

بررسی تأثیر عوامل مختلف بر عملکرد بیوراکتور بستر آکنده حالت جامد

دکتر زهره حمیدی اصفهانی، دکتر سید عباس شجاع الساداتی، دکتر ابراهیم

واشقانی فراهانی، دکتر سید مجتبی صدرعاملی

عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه صنایع غذایی

Hamidy_z@modares.ac.ir

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی تأثیر دمای کشت، سرعت هوادهی و افزایش هدایت حرارتی بر روی رشد قارچ در بیوراکتور بستر آکنده حالت جامد است. علیرغم رشد بیشتر قارچ *اسپرژیلوس نایجر* در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، شیب های دمایی و رطوبتی نسبتاً شدید و رشد غیر یکنواختی در محیط تخمیر مشاهده شد. اگر چه افزایش سرعت هوادهی رشد یکنواختی را در فرماتور فراهم نمود، لیکن پس از مدتی بدلیل کاهش شدید رطوبت، رشد متوقف شد. افزایش رطوبت اولیه سوبسترای تخمیری نیز به دلیل کاهش تخلخل سوبسترا تأثیر مثبتی در افزایش رشد ریزسازواره نشان داد. در حالیکه افزایش هدایت حرارتی از طریق بکارگیری جریان آب در جداره بیوراکتور رشد مناسب ریزسازواره را به همراه داشت.

نکات کلیدی: تخمیر حالت جامد؛ بیوراکتور بستر آکنده؛ قارچ رشته ای؛ شیب دمایی و رطوبتی

مقدمه

به رشد ریزسازواره ها (microorganism) بر روی سوبسترای جامد مرطوب در غیاب آب آزاد تخمیر حالت جامد (solid state fermentation یا SSF) گویند [۱]. در سالهای اخیر این نوع تخمیر به عنوان جایگزینی برای تخمیر غوطه ور (submerged fermentation) در تولید فراوردهای بیوتکنولوژی مطرح است [۵-۲]. بعضی از مزایای تخمیر حالت جامد نسبت به تخمیر غوطه ور عبارتند از: استفاده از سوبسترای ساده و ارزانتر (معمولاً ضایعات کشاورزی)، حجم کمتر بیوراکتور به ازای مقدار مشخصی سوبسترا، هزینه سرمایه گذاری کمتر، بازدهی حجمی بالاتر، ساده بودن فرایند پایین دستی [۶ و ۷]. علیرغم توان بالقوه این فرایند، کاربرد تجاری SSF محدود است که علت اصلی آن مشکلات مربوط به صنعتی کردن بیوراکتورها است [۸]. مشکل اساسی در مسیر صنعتی کردن این نوع تخمیر، حذف حرارت تولید شده توسط فعالیت متابولیکی ریزسازواره ها

است [۹ و ۱۰]. حذف حرارت بدلیل هدایت حرارتی پایین سوبسترا براحتی انجام پذیر نمی باشد. بسته به نوع فرماتور این شیبهها ممکن است باعث معضلاتی چون کاهش بهره وری توده زیستی و متابولیتهای مطلوب، شود. هوادهی اجباری روشی مناسب برای کاهش مقاومتهای انتقال حرارت و جرم شناخته شده است [۱۳-۱۱، ۹]. بنابراین بیوراکتورهای بستر آکنده که از هوادهی اجباری بمنظور تأمین اکسیژن و انتقال حرارت مناسب استفاده می کنند، سامانه هایی مناسب برای SSF می باشند. لیکن در این روش، خنک کردن تبخیری با کاهش رطوبت همراه می باشد که با پیشرفت تخمیر خشک شدن بستر را بدنبال خواهد داشت. بنابراین لازم است راهکاری ارائه شود که قادر به کنترل دما و رطوبت در بستر باشد. در این تحقیق تأثیر دمای محیط تخمیر، سرعت هوادهی و افزایش سرعت انتقال حرارت از طریق جداره فرماتور در کنترل شیب های دما و رطوبت بررسی شد.

نقاط مختلف فرمانتور در فواصل زمانی ۲ دقیقه ثبت می شود.

آماده سازی سوبسترا برای فرایند تخمیر

سبوس گندم (۵۵٪ رطوبت) سترون شده (۲۰ min، ۱۲۱°C) با سوسپانسیون اسپور مخلوط شد و سپس در بیوراکتور سترون ریخته شد. پس از راه اندازی سامانه، میزان اکسیژن و دی اکسید کربن هوای خروجی به همراه دما در نقاط مختلف فرمانتور بر روی رایانه ثبت می شد.

روش نمونه برداری و اندازه گیری درصد رطوبت محیط کشت

قبل از شروع تخمیر، از سوبسترای تلقیح شده نمونه برداری شد. بعد از خاتمه تخمیر نیز با خارج کردن سوبسترای متراکم، به آرامی از نقاط مختلف نمونه برداری شد. از روش وزن سنجی، درصد رطوبت نمونه ها بدست آمد، بطوریکه نمونه ها در ۸۰ درجه سانتیگراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند.

محاسبه شدت مصرف اکسیژن

شدت تنفس قارچ (شدت مصرف اکسیژن (OUR) (oxygen uptake rate) و شدت تولید دی اکسید کربن (CDPR) (carbon dioxide production rate) به عنوان معیاری از رشد در نظر گرفته شد. شدت مصرف اکسیژن و شدت تولید دی اکسید کربن از رابطه (۱) محاسبه شدند:

$$r = \frac{\Delta\%}{100} \cdot \frac{v}{22.414} \cdot \frac{1}{W} \quad (1)$$

در این رابطه، $\Delta\%$ تغییرات در غلظت حجمی O_2 یا CO_2 است و 22.414 حجمی است (بر حسب لیتر نرمال) که یک مول هوا (در شرایط متعارفی 273 K و 1 atm) اشغال می کند v (لیتر نرمال بر ساعت) سرعت هوادهی، W کیلوگرم سوبسترا و r شدت مصرف اکسیژن بر حسب مول اکسیژن بر کیلوگرم سوبسترا در ساعت است.

مواد و روشها

آسپرژیلوس نایجر با کد CBS ۱۲۲/۴۹ از کلکسیون ریزسازواره های هلند (Centraal Bureau voor Schimmelcultures) به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. اسپورها بر روی محیط PDA کشت داده شده و به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. توسعه تلقیح از کشت مادر حاصله بر روی محیط PDA انجام شد. سوسپانسیونهای اسپور در فریزر -80 درجه سانتیگراد تا زمان استفاده قرار گرفتند.

طراحی تجهیزات تخمیر

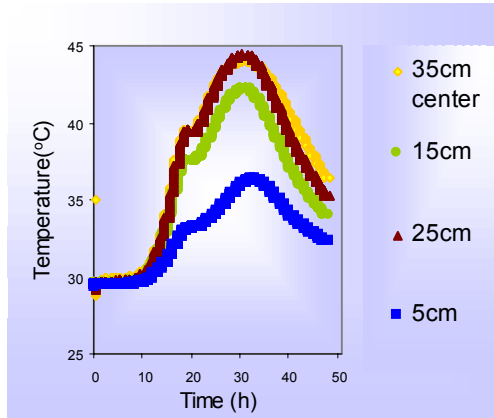
فرمانتور استوانه ای دو جداره با طول و قطر داخلی و خارجی بترتیب ۶۰، ۵ و ۸ سانتیمتر از جنس بروسیلیکات ساخته شد. طراحی فرمانتور به گونه ای بود که دما در دو جهت محوری و شعاعی در هشت نقطه بستر سوبسترا قابل اندازه گیری باشد. بطور خلاصه می توان نحوه عملکرد سامانه را مطابق شکل (۱) به این صورت بیان نمود:

هوا پس از عبور از جریان سنج جرمی ساخت شرکت بروکز هلند (Brooks instrument, Model 5850E) در مخزن ۱ لیتری NaOH نرمال، دی اکسید کربن خود را از دست می دهد. هوای خروجی وارد رطوبت زن شده و اشباع می شود. هوای خروجی از رطوبت زن، پس از گذشتن از صافی (0.2 μm PTFE filter, Whatman Inc.) و سترون شدن، وارد فرمانتور شده، و علاوه بر تامین اکسیژن مورد نیاز ریزسازواره و خارج سازی دی اکسید کربن ناشی از فعالیت متابولیکی، فرمانتور را نیز خنک می کند. هوای خروجی از فرمانتور وارد چگالنده آزمایشگاهی شده و آب همراه خود را از دست می دهد. هوای خروجی از چگالنده وارد دستگاه های اندازه گیری اکسیژن (O_2 Analyser, Servomex, Series 4100) و دی اکسید کربن (CO_2 Analyser, Servomex, Series 1440, The Netherlands) شده این نتایج به همراه دما در

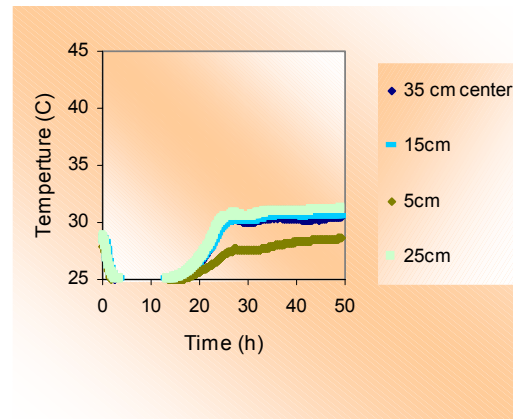
نتایج و بحث

شکل‌های (۱) و (۲) تغییرات دما را در جهت عمودی و محوری در بیوراکتور بستر آکنده حالت جامد معمولی (بدون استفاده از جریان آب خنک کننده در جداره بیوراکتور) در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتیگراد و سرعت هوادهی ۰/۵۵cm/s و در فواصل مشخصی از هوادهی نشان می دهند. حداکثر شیب دمایی در مرکز فرمانتور و در

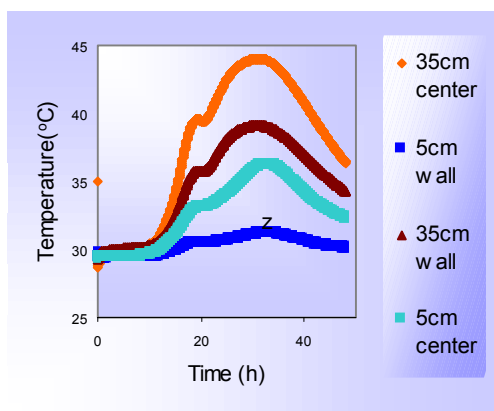
در مرکز بیوراکتور بدلیل افزایش دما و تبخیر آب، رطوبت تقریباً در مقدار اولیه ۰/۵۵ حفظ شد. شکل‌های (۳) و (۴) تغییرات دما را در جهت عمودی و محوری در بیوراکتور بستر آکنده حالت جامد در شرایط دمایی ۳۰ °C و سرعت هوادهی ۰/۵۵cm/s، نشان می دهند.



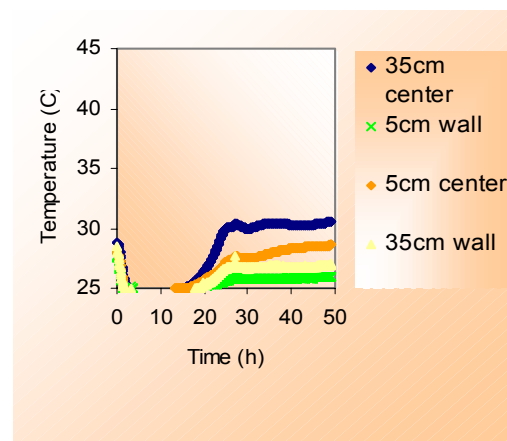
شکل ۳- تغییرات دما در جهت عمودی در مرکز بیوراکتور بستر آکنده حالت جامد در شرایط دمایی ۳۰ °C و سرعت هوادهی ۰/۵۵cm/s



شکل ۱. تغییرات دما در جهت عمودی در مرکز بیوراکتور بستر آکنده حالت جامد در شرایط دمایی ۲۵ °C و سرعت هوادهی ۰/۵۵cm/s



شکل ۴- تغییرات دما در جهت محوری در بیوراکتور بستر آکنده حالت جامد در شرایط دمایی ۳۰ °C و سرعت هوادهی ۰/۵۵cm/s

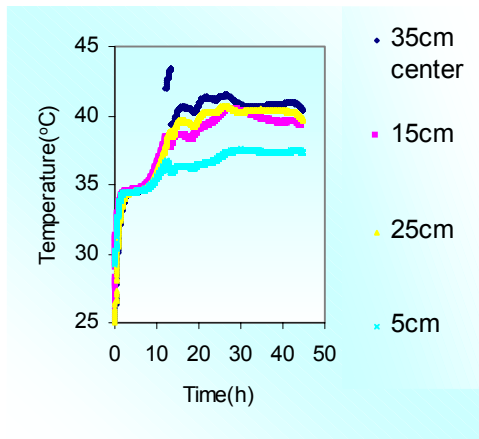


شکل ۲- تغییرات دما در جهت محوری در بیوراکتور بستر آکنده حالت جامد در شرایط دمایی ۲۵ °C و سرعت هوادهی ۰/۵۵cm/s

مقایسه شکل‌های ۱ و ۲ با شکل‌های ۳ و ۴ نشان می دهد که با افزایش دما در فرمانتور بدلیل سرعت رشد بالاتر (شکل ۹B در مقایسه با ۹A)، شیب دمایی چنان افزایش یافته است که سرعت هوادهی قادر به کاهش آن نمی باشد. افزایش دما در فرمانتور با رشد غیر یکنواختی همراه بود. از طرف دیگر،

جهت عمودی مشاهده شده و مقدار آن به $1^\circ\text{C}/\text{cm}$ رسید. علیرغم افزایش رطوبت تا ۰/۷۷ در جداره بیوراکتور،

علیرغم استفاده از هوای اشباع، کاهش چشمگیری در رطوبت مرکز بیوراكتور (رطوبت ۴۰٪ پس از دو روز تخمیر)، مشاهده شد. علت تبخیر آب در طول بستر را می توان به افزایش دما در طول بستر و افزایش ظرفیت حمل آب در هوا در دماهای بالاتر نسبت داد (۱۲).

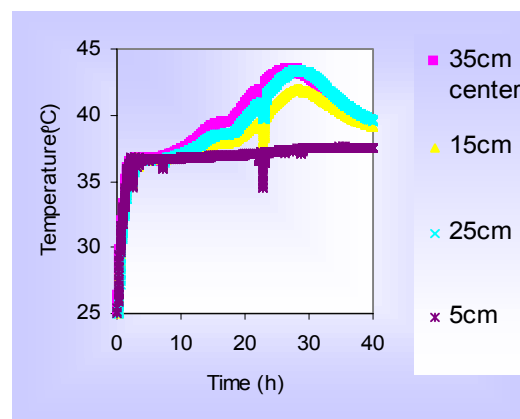


شکل ۶- تغییرات دما در جهت عمودی در مرکز بیوراكتور بستر آکنده حالت جامد در شرایط دمایی ۳۵ °C با سرعت هوادهی کنترل شده

سرعت هوادهی ۶/۳۶cm/s (شکل ۵) علیرغم کاهش شیب دمایی، باعث حذف مقدار زیادی رطوبت (کاهش ۵۷٪ از رطوبت اولیه) از بستر شد. همین امر موجب کاهش رشد در فرماتور شد (شکل ۹C). نتیجه حاصله مغایر با پیش مدل سانگسوراساک و میچل (۱۹۹۸) است زیرا مدل آنها پیش بینی می کند در فرماتور بستر آکنده با سرعت هوادهی ۱/۴cm/s پس از گذشت ۴۰ ساعت از تخمیر، بستر کاملاً خشک می شود.

برای جبران کاهش رطوبت در طول مدت تخمیر، از سوبسترای با رطوبت اولیه بالا (در حدی که رطوبت آزادی در بیوراكتور ظاهر نشود و تخمیر حالت جامد به غوطه ور تبدیل نشود) استفاده شد. کلیه شرایط مانند آزمایش قبلی بود با این تفاوت که رطوبت اولیه سوبسترا ۱۰٪ بیشتر از حالت قبل در نظر گرفته شد. در این آزمایش نیز ریزسازواره رشدی کاملاً یکنواخت داشت. بستر در طول تخمیر ۳۲٪ کاهش وزن داشت و رطوبت متوسط بستر از ۶۵٪ به ۶۱٪ کاهش یافته بود. توده زیستی تولید شده نسبت به دو روش قبلی کمتر بود (شکل ۹E)، که علت آن احتمالاً به کاهش میزان تخلخل بستر و کاهش سطح تماس اکسیژن مربوط می باشد.

به منظور کاهش میزان رطوبت خارج شده توسط جریان هوادهی با سرعت بالا، از هوادهی با سرعت متغیر استفاده شد. بطوریکه سرعت هوادهی با توجه به دمای ۳۵ سانتیمتری واقع در مرکز فرماتور تنظیم شد و دما در این نقطه از ۴۱ درجه سانتیگراد تجاوز نمی کرد. از کنترل کننده تناسبی - مشتقی (proportional-differential controller) استفاده شد.



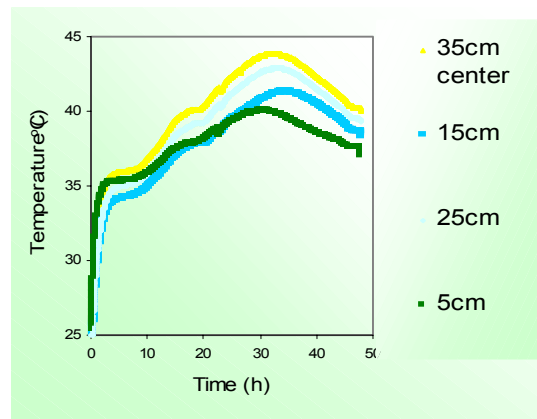
شکل ۵- تغییرات دما در جهت عمودی در مرکز بیوراكتور بستر آکنده حالت جامد در شرایط دمایی ۳۷ °C و سرعت هوادهی ۶/۲۶cm/s

شکل (۶) شیب دمایی را در جهت عمودی در مرکز فرماتور نشان می دهد.

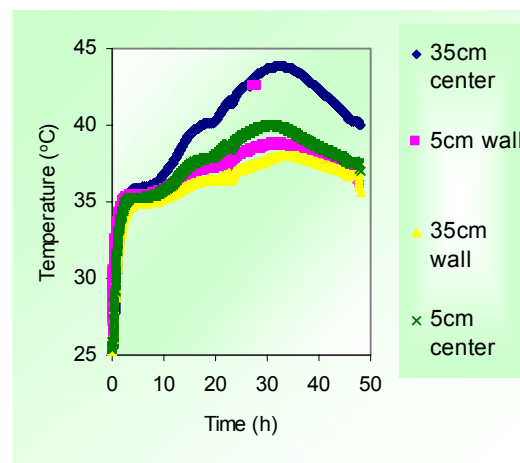
شکل (۶) شیب دمایی را در جهت عمودی در مرکز فرماتور نشان می دهد.

بزرگنمایی بیوراکتور، تأثیر هدایت حرارتی از طریق دیواره ناچیز است، به نظر می رسد تنها از بیوراکتوری می توان بهره جست که فاصله بین مرکز بستر (جایی که دما به حداکثر می رسد) و خنک کننده کم باشد.

بالا تری را در این بیوراکتور نسبت به کلیه روشهای قبلی (شکل ۹F) نشان می دهد.



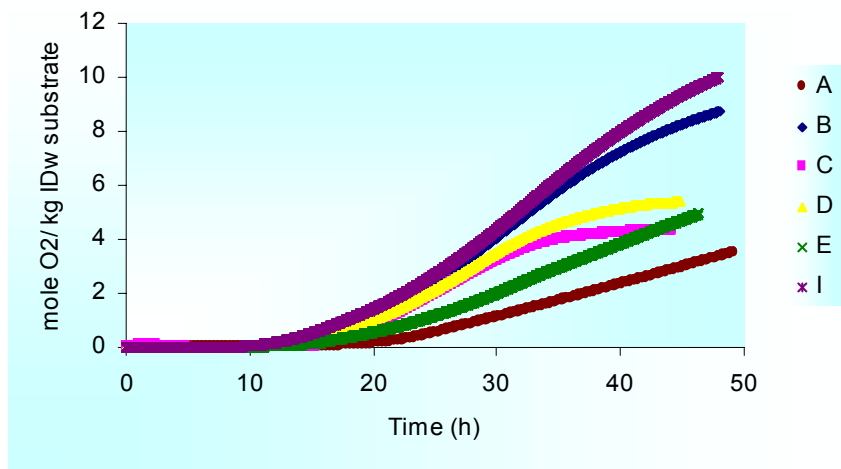
شکل ۷- تغییرات دما در جهت عمودی در مرکز بیوراکتور بستر آکنده حالت جامد در شرایط دمایی 36°C و سرعت هوادهی 0.10cm/s



شکل ۸- تغییرات دما در جهت محوری در بیوراکتور بستر آکنده حالت جامد با در شرایط دمایی 36°C و سرعت هوادهی 0.10cm/s

نتیجه گیری

نتایج آزمایشها نشان می دهند، تنها در روشی که از آب خنک کننده در جداره بستر استفاده می شود، بدلیل شیب دمایی کم و همچنین حفظ رطوبت در میزان لازم برای رشد (زیرا در این روش نیازی به استفاده از سرعت جریان بالای هوادهی برای کاهش شیب دما نیست)، رشد یکنواخت و بالایی در بیوراکتور مشاهده می شود. از آنجایی که عملا در



شکل ۹- مقایسه بین مقدار تنفس (معیاری از رشد) در فرمانتورهای مختلف

1. Moo-Young M, Moreira AR, Tengerdy RP. "Principles of solid substrate cultivation.",pp. 557-566 In: Filamentous Fungi. eds., Smith, J.E., Berry, D.R., Kristiansen, B.,Edward Arnold, London., 1983
2. Barrios - Gonzalez , J., Tomasini , A., Viniegra - Gonzalez, G., and Lopez , J., "Penicilin production by solid-state fermentation" Biotechnol. Letters, Vol.10, p. 793, 1988
3. Deschampa, F. and Huet, M.C., "B-Glucosidaze production by Aspergillus phoenicis in solid-state fermentation" Biochem. Eng. J., Vol. 6, p55, 1984
4. Fatemi, S.S. and Shojaosadati, S.A., " Citric acid production from apple pomace by using solid-state fermentation" Amirkabir, Vol.18, p44, 2000
5. Makkar, R.S. and Cameotra, S.S., "Biosurfactant production by micoorganisms on unconventional carbon sources" J. Surfact Detergents, Vol.2, p237, 1999
6. Doelle HW, Mitchell DA, Rolz CE., "Solid substrate cultivation" Barking, England: Elsevier science publishers, 1992
7. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D., "New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products" Process Biochemistry, Vol.35, p1153, 2000
8. Nagel F-JJ, Tramper J, Bakker MSN, Rinzema A., "Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation" Biotech. Bioeng., Vol.72, p219, 2000
9. Saucedo-Castaneda G, Gutierrez-Rojas M, Bacquet G, Raimbault M., "Heat transfer simulation in solid substrate fermentation" Biotechnol. Bioeng., 35: 802-8, 1990
10. Saucedo-Castaneda G, Lonsane BK, Krishnaiah MM, Navarro JM, Roussos S, Raimbault M., "Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by Schwanniomyces castellii in a solid state fermentation" Process Biochemistry, Vol. 27, p 97, 1992
11. Mitchell D, Krieger N, Stuart DM, Pandey A., "New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors" Process Biochemistry, Vol. 35 p1211, 2000
12. Sangsurasak P, MitchellD.A., "Validation of a model describing two dimentional heat transfer during solid state fermentation in packed bed bioreactors" Biotechnol. Bioeng., Vol.60, p739, 1998
13. Gutierrez-Rojas M, Amar Aboul Hosn s, Auria R, R. R, Favelah-Torres E., "Heat transfer in citric acid production by solid-state fermentation" Process Biochemistry, Vol.31 p363, 1996