaju immobilizacji oraz własności materiału biologicznego.

## 8.4. Bioreaktory membranowe

Półprzepuszczalne membrany mogą spełniać w bioreaktorach kilka zasadniczych funkcji: służyć do oddzielenia biomasy (reaktory z recyrkulacją biomasy), wydzielania produktów przemian biochemicznych, unieruchomienia materiału biologicznego bądź oddzielenia przestrzeni reakcyjnych o różnych funkcjach. Bioreaktory membranowe można zasadniczo podzielić na dwie grupy: mikrobiologiczne bioreaktory membranowe, w których zachodzi wzrost drobnoustrojów i enzymatyczne bioreaktory membranowe, w których prowadzone są reakcje enzymatyczne.

### Mikrobiologiczne reaktory membranowe

Najczęściej wykorzystywaną funkcją membran w mikrobiologicznych reaktorach membranowych jest zatrzymywanie biomasy drobnoustrojów. Uzyskuje się dzięki temu zwiększenie stężenia drobnoustrojów w reaktorze, co zwiększa szybkość procesów biochemicznych oraz przeciwdziała wymywaniu biomasy, prowadząc do zwiększenia produktywności. Ograniczenia w stosowaniu technik membranowych związane są z zarastaniem membran (ang. *fouling*), a także nagromadzeniem komórek nieaktywnych.

Wykorzystanie membran do wydzielania produktów metabolizmu pozwala na efektywne prowadzenie hodowli w przypadku gdy produkty hamują wzrost drobnoustrojów. Z uwagi na spełnianie przez bioreaktor dwóch funkcji (hodowla i separacja) często tego typu procesy określa się mianem procesów zintegrowanych. Przykładem może być wykorzystanie reaktora membranowego do prowadzenia fermentacji mlekowej. Komórki bakterii mlekowych zatrzymywane są w przestrzeni reaktora, zaś kwas mlekowy przenika przez membranę i jest odprowadzany na zewnątrz. Bioreaktory membranowe zostały z powodzeniem wykorzystane do prowadzenia fermentacji etanolowej, produkcji kwasu cytrynowego, kwasu octowego oraz preparatów enzymatycznych. Usu-



wanie produktów fermentacji uzyskuje się, stosując membrany ultrafiltracyjne lub dialityczne, w których zachodzi ekstrakcja do rozpuszczalnika organicznego lub wody. W przypadku lotnych produktów fermentacji stosowane są techniki destylacji membranowej.

W procesach zintegrowanych wykorzystuje się bioreaktory, w których membrana służy do rozdzielenia przestrzeni reakcyjnych o różnych funkcjach. Przykładem może być prowadzenie mikrobiologicznej denitryfikacji wody pitnej. Półprzepuszczalna membrana oddziela komorę, przez którą przepływa oczyszczana woda, od komory, w której przebiega beztlenowy wzrost bakterii denitryfikujących. Azotany przenoszone są przez membranę i w komorze mikrobiologicznej ulegają redukcji do azotu cząsteczkowego (patrz rozdz. 21.3).

W hodowlach komórek roślinnych i zwierzęcych bioreaktory membranowe służą do oddzielenia przestrzeni, w której znajdują się komórki, od przestrzeni, przez którą przepływają substraty. Dzięki takiemu rozwiązaniu komórki nie są narażone na oddziaływanie naprężeń hydrodynamicznych. Uzyskuje się także możliwość precyzyjnego dozowania substratów.

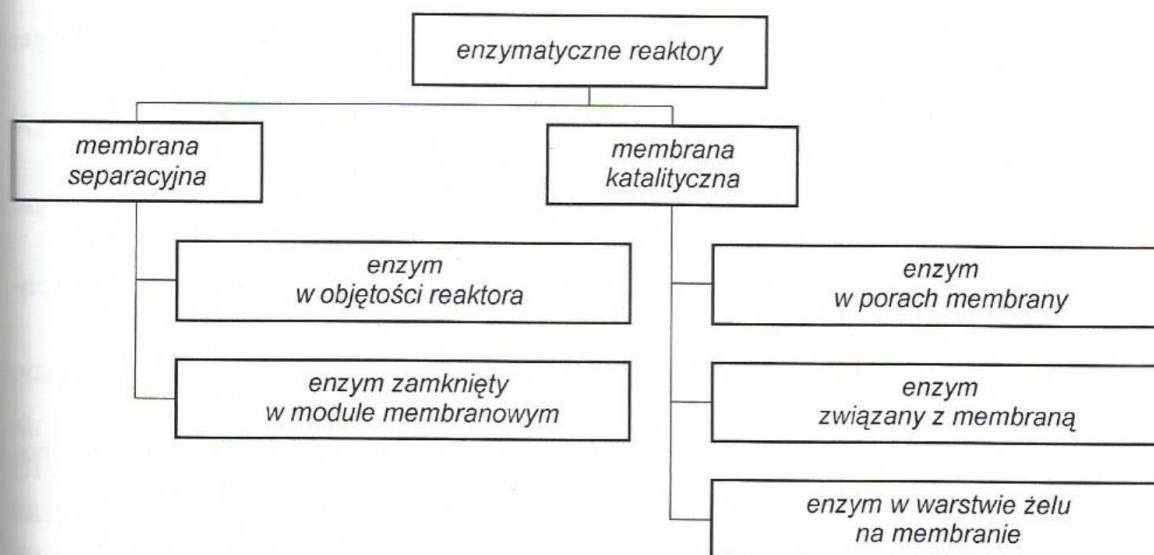
Odrębną grupę zastosowań membran w hodowli drobnoustrojów stanowią techniki membranowego napowietrzania. Polegają one na wykorzystaniu odpowiednich membran hydrofobowych do doprowadzania tlenu do brzezki. Tlen rozpuszcza się bezpośrednio w płynie hodowlanym, nie tworząc odrębnej fazy rozproszonej (pęcherzyków) – z tego względu często techniki te określa się mianem napowietrzania bezpęcherzykowego. Metody te charakteryzują się wysoką efektywnością energetyczną oraz pozwalają uniknąć niedogodności tradycyjnego, pęcherzykowego systemu napowietrzania. Niedogodności te związane są z powstawaniem aerozoli podczas pęknięcia pęcherzy powietrza na powierzchni cieczy oraz desorpcją lotnych substancji w cieczy.

### **Enzymatyczne reaktory membranowe**

Na rysunku 8.8 przedstawiono ogólną klasyfikację membranowych reaktorów enzymatycznych. Wyróżniamy reaktory, w których membrana służy do zatrzymywania materiału biologicznego w przestrzeni reakcyjnej i separacji produktów reakcji oraz reaktory, w których membrana służy jako nośnik unieruchomionego materiału biologicznego.

Funkcje separacyjne membran wykorzystywane są do zatrzymywania preparatów enzymatycznych w reaktorze, co umożliwia prowadzenie ciągłych procesów przepływowych. Wydzielanie produktów reakcji enzymatycznych w przypadku hydrolizy biopolimerów, takich jak: skrobia, kazeina, chitozan pozwala na uzyskanie wysokich wydajności procesu. Przez membranę przenikają jedynie drobnocząsteczkowe produkty hydrolizy, zaś biopolimer pozostaje w kontakcie z preparatem enzymatycznym, aż do pełnego rozkładu. Odbiór produktów reakcji przez membranę półprzepuszczalną pozwala na zwiększenie wydajności reakcji równowagowych. Usunięcie produktów z przestrzeni reak-

cyjnej powoduje korzystne przesunięcie równowagi. Techniki membranowe stosowane są np. do otrzymywania cukrowych estrów kwasów tłuszczowych lub strukturalnych triacylogliceroli.



Rys. 8.8. Klasyfikacja enzymatycznych reaktorów membranowych

Odrębną grupę stanowią reaktory membranowe, w których przeprowadzana jest reakcja z substratami nierozpuszczalnymi w wodzie (np. enzymatyczna hydroliza tłuszczu). Z jednej strony membrany przepływa faza organiczna (tłuszcz), zaś z drugiej strony woda, do której przechodzą wolne kwasy tłuszczowe. Membrana pozwala na kontrolowanie powierzchni kontaktu międzyfazowego i uniknięcie trudności technologicznych, jakie powstają w układach rozproszonych w wyniku tworzenia się trudnych do rozdzielenia emulsji.

Enzymy mogą być unieruchamiane na powierzchni membran lub wewnątrz polimeru tworzącego membranę. Podobnie jak w przypadku innych technik unieruchomiania materiału biologicznego, podstawowe korzyści z zastosowania membran katalitycznych związane są ze zwiększeniem stabilności preparatu enzymatycznego i możliwością prowadzenia procesów ciągłych. Często też membrana służy jako nośnik preparatu enzymatycznego oraz przegroda separacyjna, pozwalająca wydzielić produkty reakcji. Tego typu reaktory są stosowane do hydrolizy penicyliny G, syntezy polisacharydów, produkcji kwasu maleinowego oraz otrzymywania czystych enancjomerów.

### Literatura uzupełniająca

1. J.F. Bailey, D.F. Ollis: *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill, New York 1977.
2. M. Bodzek, J. Bohdziewicz: Zastosowanie technik membranowych w niektórych procesach biochemicznych. *Biotechnologia*, 2 (25), 1994, 114–137.



Kolejnym etapem jest wytrącanie kwasu szczawiowego. Dodaje się wodorotlenek wapnia, utrzymując pH poniżej 3, a następnie odfiltrowuje wydzielony szczawian wapnia.

Stosuje się dwie podstawowe metody wydzielania kwasu cytrynowego z roztworu: precypitację solami wapniowymi lub ekstrakcję. Bezpośrednia krystalizacja kwasu cytrynowego z płynu pofermentacyjnego jest mało wydajna.

Na rys. 12.2 przedstawiono schemat ideowy wydzielania kwasu cytrynowego przez precypitację. Metoda polega na dodaniu do roztworu wodorotlenku wapnia i wytrąceniu cytrynianu wapnia. Wodorotlenek wapnia dodaje się w temperaturze ok. 90°C aż do uzyskania pełnego zobojętnienia. Zanieczyszczenia w większości pozostają w roztworze. Osad po przemyciu poddawany jest działaniu kwasu siarkowego. Kolejne etapy oczyszczania to adsorpcja zanieczyszczeń na węglu aktywnym oraz oczyszczanie na kolumnie jonowymiennej. Końcowym etapem otrzymywania kwasu jest krystalizacja. Przeprowadza się ją w temperaturze 20–25°C w krystalizatorach próżniowych. Wydzielone kryształy jednowodnego kwasu cytrynowego są suszone i stanowią gotowy produkt.

Metoda ekstrakcji polega na zastosowaniu selektywnych rozpuszczalników nie mieszających się z wodą, np. oktanu, benzenu itp.

### 12.3. Kwas mlekowy

Kwas mlekowy ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ) jest w warunkach normalnych cieczą o temperaturze krzepnięcia 18°C i temperaturze wrzenia 119°C. Występuje on w dwóch formach enancjomerycznych L(+) i D(-) oraz jako mieszanina racemiczna. W organizmie ludzkim użytkowany jest jedynie L(+) kwas mlekowy. W przypadku stosowania w produktach spożywczych mieszaniny racemicznej następuje nagromadzenie enancjomeru D(-) kwasu mlekowego we krwi i moczu.

Kwas mlekowy znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym jako środek zakwaszający i konserwujący, zwłaszcza w produkcji konserw owocowych i rybnych. Wykorzystywany jest również w produkcji napojów, esencji, ekstraktów, soków owocowych, dżemów i syropów. Mleczany wapnia i żelaza o dużej czystości stosowane są jako farmaceutyki. W garbarstwie kwas mlekowy używany jest do namaczania i odwapniania skór. Spolimeryzowany L(+) enancjomer stosowany jest w przemyśle tworzyw sztucznych jako materiał pomocniczy. Roczne światowe zapotrzebowanie na kwas mlekowy wynosi ponad 30 tys. ton. Około 30% zapotrzebowania jest pokrywane przez syntetyczny racemat kwasu mlekowego. Pozostała ilość kwasu mlekowego produkowana jest metodami biochemicznymi.

### 12.3.1. Produkcja kwasu mlekowego

Kwas mlekowy zaczął być produkowany metodami mikrobiologicznymi pod koniec XIX wieku. Pierwsza instalacja została zbudowana w 1881 r. w USA. W 1895 r. uruchomiona została instalacja w Niemczech. Był to pierwszy proces, w którym wstępnie ogrzewano medium hodowlane w celu eliminowania niepożądanych mikroorganizmów.

Stosuje się różne szczepy bakterii kwasu mlekowego, najczęściej szczepy należące do rodzaju *Lactobacillus*. Proces przebiega w warunkach beztlenowych, w temperaturze 45–50°C. Wysoka temperatura hodowli ułatwia utrzymanie warunków jałowych. Wydzielany kwas mlekowy działa hamująco na wzrost bakterii kwasu mlekowego i z tego względu do podłoża dodaje się składnik buforujący w celu utrzymania aktywności drobnoustrojów.

Hodowlę prowadzi się stosując pożywki syntetyczne zawierające sacharozę oraz pożywkę organiczną (np. zarodki zbożowe). W większości technologii kwas mlekowy jest otrzymywany w postaci soli wapniowej. Podczas hodowli dodaje się do fermentorów zmieloną kredę (węglan wapnia). Przed filtracją biomasy, brzezka jest podgrzewana, aby zwiększyć rozpuszczalność mleczanu wapnia. Kwas mlekowy wydzielany jest w wyniku działania kwasem siarkowym. Wytrącony gips oddziela się przez filtrację.

Dalsze oczyszczanie kwasu mlekowego zależy od przeznaczenia. Stosuje się sorpcję na węglu aktywnym (odbarwienie), ekstrakcję, elektrodializę, oczyszczanie na kolumnach jonowymiennych. Produkt handlowy zawiera zwykle 60–50% kwasu mlekowego. Stosuje się także oczyszczanie kwasu mlekowego przez ekstrakcję. Inna technika polega na estryfikacji kwasu mlekowego (etanolem lub metanolem), oczyszczeniu estru przez rektyfikację i hydrolizie estru.

### 12.3.2. Konserwowanie w wyniku fermentacji mlekowej

Kwas mlekowy używany jest jako środek konserwujący. Niektóre produkty można konserwować bezpośrednio wykorzystując natywne kultury bakterii kwasu mlekowego. Należą do nich: kapusta kiszona, ogórki kiszane oraz kiszonki paszowe.

#### Kapusta kiszona

Kapusta kiszona jest produktem spożywczym uzyskiwanym w wyniku fermentacji mlekowej białej kapusty.

Do poszatkowanej kapusty dodaje się sól kuchenną w ilości 2–2,5%. Proces prowadzony jest w warunkach beztlenowych. Fermentacja trwa co naj-