Uzgoj na čvrstim supstratima u bioreaktorima s rotirajućim bubnjem

Štoler, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:702830

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Ivan Štoler

6146/BT

UZGOJ NA ČVRSTIM SUPSTRATIMA U BIOREAKTORIMA S ROTIRAJUĆIM BUBNJEM

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 2

Mentor: izv.prof. dr.sc. ***Vlatka Petravić Tominac***

Zagreb, 2015.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr.sc. Vlatki Petravić Tominac, na pomoći i savjetima pri pisanju ovog rada.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

UZGOJ NA ČVRSTIM SUPSTRATIMA U BIOREAKTORIMA S ROTIRAJUĆIM BUBNJEM

Ivan Štoler 6146/BT

Sažetak: Korištenje SSF-procesa vuče korijene daleko u prošlost, kada su se procesi koristili za dobivanje fermentirane hrane i pića. Glavna razlika između SSF i submerznih bioprocesa je činjenica da u SSF-procesima nema slobodne vode u obliku tekućine. Iako biotehnološka primjena SSF-procesa ima svoja ograničenja, u nekim slučajevima oni se nameću kao jedina metoda proizvodnje određenog proizvoda ili predstavljaju bolju opciju za proizvodnju, a mogućnost korištenja otpadnih lignoceluloznih sirovina čini ovaj proces dijelom koncepta održivog razvoja. U ovom završnom radu prikazane su osnovne karakteristike SSF-procesa i vrste bioreaktora koji se koriste. Opisana je konstrukcija i osnovne karakteristike bioreaktora s rotirajućim bubnjem i bioreaktora s bubnjem i miješanjem. Prikazani su primjeri procesa u kojima je ovaj tip bioreaktora primijenjen u različitim mjerilima. Ukratko su prikazane glavne značajke miješanja i fenomeni transporta u bioreaktorima s rotirajućim bubnjem.

Ključne riječi: rotirajući bubanjski bioreaktor, SSF proces

Rad sadrži: 47 stranica, 20 slika, 3 tablice, 23 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *izv. prof. dr.sc. Vlatka Petravić Tominac*

Rad predan: rujan 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate study Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing

SOLID-STATE FERMENTATION IN ROTATING DRUM BIOREACTORS

Ivan Štoler 6146/BT

Abstract: Usage of SSF-processes dates back into history, where they were used for production of fermented food and beverages. The main difference between submerged processes and SSF-processes is the fact that SSF-processes do not have any free flowing water. Although usage of SSF-processes has its limitations, in some cases they can be the only option for obtaining a certain product or can be a better option for production of a certain product, and usage of waste lignocellulosic raw materials puts SSF-processes in the concept of sustainable development. In this final work we will provide an insight into general characteristics of SSF bioprocesses and on types of SSF bioreactors. Furthermore, we will provide design characteristics and operating variables of bioreactors with rotating drums and those with stirred drums, along with their applications and transport phenomena which occur in such systems.

Keywords: rotating drum bioreactors, SSF process

Thesis contain: 47 pages, 20 figures, 3 tables, 23 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Vlatka Petravić Tominac, Associate Professor*

Thesis delivered: September 2015.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. Općenito o uzgoju na čvrstim supstratima.....2

2.1.1. Radni mikroorganizmi u SSF procesima.....3

2.1.2. Usporedba uzgoja na čvrstim supstratima i submerznog uzgoja.....5

2.1.3. Supstrati i sirovine za SSF 8

2.2. Izbor bioreaktora za SSF proces.....12

2.2.1. Podjela SSF bioreaktora.....16

2.3. Bioreaktori s rotirajućim bubnjem i bioreaktori s bubnjem i miješanjem.....20

2.3.1. Osnovne značajke dizajna i radne varijable bioreaktora s rotirajućim bubnjem.....21

2.3.2. Uvid u rad bioreaktora s rotirajućim bubnjem.....23

2.3.2.1. Primjena bioreaktora s rotirajućim bubnjevima u realnom mjerilu.....23

2.3.2.2. Primjena bioreaktora s rotirajućim bubnjem u pilot-postrojenjima.....25

2.3.2.2.1. Uzgoj biomase *Rhizopus oligosporus* na pšeničnim mekinjama u bioreaktoru s rotirujajućim bubnjem sa i bez podizača biomase.....25

2.3.2.2.2. Uzgoj biomase *Aspergillus oryzae* na pšeničnim mekinjama u bioreaktoru s rotirajućim bubnjem bez podizača biomase.....26

2.3.2.3. Primjena bioreaktora s rotirajućim bubnjem u malom mjerilu.....28

2.3.2.3.1. Uzgoj biomase *Aspergillus oryzae* na pšeničnim mekinjama i sintetskom gelu u bioreaktoru s rotirajućim bubnjem bez podizača biomase.....28

2.3.2.3.2. Uzgoj biomase *Rhizopus oligosporus* na kuhanim sjemenkama soje u bubanjskom bioreaktoru s jednim fiksiranim krajem.....30

2.3.2.3.3. Proizvodnja lignocelulolitičkih enzima pomoću *Phanerochaete chrysosporium* u bioreaktoru koji je varijacija bioreaktora s rotirajućim bubnjem..... 31

2.3.2.3.4. Korištenje sustava rotirajućih boca kao zamjena za rotirajući bubanjski bioreaktor..32

2.3.3. Miješanje i fenomeni transporta u bioreaktorima s rotirajućim bubnjem.....34

2.3.3.1. Režimi protoka krutina u bioreaktorima s rotirajućim bubnjem.....34

2.3.3.2. Režimi protoka plina u vršnom prostoru bioreaktora s rotirajućim bubnjem.....40

3. ZAKLJUČCI 44

4. LITERATURA.....45

1.UVOD

2. TEORIJSKI DIO

3. ZAKLJUČCI

4. LITERATURA

Uzgoj na čvrstim supstratima (eng. solid state fermentation, SSF) predstavlja vrstu bioprocesa čija je glavna karakteristika da nema slobodne vode u sustavu (u usporedbi sa submerznim procesima, SLF). SSF-procesi se sve više proučavaju zbog problema koji zahvaćaju modernu civilizaciju, poput zagađenja zemlje i potencijalne upotrebe bioremedijacije te pojave bolesti poput kravljeg ludila i potrebe za alternativnim izvorima animalne hrane (Durand, 2003).

Većina danas dobro uhodanih procesa su SLF-procesi, te se prednost SSF-procesima daje (Mitchell i sur., 2006) u slučajevima kada produkt treba biti u krutom stanju, kada se željeni produkt dobiva samo u SSF-procesu (ili u značajnijoj količini nego u SLF), kada društveni i ekonomski čimbenici ne dozvoljaju složenije procese, te kada je imperativ korištenje krutog otpada kao supstrata da bi spriječilo zagađenje okoliša. Korištenjem krutog otpada kao sirovine za SSF dobiva se biorazgradivi otpad koji u usporedbi s početnom sirovinom ima značajno manji utjecaj na okoliš u koji se odlaže.

Problem odlaganja otpadnih lignoceluloznih materijala postoji i u Republici Hrvatskoj, gdje se kao vrlo jeftini supstrati za procese uzgoja na čvrstim supstratima mogu koristiti npr. ostaci slame, kukurozovine, kukuruznih oklasaka i bukove piljevine (Buljubašić, 2012).

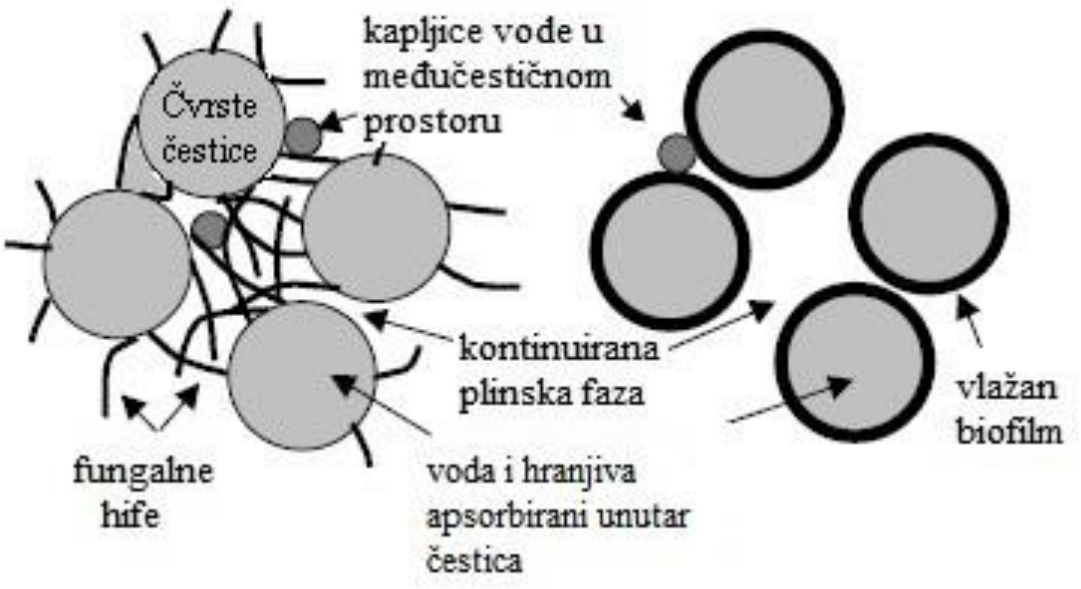
Stoga su ciljevi ovog završnog rada:

- Opisati konstrukciju i osnovne karakteristike bioreaktora s rotirajućim bubnjem i bioreaktora s bubnjem i miješanjem
- Navesti primjere eksperimenata provedenih s ovim tipovima bioreaktora u različitim mjerilima
- Ukratko prikazati glavne značajke miješanja i fenomene transporta u bioreaktorima s rotirajućim bubnjem.

2.1. Općenito o uzgoju na čvrstim supstratima

Uzgoj na čvrstim supstratima (eng. solid state fermentation, SSF) predstavlja uzgoj mikroorganizama na krutim materijalima koji imaju nizak udio slobodne vode, ili ju uopće ne sadrže. Za takav uzgoj je karakteristično da se voda u sustavu pojavljuje u tri oblika: kao vlaga unutar čestica krutog materijala, kao tanki sloj vodenog filma na površini čestica ili u obliku kapi između krutih čestica. Važna je činjenica da je vodena faza u takvom sustavu diskontinuirana, a većina međučestičnog prostora ispunjena je plinovitom fazom (Slika 1). Kruti materijal koji upotrebljavamo je najčešće izvor ugljika i drugih hranjiva u procesu, ali moguće je po potrebi provoditi i dodatnu prihranu. Pretežito se na takvim supstratima uzgajaju filamentozne gljive, dok se na nekim mogu uzgajati bakterije i kvasci. Većina SSF-procesa se provodi kao aeroban proces, tj sa aerobnim mikroorganizmima (Mitchell i sur., 2002).

Sam proces uzgoja na čvrstim supstratima sastoji se od istih operacija kao i fermentacijski proces u klasičnom smislu, a to su priprema supstrata, priprema inokuluma, sam uzgoj, i downstream procesi sa izdvajanjem i pročišćavanjem produkta (Mitchell i sur., 2002).



Slika 1. Karakteristike uzgoja na čvrstim supstratima: raspored vlažnih čvrstih čestica i plinovite faze u SSF-sustavima kod uzgoja filamentoznih organizama (lijevo), odnosno jednostaničnih organizama (desno) (Mitchell i sur., 2006).

SSF-procesi koriste vrlo jeftine sirovine koje često ne trebaju prethodnu sterilizaciju i zahtijevaju malu potrošnju energije (Fazenda i sur., 2008).

Često se u SSF-procesima kao supstrati koriste ostaci, proizvodi, ili nusproizvodi poljoprivredne proizvodnje usjeva kao npr. riža, soja, kukuruz, žito. Korištenje takvih sirovina često zahtjeva predobradu sirovina mehaničkim (tj fizikalnim), kemijskim ili biološkim sredstvima. Predtretmanom sirovine povećavamo dostupnost hranjiva unutar čestica za mikroorganizam, dok termalna obrada i kemijska hidroliza mogu olakšati enzimsku razgradnju makromolekula supstrata (Mitchell i sur., 2002).

Povijesno gledajući, procesi uzgoja na čvrstim supstratima se primjenjuju od davnina za dobivanje fermentiranih prehrambenih proizvoda i pića, većim dijelom na kontinentalnom dijelu Azije, a modernu primjenu imaju u proizvodnji enzima i biokemikalija (Ali i Zulkali, 2011).

2.1.1. Radni mikroorganizmi u SSF-procesima

Zbog specifičnih uvjeta u SSF-procesima, poput niskog aktiviteta vode i vrste supstrata, upotrebljavaju se različiti tipovi kultura, a Mitchell i sur. (2002) navode četiri opcije:

1. Monokultura
2. Definirana mješovita kultura
3. Sekvencijalna kultura
4. Nedefinirana mješovita kultura

Od tih tipova kultura, najčešće se koriste filamentozne gljive, ali i bakterije i kvasci imaju značajnu ulogu (Mitchell i sur., 2002). Primjeri proizvodnih procesa sa različitim radnim mikroorganizmima su pregledno prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Primjeri mikroorganizama i primjena za proizvodnju u SSF (Milenda i sur., 2011).

	Mikroorganizam	**SSF-proces/proizvod**
Bakterije	*Clostridium sp.*	Siliranje, hrana
	Lactobacillus sp.	
	Streptoccus sp.	Kompostiranje
	Pseudomonas sp.	
	Serratia sp.	
	Bacillus sp.	Kompostiranje, amilaze
Fungi	*Altemaria sp.*	Kompostiranje
	Penicilium notatum, P. roquefortii	Penicilin, sir
	Lentinula edodes (Shii-take gljiva)	Gljive za prehranu i imunološke preparate
	Pleurotus ostreatus (gljiva bukovača) *P. sajor-caju*	Gljive za prehranu
	Aspergillus niger	Stočna hrana, proteini, amilaze, limunska kiselina
	Rhizopus oligosporus	Tempeh, soja, amilaze, lipaze
	Aspergillus oryzae	Koji, hrana, limunska kiselina
	Amylomyces rouxii	Tape cassava, riža
	Beauveria sp., Metharizium sp.	Bioinsekticid, biološka kontrola
	Trichoderma sp.	Kompostiranje, bioinsekticid,biološka kontrola
	Phanerochaete chrysosporium (gljiva bijelog truljenja)	Kompostiranje, delignifikacija
	Rhizopus sp.	Kompostiranje, hrana, enzimi, organske kiseline
	Mucor sp	Kompostiranje, hrana, enzimi
	Monilia sp.	Kompostiranje
	Fusarium sp.	Kompostiranje, giberlini
	Aspergillus sp.	Kompostiranje, industrija, hrana
Kvasci	*Endomicopsis burtonii*	Tapai, cassava, riža
	Schwanniomyces castelli	Etanol, amilaze
	Saccharomyces cerevisiae	Hrana, etanol

Iz širokog spektra proizvoda SSF-procesa bitno je izdvojiti nekoliko njih, poput bioinsekticida i etanola tj. bioetanola, koji ima važnu ulogu kao gorivo derivirano iz obnovljivih izvora energije (kao što je biomasa) i kao takav se uklapa u danas veoma bitan koncept održivog razvoja i smanjenja zagađenja okoliša.

2.1.2. Usporedba uzgoja na čvrstim supstratima i submerznog uzgoja

Budući da uzgoj na čvrstim supstratima ima drugačije karakteristike od submerznog uzgoja, u tablici 1. vidimo sistematski prikaz glavnih karakteristika, tj njihovih razlika.

Također usporedbe radi, maseni udio krutih čestica u SSF-procesima kreće se od 20% do 70%, a kod submerznog procesa (eng. submerged liquid fermentation, SLF), isti je najčešće manji od 5% tj. u praksi koncentracija čvrste tvari rijetko prelazi vrijednost od 50 g/L (Mitchell i sur., 2002).

Iz navedenih podataka vidimo da je SSF-procese pogodnije provoditi u bioreaktorima drugačijeg dizajna i principa djelovanja od bioreaktorskih rješenja koja se primjenjuju pri submerznom uzgoju. Također je važno napomenuti da se pojam fermentacije za SSF-procese ne koristi u smislu anaerobne konverzije, već samo označava konverziju općenito, budući da su većina SSF-procesa aerobni.

Tablica 2. Usporedba uzgoja na čvrstim supstratima (SSF) i submerznog uzgoja (SLF) (Mitchell i sur., 2002).

Uzgoj na čvrstim supstratima (SSF)	**Submerzni uzgoj (SLF)**
Mala vlažnost pogoduje nastanku nekih produkata. Neprimjenjiv za uzgoj mikroorganizama koji trebaju slobodnu vodu.	Koristi se za dobivanje širokog spektra proizvoda sa širokim spektrom mikroorganizama. SLF proizvodnja je povoljnija većini proizvoda.
Medij je relativno jednostavan (npr. zrno) i nerafiniran. Može sadržavati sve potrebne hranjive sastojke, ili se dodatno vlaži otopinom minerala. Predobrada je jednostavna kao npr. mljevenje ili kuhanje. Međutim, supstrat može biti promjenljiv.	Sam medij za proizvodnju je često skuplji jer sadrži više visokoobrađenih sastojaka. Neobrađene sastojke često treba obraditi da bi se ekstrahirali i otopili nutrijenti. Postiže se bolja reproducibilnost postupka s dobro definiranim medijima.
Niska dostupnost vode smanjuje mogućnost rasta kontaminanata.	Kontaminanti mogu lako rasti zbog visokog aktiviteta vode.
Veća volumetrijska produktivnost usprkos nižim prinosima zbog koncentriranijeg medija i bioreaktora manjih volumena.	Niža volumetrijska produktivnost zbog razrjeđenosti medija i većih volumena bioreaktora.
Mogućnost postizanja visokih koncentracija produkata iz visokih koncentracija supstrata.	Visoke koncentracije supstrata mogu izazvati reološke problem, stoga postoji potreba za postavljanjem sustava za prihranu.
Niži tlakovi u sustavu pogoduju manjoj potrošnji energije za aeraciju. Prijenos plina je lakši jer čestice zauzimaju veću površinu.	Ponekad je potreban visok tlak zraka. Prijelaz plina iz plinovite u tekuću fazu je spor, te može biti limitirajući faktor.
Nemoguće je miješanje unutar čestica i rast može biti limitiran difuzijom nutrijenata.	Moguće je snažnije miješanje, a difuzija nutrijenata najčešće nije limitirajući faktor.
Može doći do pregrijavanja zbog otežanog odvođenja topline nastale u metabolizmu.	Olakšana regulacija temperature zbog visokog udjela vode i razrijeđenosti medija.
Regulacija procesa je otežana zbog poteškoća s on-line mjerenjem i poteškoća s mjerenjem koncentracije biomase. Otežano dodavanje sastojaka tijekom procesa.	Lako dostupni mnogi on-line senzori i razvijaju se novi. Lakše dodavanje sastojaka tijekom procesa za bolju regulaciju.

Tablica 2. (nastavak)

Uzgoj na čvrstim supstratima (SSF)	Submerzni uzgoj (SLF)
Downstream-operacije mogu biti jednostavnije jer su produkti koncentriraniji, ali ekstrakti mogu sadržavati supstrat.	Downstream-procesi zahtijevaju uklanjanje velikih volumena vode i skupi su, ali dobro definirane podloge olakšavaju pročišćavanje proizvoda.
Slabo poznati fenomeni transporta i kinetika rasta mikroorganizma.	Dobro istraženi fenomeni i kinetika, daju smjernice za dizajn i rad bioreaktora.

Općenito gledajući, nije upitna činjenica da su SLF procesi manje problematični od SSF-procesa (npr. prijenos topline je bolji, a homogenizacija je puno bolja), ali se SSF-procesima daje prednost u slučajevima kada (Pandey i sur.,1999):

1. Ekonomska situacija zahtjeva SSF-proces
2. Produkt nastaje isključivo u SSF-procesu (ili ga u tom tipu procesa nastaje mnogo više)
3. Korištenje krutih supstrata postaje imperativ proizvodnje (npr. nametnute zakonske regulative za smanjenjem korištenja organskih otapala zbog zagađenja)

2.1.3. Supstrati i sirovine za SSF

Sirovine za uzgoj na čvrstim supstratima uglavnom su poljoprivrednog porijekla. One se često samo minimalno obrađuju, tako da se krupniji poljoprivredni ostaci samo melju ili sjeckaju. Prema glavnom izvoru ugljika koje sirovine za SSF sadrže, Mitchell i sur. (2002) ih svrstavaju u 3 skupine - škrobne sirovine, lignocelulozne sirovine i sirovine koje sadrže uglavnom topljive šećere (Tablica 3.).

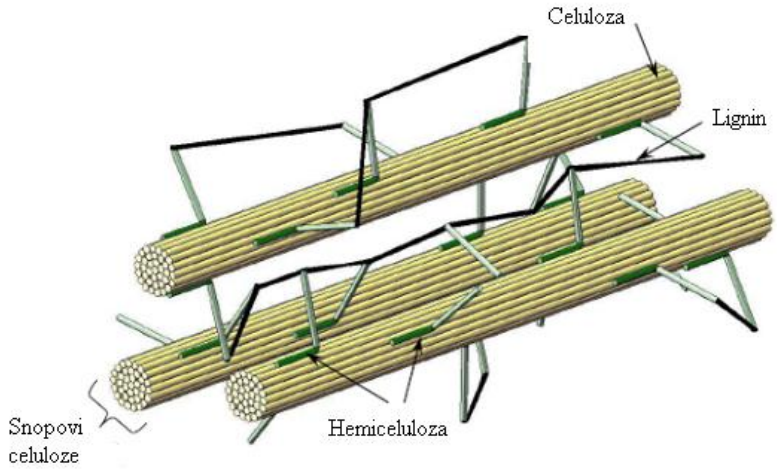
Tablica 3. Podjela sirovina za SSF prema glavnom izvoru ugljika koje te sirovine sadrže (Mitchell i sur., 2002)

Vrsta sirovina	**Glavni izvor ugljika**	**Primjeri**
Škrobne sirovine	škrob	riža, manioka (lat. *Manihot esculenta*, eng. cassava), pšenične i rižine mekinje koje još sadrže ostatke zrna, krupica manioke, kukuruzna krupica, sjemenke heljde, ostaci batata (eng. sweet potato), krupica banane
Lignocelulozne sirovine	celuloza i hemiceluloza	slama pšenice i riže, kukuruzovina, pšenične mekinje, pulpa šećerne repe i drvo
Sirovine koje sadrže uglavnom topljive šećere	visok udio topljivih šećera	trop, slatki sirak (lat. *Sorghum saccharatum*, eng. sweet sorghum), krmna i šećerna repa, otpatci ananasa, mahune rogača, pulpa kave

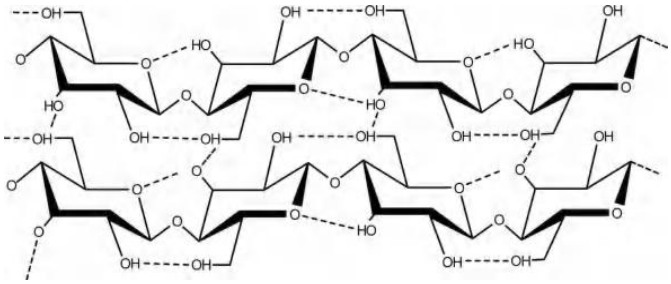
Makromolekule, koje se nalaze u strukturi svih navedenih čvrstih sirovina, služe kao izvor ugljika i energije za radni mikroorganizam ili naprosto osiguravaju inertni matriks, unutar kojeg su smještene manje molekule topljivih nutrijenata ili druge makromolekule (Mitchell i sur., 2002).

Samo mikroorganizmi koji posjeduju amilaze mogu koristiti škrob kao supstrat, a najbolje će ga razgraditi kombinacija glukoamilaza i α-amilaza (Mitchell i sur., 2002). Neke od škrobnih sirovina predstavaljaju kompletnu hranjivu podlogu za rast mikroorganizama, dok drugima treba dodati neke nutrijente. Za škrobne sirovine može biti potrebna predobrada različitom postupcima.

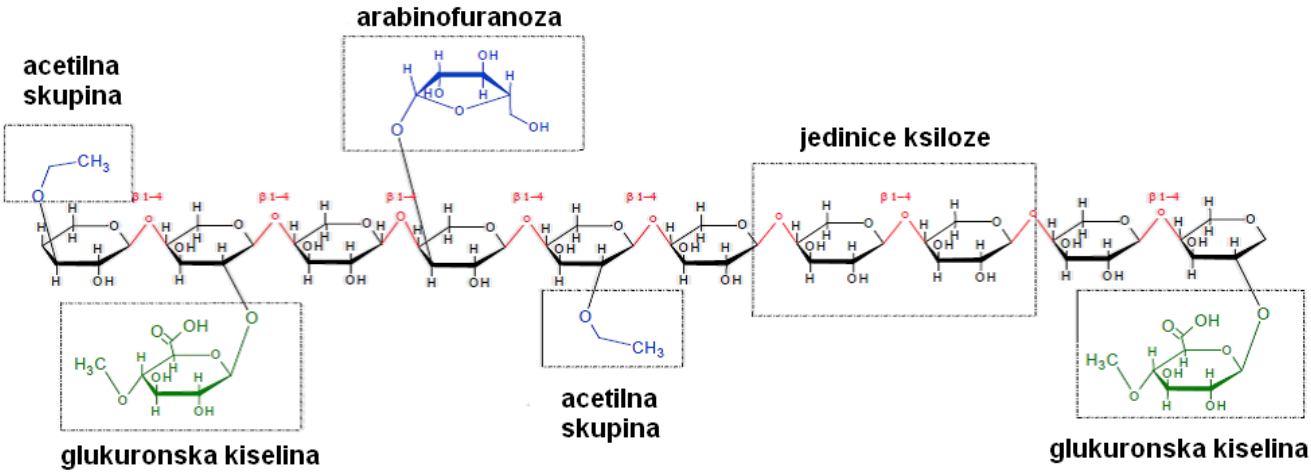
Posebno je zanimljiv lignocelulozni materijal zbog toga što se radi o obnovljivim sirovinama dostupnim u velikim količinama. Sastav ovih materijala ovisi o vrsti biljke od koje potječu, kao i o uvjetima rasta i metodama obrade. Lignocelulozni materijal se tradicionalno primjenjuje na različite načine koji se u današnje vrijeme ne mogu smatrati adekvatnima ili se naprosto tretira kao otpad i spaljuje (Howard i sur., 2003; Nigam i Pandey, 2009). Potrebno je razviti nove učinkovite postupke za korištenje lignoceluloznih obnovljivih sirovina kako bi lignocelulozni otpad mogao postati temelj proizvodnje koja će biti opravdana s ekološkog, ali i s ekonomskog stajališta. Istraživani su različiti SSF-procesi u kojima su korištene lignocelulozne sirovine. Glavni sastojci lignoceluloznih materijala su 3 prirodna polimera celuloza, hemiceluloza i lignin (Adapa i sur., 2009). Slika 2 prikazuje kompleksnu strukturu koju tvore ovi polimeri, a struktura svakog pojedinog polimera prikazana je slikama 3-5. Lignocelulozne sirovine obično zahtijevaju značajnu predobradu, da bi se razorila struktura molekula celuloze i lignina (Mitchell i sur., 2002).



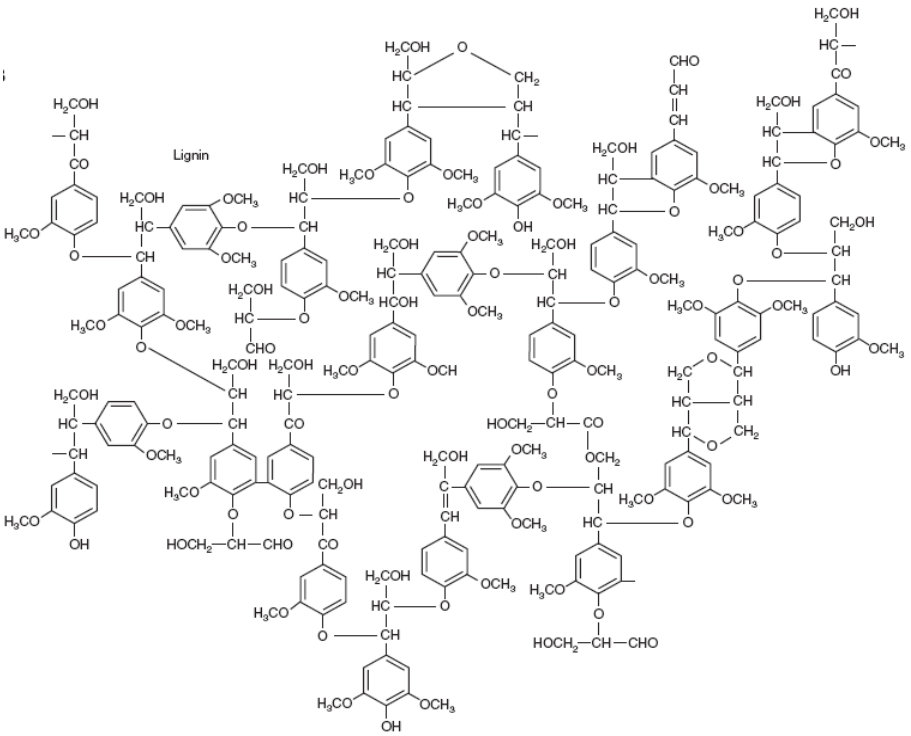
Slika 2. Struktura lignoceluloznih materijala (Adapa i sur., 2009).



Slika 3. Kemijska struktura celuloze (crtkane linije predstavljaju vodikove veze) (Kubicek, 2013).



Slika 4. Struktura ksilana koji je jedan od polimera u sastavu hemiceluloze (Mussatto i sur., 2009).



Slika 5. Struktura lignina (Brinchi i sur., 2013).

2.2. Izbor bioreaktora za SSF-procese

Svi procesi za uzgoj na čvrstim supstratima započinju kao mali i dobro uhodani laboratorijski procesi, ali prenošenje ovih procesa u veće mjerilo najvjerojatnije neće biti uspješno za proizvodnju u realnom mjerilu. Odabirom glavnog kriterija proizvodnje sužavamo izbor postojećih bioreaktorskih rješenja za ciljani proces. Logično bi bilo da bi prvi i najvažniji kriterij trebao biti ekonomska isplativost samog procesa, ali to se kod SSF-procesa pokazalo prilično teško odrediti - naime u praksi se pokazalo da je teško točno predvidjeti kapitalne i operativne troškove zbog nedovoljne istraženosti ove skupine procesa. Trenutno se ekonomske performanse bioreaktora mogu usporediti jedino tako da se izgradi i pokrene reaktor u realnom mjerilu i tada se tek vidi kakvi su kapitalni i operativni troškovi.

U nedostatku dovoljno informacija o ekonomiji SSF-procesa, cilj bi trebalo biti povećanje produktivnosti bioreaktora, odnosno povećanje proizvedene količine proizvoda (biomase ili metabolita). Drugim riječima, kriterij je brzina proizvodnje (kg proizvoda po m3 volumena bioreaktora). Naravno, ako sloj supstrata nije homogen, treba preračunati produktivnost na temelju odgovarajućih podataka. Potrebno je naći kombinaciju načina rada bioreaktora i trajanja fermentacije kojom se postiže najveća produktivnost (Mitchell i sur., 2006):

$$Pr = \frac{X_{harvest} - X_{initial}}{t_{process} \cdot V_{bioreactor}}$$

gdje je:

Pr - produktivnost [kg h^{-1} m^{-3}],

$X_{harvest}$ - količina biomase (ili proizvoda) na završetku procesa [kg],

$X_{initial}$ - količina biomase (ili proizvoda) na početku procesa [kg],

$t_{process}$ - ukupno vrijeme procesa [h],

$V_{bioreactor}$ - volumen bioreaktora [m^3].

Stoga pri izboru bioreaktora treba uzeti u obzir nekoliko ključnih čimbenika koji utječu na produktivnost. Za izbor SSF-bioreaktora su ključna tri kriterija (Mitchell i sur., 2006):

1. Koliko su radni mikroorganizam i željeni produkt osjetljivi na mješanje?
2. Kakva je ovisnost rasta mikroorganizma i sinteze ciljanog produkta o porastu temperature?
3. Kakva je potreba za aeracijom u procesu?

Odgovori na ova tri ključna pitanja dat će konkretne smjernice za odabir najbolje vrste SSF-bioreaktora obzirom na vrstu aeracije, mehanizme miješanja i uklanjanja topline.

S obzirom na miješanje, bioreaktori za uzgoj na čvrstim supstratima mogu biti kontinuirano mješani, isprekidano mješani ili potpuno statični (Mitchell i sur., 2006). Često ili stalno miješanje je poželjno ukoliko ga radni organizam tolerira, jer to pomaže transportu topline i kisika, poboljšavajući mogućnost kontrole uvjeta u sloju. Nadalje, evaporacijsko hlađenje može isušiti sloj do te mjere da se rast postane limitiran i zato je često poželjno dodati vodu tijekom fermentacije, a to se može samo ukoliko se sloj miješa. Miješanje također može dovesti do oštećenja hifa u fungalnim procesima, što bi moglo negativno utjecati na rast i nastajanje proizvoda. U nekim slučajevima može biti poželjno da konačni produkt bude „upleten“ zajedno s hifama, kao npr. u proizvodnji fermentirane hrane, međutim to će biti spriječeno miješanjem. Osim toga, miješanje može oštetiti čestice podloge ako one nemaju dovoljnu mehaničku čvrstoću ili može uzrokovati aglomeraciju ljepljivih čestica te u oba slučaja nastaje masa nalik tijestu ili pasti u kojoj je prijenos kisika znatno otežan. Nažalost, ravnoteža između pozitivnih i negativnih učinaka miješanja još uvijek nije nije dobro poznata.

Kontrola temperature supstrata unutar sloja je jedan od ključnih problema pri provođenju SSF-procesa u velikom mjerilu, posebno u onim procesima koji uključuju brzorastuće mikroorganizme (Mitchell i sur., 2006). U velikom mjerilu može biti teško spriječiti povišenje temperature do vrijednosti koje su vrlo štetne za mikroorganizam. Različiti bioreaktori razlikuju se i po učinkovitosti uklanjanja topline, a postignute temperature ovise o složenoj interakciji organizma, tipa reaktora i načina rada. Treba obratiti pažnju na odabir maksimalne dubine sloja.

Većina SSF-procesa uključuje aerobni rast. U osnovi postoje dvije opcije za aeraciju u SSF-procesima (Mitchell i sur., 2006). Jedan od njih je cirkulacija zraka oko sloja, ali bez prisilnog upuhivanja zraka. Drugi je prisilno upuhivanje zraka kroz sloj. Miješanje može utjecati na učinkovitost dobave svježeg zraka do čestica supstrata. Treba imati na umu da u prisilno aeriranom sloju zrak igra važnu ulogu pri uklanjanju topline.

Protoci zraka potrebni za adekvatno uklanjanje topline obično su više nego dovoljni da se izbjegnu ograničenja u opskrbi O_2 do površine čestica. Zato su brzine aeracije obično određene potrebom odvođenja topline (Mitchell i sur., 2006).

Toplina predstavlja jedan od ključnih ograničavajućih faktora u SSF-procesima, a problem je njeno odvođenje, tj hlađenje sustava. Postoje različite izvedbe koje omogućuju odvođenje topline, ali ona i dalje predstavlja problem u većim postrojenjima gdje ima vrlo štetan učinak na radni mikroorganizam (Mitchell i sur., 2006).

Nakon određivanja uvjeta aeracije i miješanja, pažnja se posvećuje dodatnim ključnim kriterijima za izbor adekvatnog bioreaktora. Ove dodatne kriterije navode Mitchell i sur. (2006):

1. Koliko je važan aseptičan rad?
2. U kojoj mjeri je neophodno ograničiti slobodan izlaza mikrobne biomase iz sustava?
3. Je li poželjan kontinuirani režim rada?
4. Jednostavnost punjenja i pražnjena bioreaktora i operativni troškovi istog?
5. Koja količina supstrata se planira fermentirati?
6. Hoće li bioreaktor također biti korišten i za jedan ili više koraka „downstream"-procesa?

Ako se provode SSF-procesi s brzorastućim radnim organizmima koji rastu u uvjetima niske vlage onda ovakvi uvjeti daju radnom organizmu prednost u odnosu nad kontaminantima. Npr. u mnogim fungalnim procesima, aktivnost vode je ispod vrijednosti optimalnih za bakterije, tako da ne postoje ozbiljni problemi s rastom bakterijskih kontaminanata, iako bi fungalni kontaminanti mogli izazvati probleme. U takvim se slučajevima može raditi bez stroge asepse. Međutim, u drugim slučajevima kada organizam raste polako, mora se paziti da bioreaktor bude dizajniran za sterilan rad kako bi se spriječile kontaminacije. U tom slučaju potrebno je sterilizirati bioreaktor prije rada, osigurati ispravno brtvljenje otvora, filtrirati ulazni zrak i aseptično dodavati otopine tijekom rada bioreaktora. Razni bioreaktori koji su do sada korišteni razlikuju se s obzirom na sposobnost aseptičnog rada (Mitchell i sur., 2006).

Općenito, transgenični organizmi nisu korišteni u SSF-procesima, a procesi rijetko uključuju opasne patogene (iako neki uključuju oportunističke patogene). Međutim, u mnogim SSF-procesima koriste se fungi i radnici mogu patiti od alergija ili drugih zdravstvene problema ako se spore oslobode u okoliš. Zato može špostojati potreba za zatvaranjem bioreaktora i primjenom filtara izlaznog zraka (Mitchell i sur., 2006).

Kontinuirani rad u dobro miješanom bioreaktoru nije korisna opcija za SSF (Mitchell i sur., 2006). Pri submerznom uzgoju se hranjive tvari dodaju u reaktor s kontinuiranim

miješanjem i raspodjeljuju se po cijelom reaktoru tako da postaju dostupne svim mikroorganizmima. U SSF-procesu, svaka čvrsta čestica dodana tijekom fermentacije treba se kolonizirati, što zahtijeva značajno vrijeme. Čak i ako su čestice već bile inokulirane u vrijeme dodavanja, može se očekivati da će inicijalni rast biti spor, osobito u reaktorima s miješanim slojem, a u izlaznom toku će ostati preveliki udio slabo koloniziranih čestica supstrata. Međutim, kontinuirani rad pri čepolikom kretanju ("plug-flow") svakako je moguć (Mitchell i sur., 2006).

Način rada može utjecati na to kako treba obaviti punjenje i pražnjenje: u kontinuiranim bioreaktorima punjenje i pražnjenje mora biti kontinuirano ili barem polukontinuirano, dok se pri šaržnom radu te operacije odvijaju u različito vrijeme. Ovim operacijama nije posvećivano puno pažnje. Opće načelo je da, ovisno o troškovima rada, može biti poželjno izbjeći one vrste bioreaktora koji zahtijevaju ručni rad pri punjenju i pražnjenju (Mitchell i sur., 2006).

Dimenzije bioreaktora određene su volumenom podloge koju moraju sadržavati u bilo kojem trenutku. Ovo ovisi o masi supstrata i nasipnoj gustoći sloja. Dopuštena visina sloja može biti ograničena mehaničkom čvrstoćom čestica supstrata (Mitchell i sur., 2006).

Ponekad može biti poželjno da se bioreaktor koristi u daljnjim koracima obrade, bilo da se u njemu osuši sloj podloge ili da se ekstrahira proizvod iz sloja podloge, čime se ostvaruje ušteda vremena i financijskih sredstava.

2.2.2. Podjela SSF bioreaktora

Postoji mnogo vrsta bioreaktora koje se koriste za SSF-procese te se njihovi nazivi razlikuju od autora do autora. Prema Mitchell i sur. (2006), bioreaktori su podijeljeni u četiri osnovne grupe na temelju sličnosti u principu djelovanja i dizajnu te prema načinu kako su mješani i aerirani (Slika 6.):

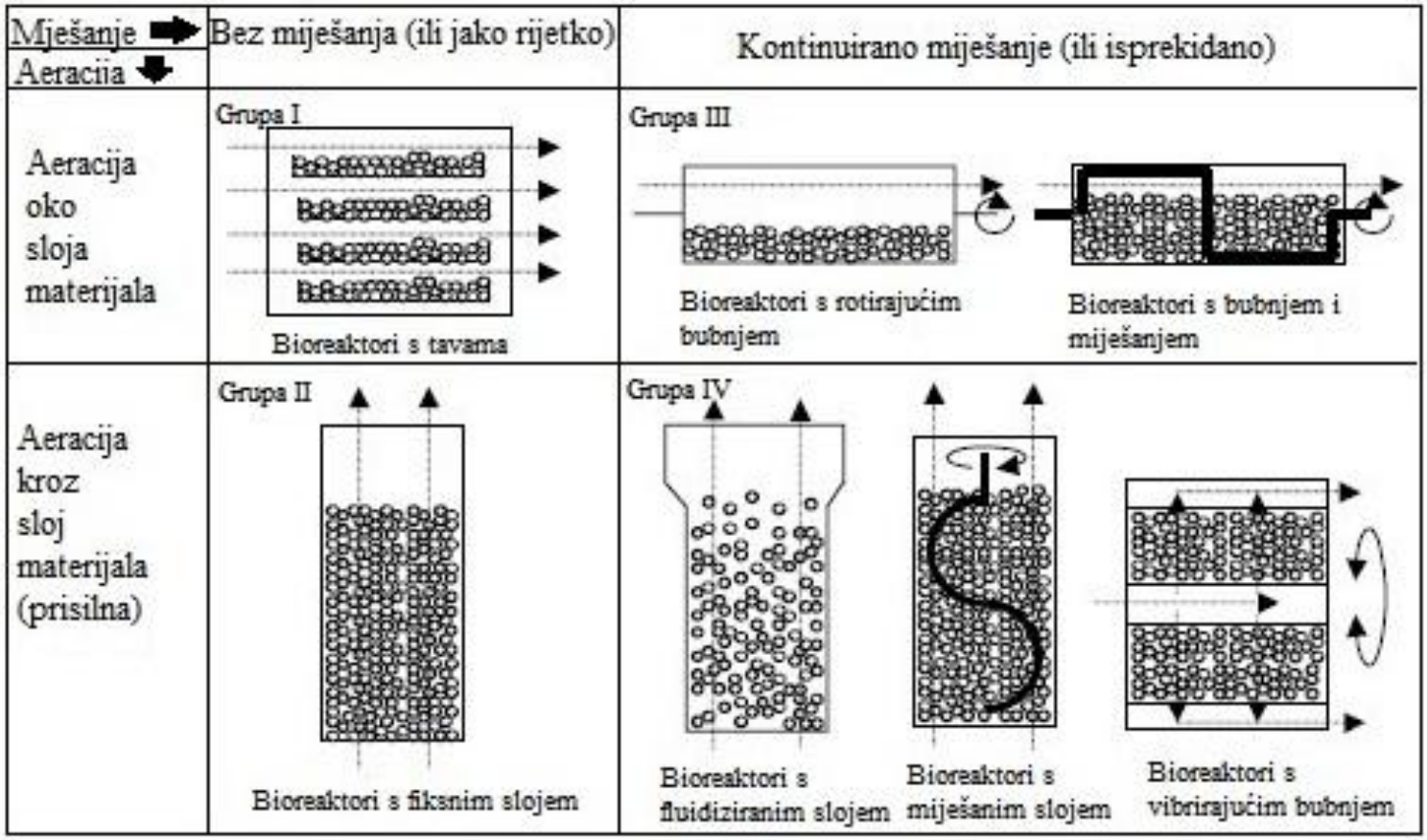
1. Grupa I: Bioreaktori sa statičnim slojem materijala, koji se uopće ne miješa ili se miješa vrlo rijetko (npr. jednom ili dvaput dnevno), a zrak cirkulira oko sloja, ali se ne upuhuje prisilno kroz sloj. Ovi reaktori se često nazivaju i bioreaktori s tavama (eng. tray bioreactors).

2. Grupa II: Bioreaktori sa statičnim slojem koji se uopće ne miješa ili se miješa vrlo rijetko (npr. jednom dnevno), a aeracija se vrši snažnim upuhivanjem svježeg zraka kroz sloj materijala. Ovi reaktori nazivaju se bioreaktori s fiksnim slojem (eng. packed-bed bioreactors).

3. Grupa III: Bioreaktori u kojima je sloj miješan kontinuirano ili isprekidano (npr svakih nekoliko minuta ili sati), a zrak cirkulira oko sloja materijala, ali bez snažnog upuhivanja. Na ovom principu rade dva bioreaktora koji imaju različite načine miješanja a to su bioreaktor s rotirajućim bubnjem (eng. rotating drum bioreactors) i bioreaktor s bubnjem i miješanjem (eng. stirred drum bioreactors). Na ove bioreaktore ćemo se posebno osvrnuti u ovom radu.

4. Grupa IV: Bioreaktori u kojima se sloj miješa, a zrak se snažno propuhuje kroz sloj. Ovaj tip bioreaktora može raditi na dva načina, pa znog toga postoji podjela na dvije podgrupe, IVa i IVb. U podgrupi IVa miješanje je kontinuirano, a u IVb isprekidano u intervalima koji se mjere u minutama ili satima. Ovi rektori mogu biti različito dizajnirani, npr. bioreaktori s fluidiziranim plinovito-čvrstim slojem (eng. gas-solid fluidized bed bioreactors), bioreaktori s vibrirajućim bubnjem (eng. rocking drum bioreactors) i bioreaktori s različitim varijantama miješanja i aeracije.

Ova podjela je napravljena na temelju načina rada, a ne vanjskog izgleda bioreaktora. Kod ovakve podjele bitno je napomenuti da je stvar dogovora kako će se razlučiti granica između povremenog i čestog miješanja u bioreaktoru. Sistematizirani pregled ovakve podjele su ponudili i sami autori podjele (slika 6).



Slika 6. Osnovne značajke dizajna SSF-bioreaktora, s podjelom u četiri grupe, utemeljenoj na načinu aeracije i miješanja

Bioreaktori grupe I (slika 6) najčešće se sastoje od glavne komore unutar koje su posložene plitke tave, naslagane jedna iznad druge s određenim razmakom. U takvu se komoru upuhuje kondicionirani zrak (kontrolirane temperature i zasićenosti vlagom) koji struji iznad tava. Ukoliko se provodi miješanje to je onda vrlo rijetko i radi se ručno. Same tave mogu često imaju perforirano dno kako bi bio lakši prostup kisika i otvorenog su tipa, te se rade od prirodnih materijala (poput drva, bambusa) ili od plastike i metala. Mikroperforirane plastične vreće koje sadrže supstrat također spadaju u ovu kategoriju.

Bioreaktori grupe II su najčešće uspravni bioreaktori valjkastog ili pravokutnog presjeka s perforiranim dnom na kojem se nalazi sloj supstrata. Kroz perforirano dno se upuhuje zrak u sloj materijala.

Bioreaktori grupe III, na koje ćemo se fokusirati u ovom radu, sastoje se od horizontalnog bubnja koji se djelomično puni supstratom, a zrak se upuhuje u vršni prostor (prostor iznad sloja supstrata, eng. headspace). Kod bioreaktora s rotirajućim bubnjem (eng. rotating drum bioreactors), cijeli bubanj rotira oko aksijalne osi i tako se miješa sloj. Kod bioreaktora s bubnjem i miješanjem (eng. stirred drum bioreactors), sam bubanj ostaje stacionaran, a unutar bubnja rotiraju lopatice (eng. paddles) ili strugači (eng. scrapers) postavljeni na središnju osovinu bioreaktora.

Bioreaktori grupe IV mogu biti izrađeni u različitim izvedbama - kao bioreaktori s miješanim slojem (eng. stirred-bed bioreactors), bioreaktori s vibrirajućim bubnjem (eng. rocking drum bioreactors) ili bioreaktori s fluidiziranim slojem (eng. air-solid fluidized beds).

Bioreaktori s miješanim slojem (eng. stirred-bed bioreactors) slični su statičnim bioreaktorima s fiksnim slojem (eng. static packed bed reaktors) po tome što sloj podloge leži na perforiranoj ploči, a zrak se snažno upuhuje kroz sloj, međutim sloj nije statičan nego je u njega umetnuta miješalica koja osigurava kontinuirano ili povremeno miješanje. Takav miješani sloj obično je aeriran odozdo, a miješalo je umetnuto odozgo.

Bioreaktori s vibrirajućim bubnjem (eng. rocking drum bioreactors) sastoje se od tri koncentrična cilindra – unutrašnji preforirani, vanjski perforirani i vanjski neperforirani. Supstat se nalazi u prostoru između dvaju perforiranih cilindara. Zrak se upuhuje kroz središnji cilindar, prolazi kroz supstrat i dalje u prostor između vanjskog perforiranog i krajnjeg vanjskog neperforiranog cilindra te potom izlazi van iz reaktora. Dva vanjska cilindra

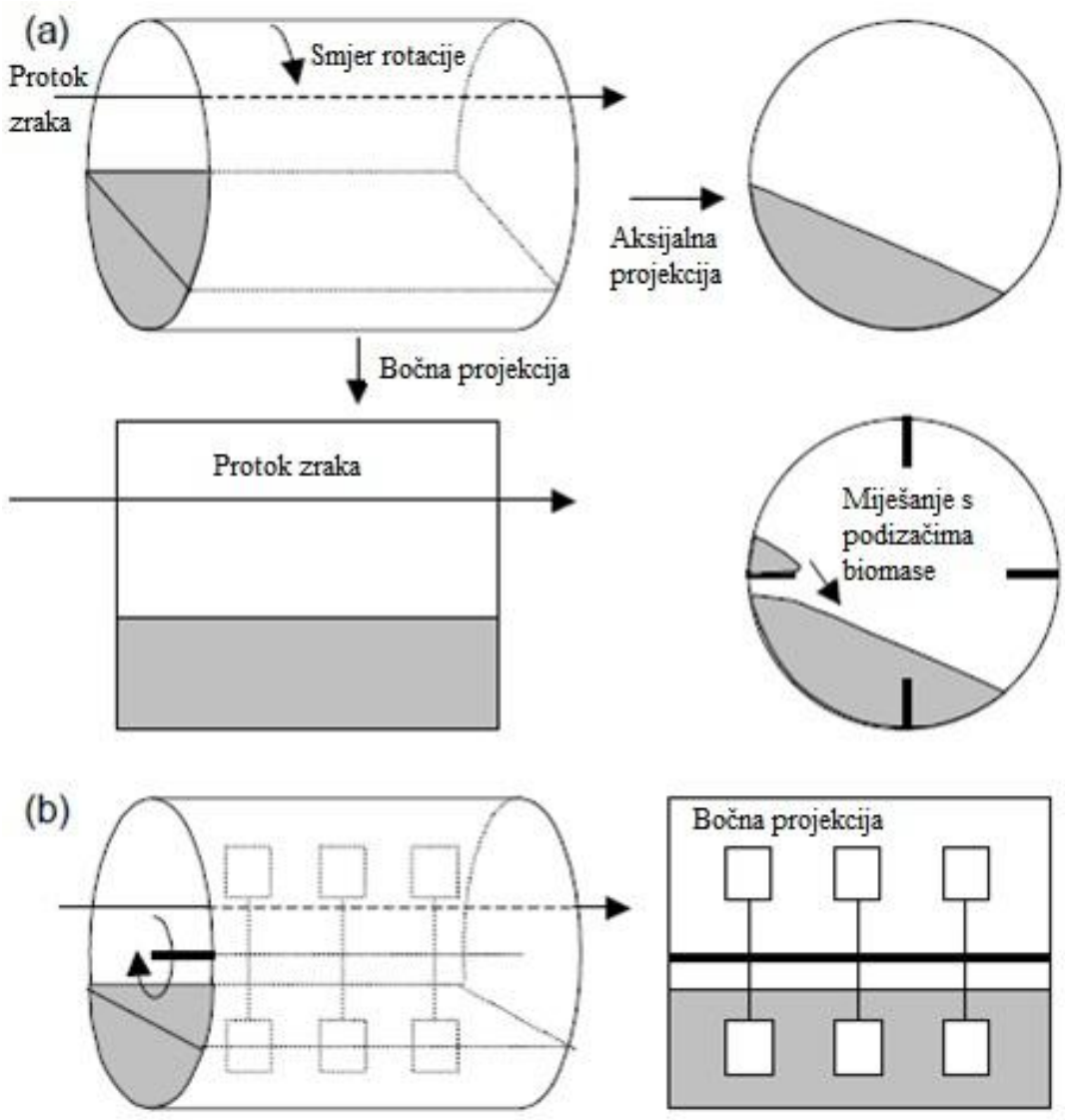
rotiraju u odnosu na unutarnji cilindar čime se miješa supstrat, iako ovakvo miješanje nije previše učinkovito.

Kod bioreaktora s fluidiziranim slojem (eng. air-solid fluidized beds, ASFBs) zrak se kroz perforiranu ploču upuhuje prema gore i to brzinom koja je dovoljna da se fluidizira sloj supstrata, koji je tada ponaša kao fluid.

Treba imati na umu da postoji nekoliko bioreaktora koji ne spadaju u grupu III, a izgledom su vrlo slični bioreaktoru s rotirajućim bubnjem (eng. rotating drum bioreactors) i bioreaktoru s bubnjem i miješanjem (eng. stirred drum bioreactors). Unatoč sličnosti vanjskog izgleda, u tim se bioreaktorima zrak uvodi izravno u sloj supstrata, pa se zbog te dodatne aeracije svrstavaju u grupu reaktora IVa. Radi se o kontinuiranim bioreaktorima s miješanjem (eng. continuously-agitated bioreactors) i o snažno aeriranim bioreaktorima (eng. forcefully-aerated bioreactors), a o učinkovitosti te prisilne aeracije ovisi u koju će skupinu bioreaktor biti svrstan (Mitchell i sur., 2006).

2.3. Bioreaktori s rotirajućim bubnjem i bioreaktori s bubnjem i miješanjem

Bioreaktori s rotirajućim bubnjem i bioreaktor s bubnjem i miješanjem, u kojima se zrak upuhuje u vršni prostor i pritom se ne upuhuje snažno kroz sloj supstrata, mogu se koristiti i za kontinuirane procese koji nisu predmet ovog poglavlja. Ovdje će se razmatrati samo njihova primjena u šaržnim procesima (Mitchell i sur., 2006).



Slika 7. Osnovne značajke rotirajućih bubanjskih bioreaktora (a) i bioreaktora s bubnjem i miješanjem (b) (Mitchel i sur., 2006).

2.3.1. Osnovne značajke dizajna i radne varijable bioreaktora s rotirajućim bubnjem

Osim osnovnih značajki bioreaktora s rotirajućim bubnjem prikazanih u prethodnom poglavlju, postoji još nekoliko čimbenika koji utječu na dizajn bioreaktora (Mitchel i sur., 2006):

- korištenje odbijača (eng. baffles) ili točnije podizača (eng. lifters) biomase (pregrada na unutarnjim stijenkama bubnja);
- povremena promjena smjera rotacije bubnja;
- korištenje bubnjeva koji nisu kružnog presjeka;
- aksijalni nagib bubnja bioreaktora (u odnosu na horizontalan položaj).

Bioreaktori s rotirajućim bubnjem i odbijačima te bubanjski bioreaktori s mješanjem također dijele ove značajke dizajna (Mitchel i sur., 2006):

- duljina i promjer bioreaktora (njihov omjer može varirati u vrlo širokom rasponu);
- veličina, oblik i broj odbijača (u slučaju rotirajućeg bioreaktora s odbijačima), odnosno broj i oblik miješala unutar bioreaktora s mješanjem;
- dizajn ulaza i izlaza zraka iz sustava utječe na protok zraka u vršnom prostoru;
- prisutnost ili odsutnost vanjskog plašta sa vodom (u slučaju reaktora s rotirajućim bubnjem povećava težinu dijela koji se mora okretati i također zahtjeva korištenje adekvatne brtve na ulazu i izlazu vode);
- korištenje podizača (ili miješala kod mješanih bioreaktora) koji doprinose hlađenju sustava;
- dizajn sustava za dodavanje vode i ostalih dodataka tijekom procesa;
- dizajn sustava za dodavanje i izuzimanje supstrata kod kontinuiranog rada.

Nakon utvrđivanja osnovnih značajki dizajna možemo utvrditi osnovne radne varijable, kako ih navode Mitchell i sur. (2006):

- koeficijent punjenja krutine u bioreaktor (eng. solids loading);
- brzina rotacije bubnja u slučaju reaktora s rotirajućim bubnjem, odnosno brzina miješanja za bubanjski bioreaktor s miješanjem (ukoliko su rotacija ili miješanje isprekidani, onda treba definirati razmak između perioda mješanja, trajanje i brzinu miješanja);
- protok, temperatura, i vlažnost zraka koji se upuhuje u vršni prostor (eng. headspace);
- vrijeme kada se dodaje voda;
- temperatura rashladne vode ukoliko se koristi rashladni plašt za termoregulaciju, a ako se rashladni plašt ne koristi onda je važno da li se zrak snažno puše na stijenku bubnja.

Većina ovih operativnih varijabli može se mijenjati tijekom procesa. Koeficijent punjenja krutine je fiksan samo na početku procesa, a obično se uzima da je korisni volumen oko 40 % od ukupnog volumena bioreaktora da bi se omogućilo dovoljno miješanje sloja. Tijekom fermentacije se koeficijent punjenja mijenja zato što se dio materijala prevodi u CO_2. Nakon što započne fermentacija, koeficijent punjenja krutine više se ne može kontrolirati.

Budući da se sloj miješa, voda se tijekom miješanja u sustav unosi kao fino raspršena magla. Tako se isparavanje vode se koristi kao metoda hlađenja koja može koristiti zrak nezasićen vlagom tj. uvedeni zrak mora samo udovoljavati kriterij temperature i adekvatne razine sterilnosti. Na sve dosad navedene radne varijable i varijable dizajna, utjecaj će imati i idući faktori (Mitchell i sur., 2006):

- brzina proizvodnje topline u sloju terba se uzeti u obzir pri odabiru koeficijenta punjenja, brzine aeracije i vlažnosti ulaznog zraka;
- odabrana brzina rotacije ili miješanja mora omogućiti ravnotežu između poticanja prijenosa topline i kisika unutar sloja te između sloja i vršnog prostora i uz to treba svesti na minimum oštećenja mikrooragnizama zbog smicanja;
- čvrstoća čestica materijala može utjecati na maksimalni promjer čestica i na koeficijent punjenja obzirom da se mekše čestice na dnu mogu zdrobiti pod težinom debljeg sloja materijala.

2.3.2. Bioreaktori s rotirajućim bubnjem

U ovom dijelu rada osvrnut ćemo se na primjenu bioreaktora s rotirajućim bubnjem u različitim mjerilima. Navedeni su primjeri primjene iz izvronih radova, a zaneke od njih koji nisu bili dostupni navedeni su podaci koje su citirali Mitchell i sur. (2006).

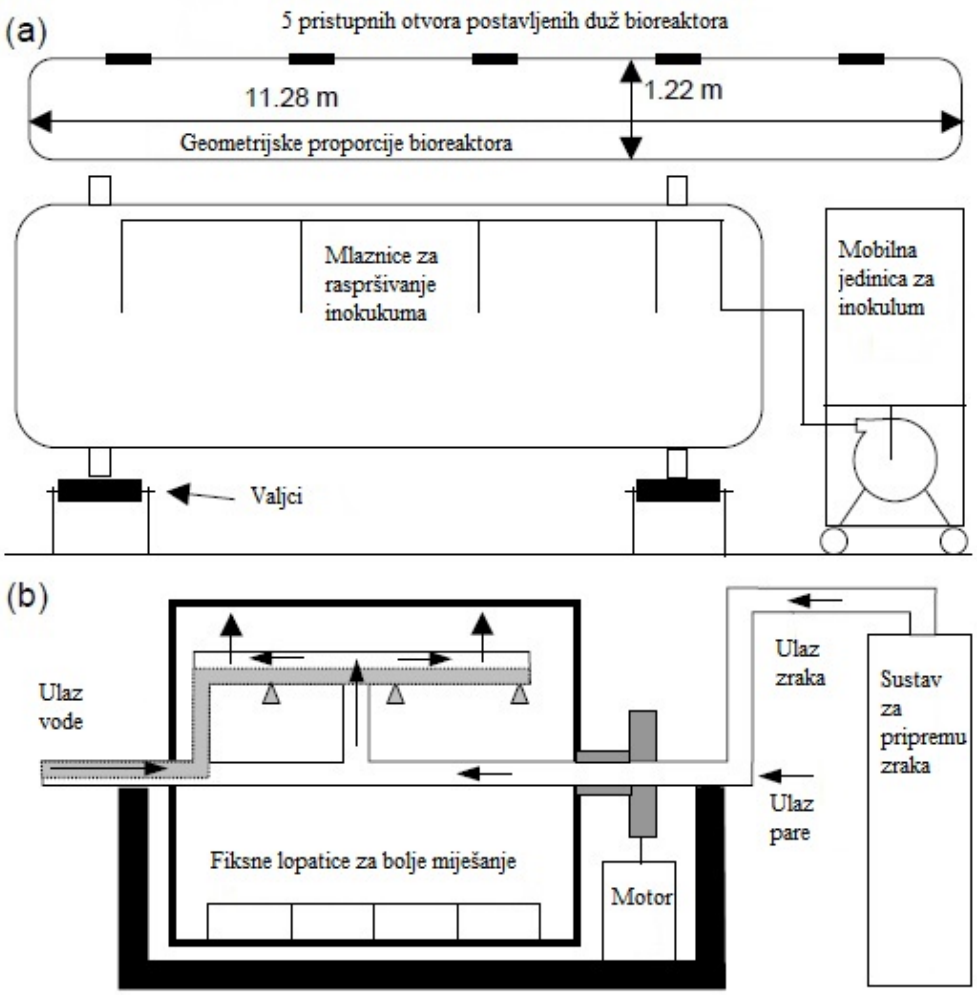
2.3.2.1. Primjena bioreaktora s rotirajućim bubnjem u realnom mjerilu

Mitchell i sur. (2006) su prikazali kratak pregled primjene bioreaktora s rotirajućim bubnjem u realnom mjerilu. Na temelju literature koja nam nije dostupna navode primjer procesa dobivanja amilaze, razvijenog 1914. godine, u kojem je radni mikroorganizam bio *Aspergillus oryzae* uzgojen na pšeničnim mekinjama. Ovaj proces se prvobitno provodio u bioreaktorima s tavama, a kasnije u bioreaktorima s rotirajućim bubnjem i proizvodni proces je kasnije dorađen 1939. godine.

Drugi primjer koji navode Mitchell i sur. (2006) je SSF-proces s rotirajućim bubnjevima, koji je bio korišten ranih 1940-ih godina za komercijalnu proizvodnju pencilina u vrijeme kada su zbog rata bile veće potrebe za ovim antibiotikom. Kao sirovina su korištene pšenične mekinje (slika 8a), a postrojenje je je sadržavalo 40 bioreaktora s rotirajućim bubnjem promjera 1,28 m i dužine 11,28 m te zapremnine 13 m^3. Dostupan je samo općenit opis ovog procesa, ali ne i konkretni podaci o njegovoj uspješnosti. Najprije su pšenične mekinje izvan samog bubnja pomiješane s otopine hranjivih tvari te se bubanj kroz odgovarajuće otvore punio navedenom smjesom. Slijedila je sterilizacija izravnim injektiranjem pare pri tlaku od 1 atm uz rotaciju bubnja od 24 o/min. Inokulum je kroz mlaznice dodan raspršivanjem po smjesi pri istoj rotaciji bubnja i početnoj aeraciji između 0,28 i 0,43 m^3/min (aeracija se nakon 30 h povećavala na 1,13 m^3/min i održavana je takvom do kraja procesa). Rotacija je prvih 6 sati bila ista kao na početku kod sterilizacije (24 o/min), a od 6 do 30 h nakon inokulacije je smanjena na 5 o/min, te se nakon 30 sati opet vraćala na 24 o/min do kraja procesa. Temperatura se kontrolirala prskanjem vode po vanjskoj površini reaktora. Uzgoj je trajao 112 sati, nakon čega je sadržaj bubnja uklonjen pomoću vakuumskog sustava (Mitchell i sur., 2006).

Još jedan primjer primjene bioreaktora s rotirajućim bubnjem je proces u kojem se proizvodi *koji*. Opisan je rotirajući bubanjski bioreaktor kapaciteta 1500 kg s isprekidanim

mješanjem (slika 8b). Osim činjenice da je u sustavu bilo otežana kontrola temperature, nije dostupno više detalja o ovom procesu.



Slika 8. Bioreaktori s rotirajućim bubnjem primijenjeni u realnom mjerilu (Mitchell i sur., 2006):

a) bioreaktor koji je ranih 1940-ih godina korišten za komercijalnu proizvodnju pencilina na pšeničnim mekinjama;

b) bioreaktor u kojem se proizvodi *koji*.

2.3.2.2. Primjena bioreaktora s rotirajućim bubnjem u pilot-postrojenjima

U ovom poglavlju ćemo se osvrnuti na dva primjera primjene rotirajućih bubanjskih bioreaktora u pilot-postrojenjima i to kronološki (poglavlja 2.3.2.2.1. i 2.3.2.2.2.). Objavili su ih Fung i Mitchell (1995) te Stuart (1996), a Mitchell i sur. (2006) su njihove rezultate citirali i adaptirali neke od grafičkih prikaza (slika 9).

2.3.2.2.1. Uzgoj biomase *Rhizopus oligosporus* na pšeničnim mekinjama u bioreaktoru s rotirajućim bubnjem sa i bez podizača biomase

Fung i Mitchell (1995) su pri uzgoju biomase *Rhizopus oligosporus* na pšeničnim mekinjama istraživali utjecaj prisutnosti podizača biomase u pilot-bioreaktoru s rotirajućim bubnjem kapaciteta 200 L (slika 9a). Unutarnji promjer bubnja bio je 56 cm, a unutarnja dužina 85 cm. U eksperimentima s podizačima biomase (kao na slici 7) su na unutarnju stijenku bubnja pod pravim kutem postavljena četiri podizača (dimenzija 17 × 85 cm), koji su bili jednako distancirani jedan od drugog. Uzgoj je vođen bez upotrebe sustava za hlađenje, a ambijentalna temperatura prostorije u kojoj se nalazilo postrojenje je bila 17 – 26 °C.

Aeracija se provodila uvođenjem zraka zasićenog vlagom, čija je temperatura iznosila 37 °C što je je ujedno i optimalna temperatura za uzgoj korištenog radnog mikroorganizma. Pokazalo se da ta temperatura ulaznog zraka (37°C) nije dovoljna za održavanje temperature sloja u bioreaktoru koja je optimalna za inicijalni rast. Zato je lag faza rasta bila produžena i temperature sloja su u inicijalnoj fazi rasta bile ispod 30°C. Produljenje lag faze rasta bilo je izraženije kod bioreaktora s podizačima biomase zato što je miješanje omogućilo učinkovitije odvođenje topline sa sloja na okolinu. U bioreaktoru bez podizača je bila nešto kraća lag faza rasta jer je temperatura sloja bila viša od one u bioreaktoru sa podizačima.

Kasnije se temperatura sloja tijekom 10 sati podizala na oko 45°C. Nakon toga je u bioreaktoru s podizačima temperatura počela brzo padati tako da je samo 10 sati bila iznad 40°C. U bioreaktoru bez podizača zadržala se iznad 40°C tijekom narednih 30 h.

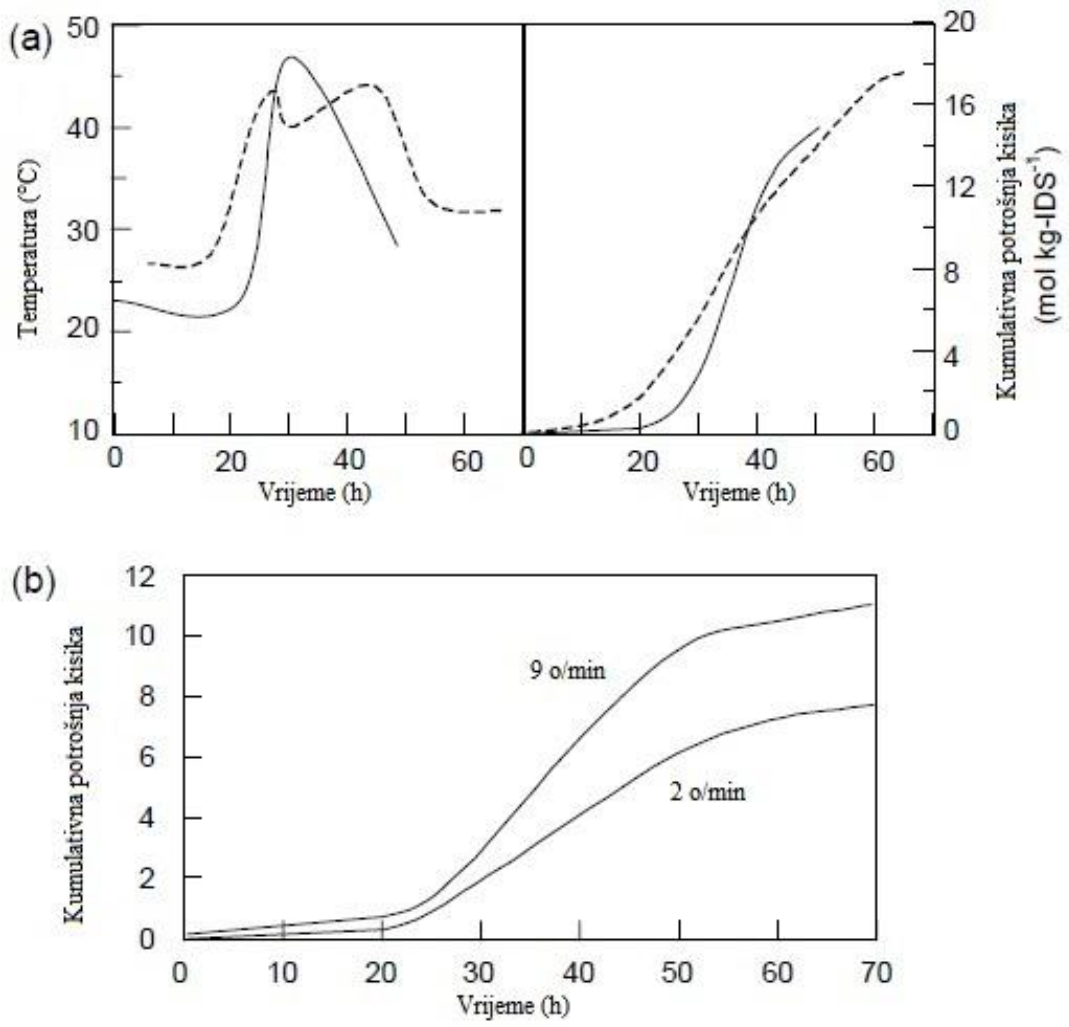
Najveće brzine potrošnje kisika bile su veće kod bioreaktora s podizačima (Slika 9a). Međutim zbog duže lag-faze ukupna potrošnja kisika nije bila znatno veća u bioreaktoru s podizačima. Važno je napomenuti da bi bioreaktori s podizačima nadmašili bioreaktor bez

podizača po potrošnji kisika u prvih 30 h ukoliko bi temperatura u oba bioreaktora bila 37 °C tijekom prvih 10 h. Bolja regulacija temperature mogla se izvesti postavljanjem vodenog plašta oko bubnja bioreaktora ili smještanjem bioreaktora u prostoriju ambijentalne temperature 37 °C. Alternativno rješenje bi bilo postavljanje izolacijskog materijala s vanjske strane bubnja tijekom ranih faza fermentacije, čime bi grijanje sloja uvođenjem toplog zraka bilo efikasnije. Kasnije tijekom procesa bi se ovaj izolacijski materijal zbog boljeg odvođenja metaboličke topline trebao ukloniti u trenutku kada započne brzi rast.

Iz opisanog eksperimenta evidentno je da odvođenje viška topline nastale metaboličkom aktivnošću radnog mikroorganizma predstavlja jedan od glavnih izazova u proizvodnji. Npr., u opisanoj fermentaciji koja je provedena uz pomoć *Rhizopus oligosporus,* bilo je poželjno izbjeći temperature iznad 40 °C, ali je ta vrijednost premašena tijekom dugih perioda (Fung i Mitchell; 1995; Mitchell i sur., 2006).

2.3.2.2.2. Uzgoj biomase *Aspergillus oryzae* na pšeničnim mekinjama u bioreaktoru s rotirajućim bubnjem bez podizača biomase

Drugi primjer proizvodnje u pilot-postrojenju je proces uzgoja *Aspergillus oryzae* na pšeničnim mekinjama koji je provodila Stuart (1996) (citirano u Mitchell i sur., 2006). Eksperiment je proveden bez podizača u istom bubanjskom bioreaktoru volumena 200 L koji je opisan u poglavlju 2.3.2.2.1. Vođenjem procesa uz brzinu rotacije od 9 o/min i 2 o/min, pokazalo se da je viša brzina rotacija pogodnija za bolje miješanje i samim time daje bolji prijenos kisika iz vršnog prostora u sloj, čime se ubrzava i rast biomase (Slika 9b). Pri 2 o/min sloj je bio u prevrćućem režimu strujanja, dok je pri 9 min bio u kotrljajućem režimu strujanja (režimi protoka u bioreaktoru s rotirajućim bubnjem bit će detaljnije objašnjeni u poglavlju 2.3.3.1.). Maksimalne temperature postignute u procesima bile su 43°C pri brzini rotacije 9 o/min odnosno 38°C pri brzini 2 o/min.



Slika 9. Primjeri primjene rotirajućih bubanjskih bioreaktora u pilot-postrojenjima (grafički prikaz rezultata su adaptirali Mitchell i sur., 2006):

(a) Utjecaj podizača biomase na procesne parametre u bioreaktoru s rotirajućim bubnjem volumena 200 L (Fung i Mitchell, 1995). Legenda: (—) bubanj s podizačima; (- - -) bubanj bez podizača.

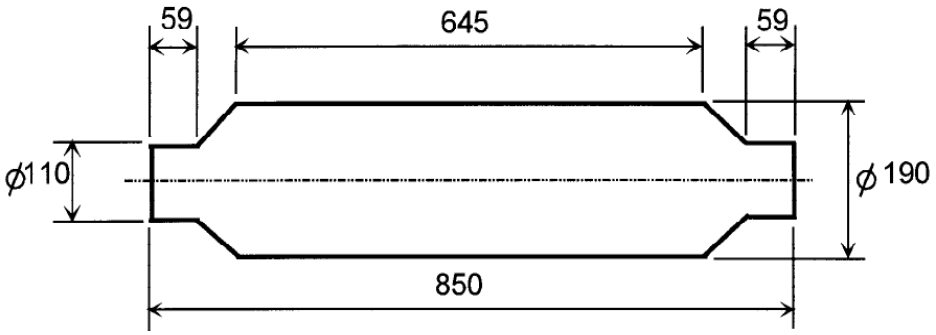
(b) Utjecaj brzine rotacije na kumulativnu potrošnju kisika kod bubnjeva bez podizača (volumena 200 L). (Stuart 1996). IDS predstavlja početnu suhu tvar (eng. initial dry solids).

2.3.2.3. Primjena bioreaktora s rotirajućim bubnjem u malom mjerilu

Mitchell i sur. (2006) su citirali i adaptirali neke od grafičkih prikaza koje su na temelju svojih laboratorijskih istraživanja provedenih u malom mjerilu objavili Stuart i sur. (1999), De Reu i sur. (1993), Kalogeris i sur. (1999) i Dominguez i sur. (2001). U tekstu koji slijedi prikazani su osnovni rezultati uzeti iz navedenih originalnih radova i adaptacija nekih njihovih grafičkih prikaza objavljena u Mitchell i sur. (2006). Pored toga je prikazan jednostavnig sustav s rotirajućim bocama.

2.3.2.3.1. Uzgoj biomase *Aspergillus oryzae* na pšeničnim mekinjama i sintetskom gelu u bioreaktoru s rotirajućim bubnjem bez podizača biomase

Stuart i sur. (1999) su koristili bioreaktor s rotirajućim bubnjem volumena 18,7 L (dužine 85 cm i unutrašnjeg promjena 19 cm). Dio njihovog eksperimenta citiran je u Mitchel i sur. (2006). Uzgoj *Aspergillus oryzae* se provodio pri različitim brzinama rotacije i na dva različita supstrata. Prvi supstrat su bile pšenične mekinje pomiješane s vodom i potom autoklavirane (121 °C / 100 kPa / 45 minuta) , a čestice podloge bile su nepravilnog oblika i nejednakog promjera (2 - 5 mm). Drugi korišteni supstrat bio je sintetski u obliku gela koji je izrezan na kockice veličine 6 mm, a sadržavao je pšenični škrob, $(NH_4)_2SO_4$, ureu, KH_2PO_4, K_2HPO_4, komercijalno biljno gnojivo koje sadrži mikroelemente (Anonymous 1, 2015), agar i κ-karagenan. U ovom eksperimentu su istodobno korištena dva identična staklena reaktora (Slika 10), smještena u zajednički prostor kontrolirane temperature (32 °C).

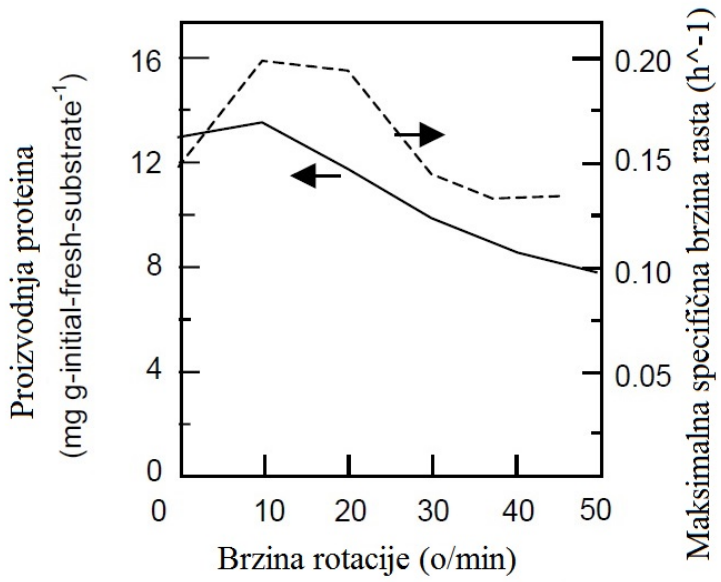


Slika 10. Shematski prikaz (bočna projekcija) horizontalnog staklenog rotirajućeg bubanjskog bioreaktora volumena 18,7 L. Prikazane su samo vanjske dimenzije, a debljina stakla je iznosila 5 mm (Stuart i sur. 1999).

Termoregulacija se provodila uvođenjem zraka temperature 30 - 32°C, te je temperatura sloja održavana na istoj temperaturi kao i okolni zrak. Značajnija zapažanja su uključivala utjecaj brzine rotacije na rast biomase na gelu i utjecaj korištenog supstrata na temperaturu.

Pokazalo se da brzina rotacije u području od 0 - 10 o/min pozitivno utječe na rast pri uzgoju na gelu, gdje je povišena maksimalna brzina rasta, ali pritom ne dolazi do povećanja udjela proteina. Povećanjem brzine rotacije na 10 - 50 o/min dolazilo je do negativnog učinka miješanja i na brzinu rasta i na prinos proteina.

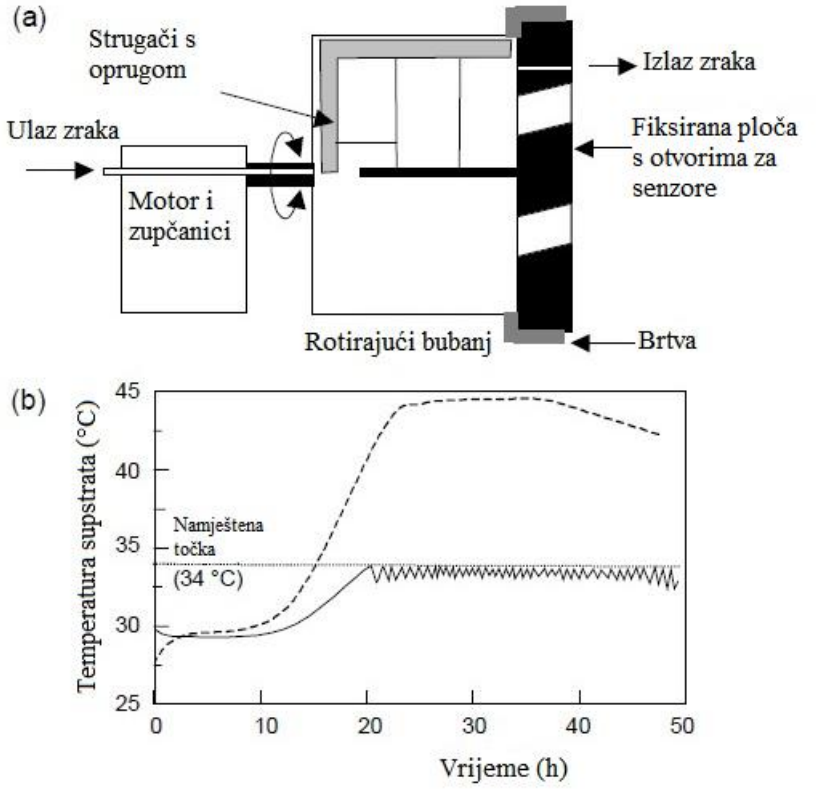
Promatran je i utjecaj vrste supstrata na temperaturu te se pokazalo da kod korištenja supstrata u obliku gela temperatura nije prelazila 35°C, a kod pšeničnih mekinja je temperatura rasla i do vrijednosti između 45 i 50°C. Razlika u temperaturama najvjerojatnije proizlazi iz činjenice da se supstrati razlikuju u dostupnosti ugljika. Supstrat u obliku gela sadržavao je nešto manje od 5 % škroba, a pšenične mekinje 15 % škroba (obje vrijednosti izražene su kao maseni udio u vlažnoj podlozi) te su također sadržavale proteine i masti. Bitno je naglasiti da je većina čestica u podlozi s pšeničnim mekinjana bila plosnatog oblika (manje od 4 mm), dok se gel sastojao od kockica veličine 6 mm, tako da je supstrat sa pšeničnim mekinjama imao puno veći omjer površine i volumena.



Slika 11. Utjecaj brzine rotacije bubnja na proizvodnju proteina i maksimalnu specifičnu brzinu rasta pri uzgoju *Aspergillus oryzae* na supstratu u obliku gela. Legenda: (—) količina proteina, (- - -) maksimalna vrijednost specifične brzine rasta. Prema rezultatima iz Stuart i sur. (1999) adaptirano u Mitchell i sur. (2006).

2.3.2.3.2. Uzgoj biomase *Rhizopus oligosporus* na kuhanim sjemenkama soje u bubanjskom bioreaktoru s jednim fiksiranim krajem

De Reu i sur. (1993) su konstruirali rotirajući bubanjski bioreaktor s jednim fiksiranim krajem, da bi se omogućilo uvođenje mjernih senzora u sloj. Ovakva izvedba je zakomplicirala dizajn jer zahtijeva brtvu između rotirajućeg bubnja i fiksirane ploče. Unutrašnji promjer bubnja bio je 20 cm, dužina 15 cm, a ukupni volumen bioreaktora je iznosio 4,7 L (slika 12). Radni mikroorganizam je bio *Rhizopus oligosporus*, a kao supstrat se koristilo 1 kg kuhanih sjemenki soje, što znači da je volumen sloja vjerojatno 2 – 2,5 L. Zrak se uvodio u vršni prostor kroz središnju osovinu, a cijeli bioreaktor se nalazio u prostoriji ambijentalne temperature od 30°C.



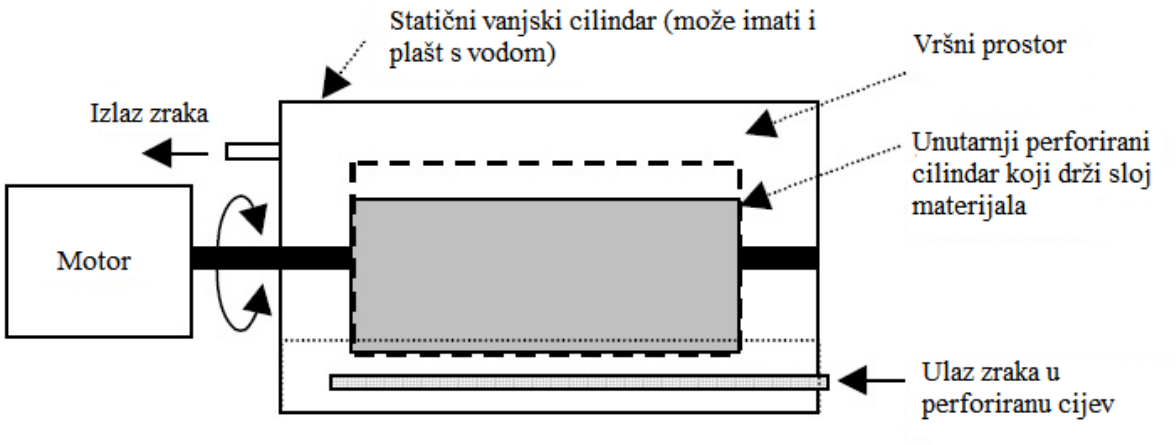
Slika 12. Performanse laboratorijskog rotirajućeg bubanjskog bioreaktora s isprekidanim miješanjem (de Reu i sur., 1993) (adaptirano u Mitchell i sur., 2006): a) glavne karakteristike dizajna; b) kontrola temperature sloja tijekom diskontinuirane rotacije. Legenda: (—) temperatura tijekom fermentacije s isprekidanim miješanjem, (- - -) temperatura tijekom statične fermentacije.

Pomoću ovog sustava je promatran utjecaj diskontinuirane rotacije na temperaturu sloja. Rotacija je započela svaki puta kada bi temperatura sloja došla do 34°C, a odvijala se u periodima od 60 sekundi, brzinom od 4 do 6 o/min, uz više promjena smjera rotacije. Pokazalo se da je moguće kontrolirati temperaturu miješanjem ovako male količine supstrata (1 kg) međutim takav način termoregulacije najvjerojatnije ne bi bio uspješan u realnom mjerilu.

2.3.2.3.3. Proizvodnja lignocelulolitičkih enzima pomoću *Phanerochaete chrysosporium* u bioreaktoru koji je varijacija bioreaktora s rotirajućim bubnjem

Kalogeris i sur. (1999) (citirano u Mitchell i sur., 2006) su razvili bioreaktor koji je varijacija rotirajućeg bubanjskog bioreaktora (slika 13). U ovom se bioreaktoru sloj materijala nalazi u perforiranom cilindru volumena 10 L, koji može rotirati unutar većeg cilindra, napravljenogod punog materijala (neperforiranog) i opskrbljenog vodenim plaštom. Kroz ta veći cilindar struji zrak. Ovaj bioreaktor se pokazao pogodnim za kultivaciju termofilnih mikroorganizama. Zbog premalog odvođenja topline najvjerojatnije ne bi bio pogodan za uzgoj mezofilnih mikroorganizama, a za to postoje dva razloga. Prvi razlog je taj što će zrak koji se upuhuje prvenstveno strujati iznad površine sloja, a ne kroz sam sloj (zato se ovaj bioreaktor svrstava u grupu III bioreaktora). Drugi razlog je to što nema bliskog kontakta između sloja i vodenog plašta (između njih se nalazi sloj zraka).

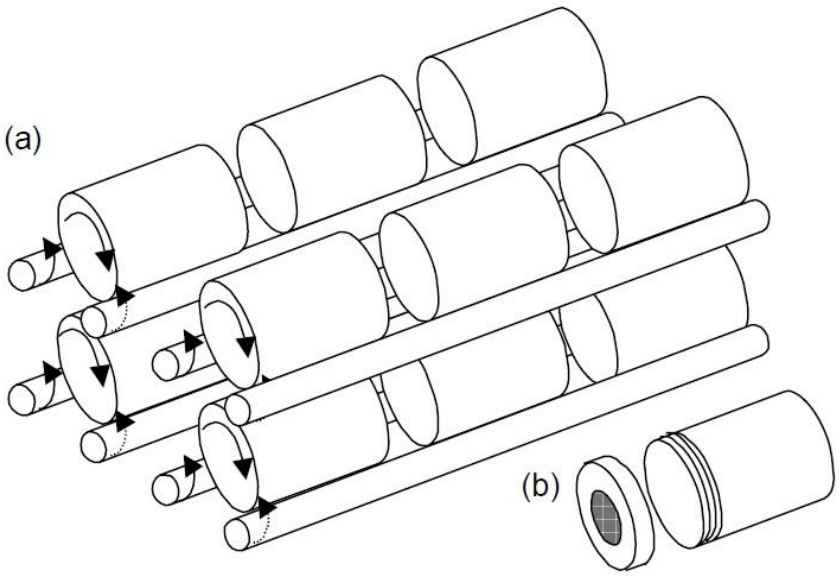
U kasnijoj adaptaciji ovog procesa (Dominguez i sur., 2001) (citirano u Mitchell i sur., 2006), bioreaktor je sadržavao tekuću hranjivu podlogu smještenu na dno bioreaktora, a u bubnju su se nalazile spužvaste kocke od najlona koji su se stalno vlažile hranjivim medijem zbog rotacije bubnja od 3 o/min. Taj proces su koristili za dobivanje lignocelulolitičkih enzima pomoću *Phanerochaete chrysosporium.*



Slika 13. Karakteristike dizajna rotirajućih bioreaktora grupe III koje je korišten bez tekućeg medija u vanjskom cilindru (Kalogeris i sur., 1999) i s tekućim hranjivim medijem napunjenim do razine označene isprekidanom linijom (Dominguez i sur., 2001) (adaptirano u Mitchell i sur., 2006).

2.3.2.3.4. Korištenje sustava rotirajućih boca kao zamjena za rotirajući bubanjski bioreaktor

Sustav s rotirajućim bocama (eng. roller bottles) je koristan u laboratorijskom mjerilu za testiranje procesa koji su predviđeni za kasnije vođenje u bioreaktorima s rotirajućim bubnjem. Aeracija izravnim uvođenjem zraka u vršni prostor svake boce je u takvom sustavu komplicirana, ali nije nemoguća. U većini slučajeva će se koristiti boca sa perforiranim čepom, kroz koji će se onda odvijati pasivna izmjena zraka između vršnog prostora boce i okoline. Prikaz moguće izvedbe ovog sustava vidljiv je na slici 14a. Slika 14b prikazuje izgled pojedine boce koja ima čep s mrežicom radi slobodne izmjene plinova (Mitchell i sur., 2006).



Slika 14. Prikaz jednostavnog sustava s rotirajućim bocama za uzgoj kulture tkiva (Mitchell i sur., 2006):

a) Moguće je postaviti više razina rotirajućih valjaka tj. šipki koje okreću boce. Sustav se obično postavlja u termostatiranu prostoriju. U svakom paru šipki koje okreću bocu, jedna šipka je pogonska (eng. drive bar) koja rotira (puna strelica) a druga je pomoćna šipka (eng. slave bar) koja nije pogonska, ali rotira (isprekidana strelica).
b) Obično svaka boca ima čep s mrežicom koja omogućuje slobodnu izmjenu plinova.

2.3.3. Miješanje i fenomeni transporta u bioreaktorima s rotirajućim bubnjem

Performanse bioreaktora s rotirajućim bubnjem i bioreaktora s bubnjem i miješanjem uvelike ovise o uspješnosti izmjene vode i energije između sloja i plinova u vršnom prostoru bubnja. Nadalje, ta uspješnost izmjene ovisi o režimima strujanja unutar sloja i unutar vršnog prostora. Nije vjerojatno da će se u takvim bioreaktorima s rotirajućim bubnjem i bioreaktorima s bubnjem i miješanjem postići dobro miješanje ako se već u fazi dizajniranja ne posveti posebna pažnja poticanju miješanja. Režimi strujanja zraka i krutine u grupi III bioreaktora su najčešće složeni i tek su se nedavno počeli pomnije istraživati, a najviše pažnje u tom području se pridaje bioreaktorima s rotirajućim bubnjem (Mitchell i sur., 2006). U daljnjim poglavljima ćemo razmotriti specifičnosti miješanja i fenomene transporta u bioreaktorima s rotirajućim bubnjem.

2.3.3.1. Režimi protoka krutina u bioreaktorima s rotirajućim bubnjem

Pri razmatranju režima protoka krutina u bubnju bioreaktora potrebno je uzeti u obzir radijalno i aksijalno kretanje krutine (Mitchell i sur., 2006).

Radijalni režim protoka unutar sloja materijala je važan jer utječe na prijenos topline i mase između sloja i vršnog prostora, kao i na homogenost unutar sloja. Najbolji prijenos topline, vode i kisika će se ostvarivati kada je miješanje takvo da sve čestice supstrata unutar sloja redovito dolaze na površinu sloja, međutim to nije jednostavno postići.

Istraženi su i okarakterizirani različiti režimi radijalnog protoka krutina u rotirajućim bubnjevima nez odbijača, koji se ne primjenjuju za SSF već za druge svrhe (Mitchel i sur., 2006). Konkretno, radilo se o istraživanju miješanja praškastih materijala koje su objavili Wightman i Muzzio (1998). Adaptirani prikaz režima strujanja krutina objavili su (Mitchel i sur., 2006) (slilka 15), a isti se prikaz može naći i u starijoj literaturi za kretanje sloja materijala u rotacijskim pećima (Henein i sur., 1983).

Režim protoka ovisi o nekoliko faktora, među kojima su brzina rotacije i koeficijent punjenja bubnja. Obično se režim protoka povezuje i sa kritičnom brzinom rotacije (N_c), koja se definira kao brzina rotacije pri kojoj se čestice supstrata drže za unutrašnjost bubnja zbog centrifugalne sile (Ishikawa et al. 1980, citirano u Mitchell i sur., 2006).

Kritična brzina rotacije (N_c) je funkcija promjera bubnja bioreaktora i za horizontalno postavljeni bubanj zadana je jednadžbom:

$$N_C = \frac{42.3}{\sqrt{D}}$$

gdje je:

N_c oznaka za kritičnu brzinu rotacije [o/min],

D - promjer bubnja [m].

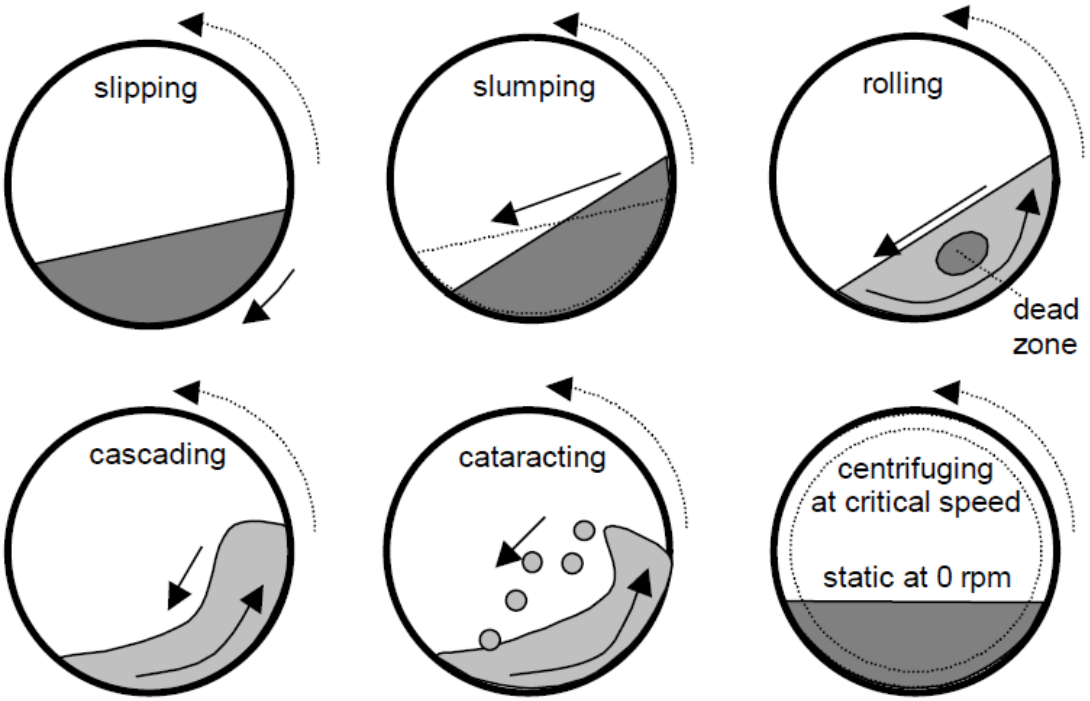
U tekstu koji slijedi bit će detaljnije opisan režim strujanja krutina u bubanjskim bioreaktorima bez podizača pri različitim brzinama rotacije (Mitchel i sur., 2006), koji je prikazan na slici 15.

Nema miješanja čestica unutar sloja u slučaju kad je bubanj statičan (ne rotira nego miruje pa je brzina je 0 o/min) i kod bubnja koji rotira pri kritičnoj brzini rotacije N_c (slika 15).

U slučaju kližućeg i prevrćućeg režima strujanja, koji se odvijaju pri brzinama rotacije ispod 10 % od kritične brzine rotacije (N_c), sloj se kreće kao cjelina što znači da je miješanje unutar sloja zanemarivo.

Povećanjem brzine rotacije sa 10 % N_c na 60 % N_c dolazimo do umjerenih brzina rotacije bubnja pri kojima sloj prolazi najprije kroz kotrljajući režim strujanja (kojeg karakterizira ravna površina sloja) i onda kroz kaskadni režim strujanja (koji karakterizira zakrivljena površina sloja). Pri ovim režimima strujanja nema slobodnih čestica u vršnom prostoru bubnja, nego postoji protok čestica unutar samog sloja, iako mogu postojati i mrtve zone (eng. dead zone) tj. područja bez miješanja.

Za brzine rotacije veće od 60 % N_c mijenja se režim strujanja u tzv. „vodopadni“ režim, u kojem neke čestice bivaju izbačene u zrak u vršnom prostoru.



Objašnjenje pojmova:

eng. slipping – kližući („puzeći“) režim strujanja

eng. slumping - prevrćući režim strujanja

eng. rolling, tumbling - kotrljajući režim strujanja

eng. cascading - kaskadni režim strujanja

eng. cataracting – tzv. „vodopadni“ režim strujanja

centrifuging at critical speed – centrifugiranje pri kritičnoj brzini

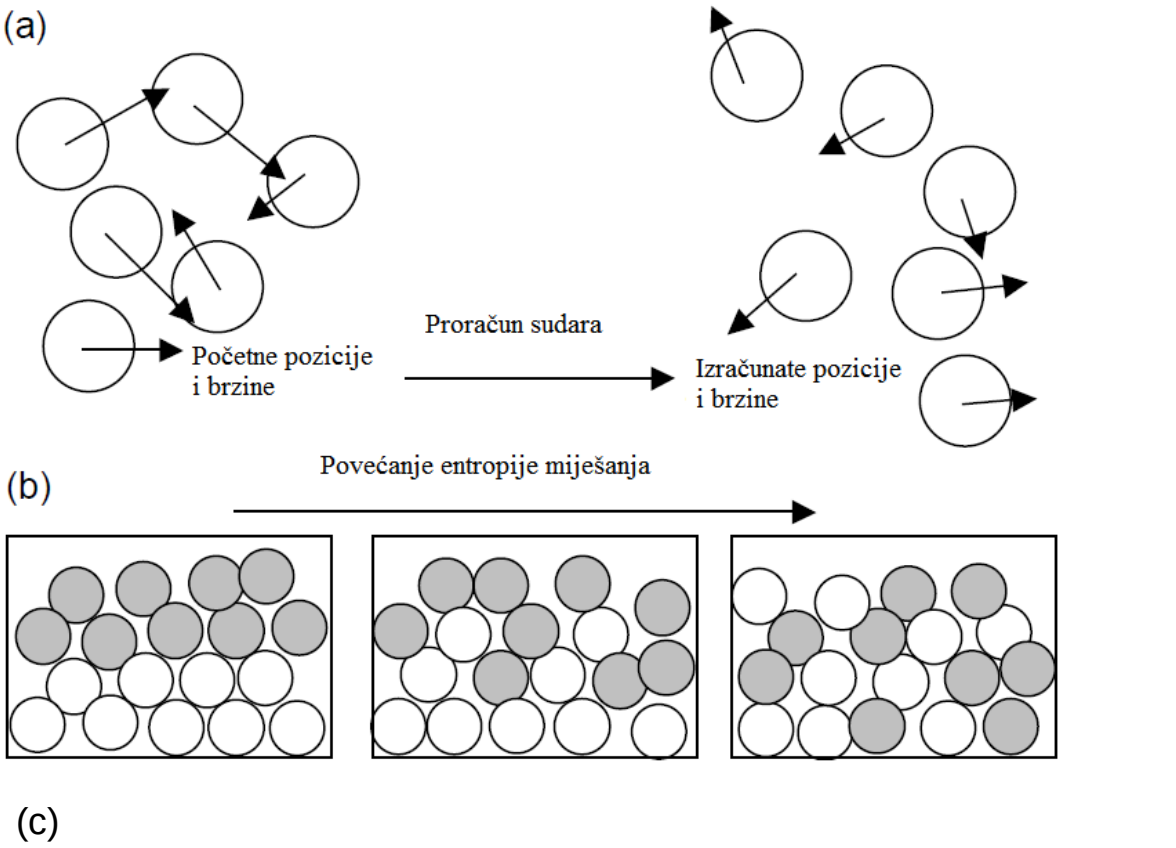
Slika 15. Prikaz režima strujanja krutina u bubanjskim bioreaktorima bez podizača. Prema radu koji su objavili Wightman i Muzzio (1998) slika je adaptirana u Mitchel i sur., (2006). Obično se u SSF procesima koriste relativno male brzine rotacije koje daju prevrćući režim protoka. Tamnija boja označava slabije izmiješana područja, a svijetlija označava ona područja koja su bolje izmiješana. Pune strelice označavaju smjer kretanja sloja ili čestica unutar sloja.

Većina bioreaktora s rotirajućim bubnjem radi u uvjetima koji daju prevrćući režim strujanja, što znači da je obično poželjno staviti podizače na unutrašnju površinu bubnja da bi se poboljšalo miješanje. Međutim isto tako je moguće koristiti i bioreaktore bez podizača, ali pri većim brzinama rotacije. Kao primjer (prema Mitchell i sur., 2006) se može uzeti bioreaktor u realnom mjerilu koji je koristio Ziffer (1988), koji je imao promjer 1.22 m, a kritičnu brzinu postizao pri 38.3 o/min. Tijekom najbrže faze raste, bubanj je bio miješan brzinom od 24 o/min, što predstavlja 63 % kritične brzine rotacije, tj. materijal je bio na granici između kaskadnog i „vodopadnog" režima strujanja.

Daljnja istraživanja miješanja u rotirajućim bubanjskim bioreaktorima provodili su Schutyser i sur. (2001) da bi se dobio detaljniji uvid u utjecaj odbijača na radijalno miješanje. Koristili su dvodimenzionalni model s odvojenim česticama u kojem su pomoću modela predvidjeli položaje velikog broja pojedinačnih čestica. Pritom promjena položaja svake pojedinačne čestice tijekom određenog vremena ovisi o sumi sila koje djeluju na nju zbog sudara s ostalim česticama ili s čvrstim površinama kao što je stijenka bioreaktora (slika 16). Svoj teorijski model potkrijepili su eksperimentalnim dokazima u rotirajućim bubnjevima koji su sadržavali kuhano zrnje pšenice. Okarakterizirali su bubanj kao dobro miješan kada je entropija miješanja bila veća od 0.9. Usporedili su efikasnost miješanja primjenom određenog dizajna bubnja i načina rada na temelju broja rotacija bubnja koji je neophodan da se dosegne entropija miješanja 0.9.

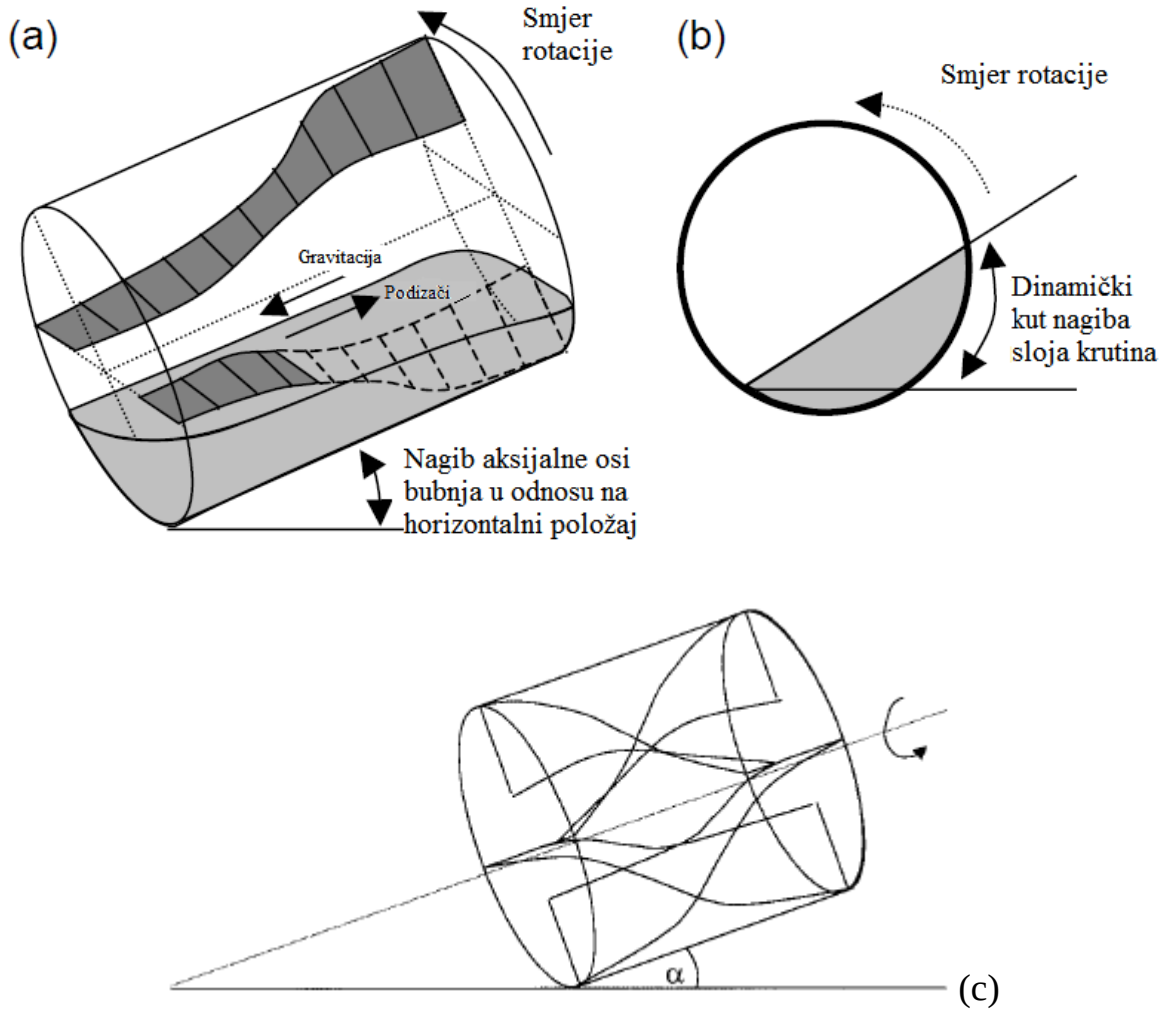
Istraživali su efekt brzine rotacije bubnja (0.5 o/min, 2 o/min, 5 o/min), promjera bubnja (0.15 m, 0,3 m, 1 m) i volumnog koeficijenta punjenja (0.2, 0.33, 0.4). U različitim eksperimentima i simulacijama pokazalo s da je bilo neophodno 1.5 – 10 rotacija da bi se postigla dobra izmiješanost. Potreban broj rotacija bio je neovisan o brzini rotacije bubnja, premda je pri većim brzinama vrtnje potreban broj rotacija završen u kraćem vremenu.

Schutyser i sur. (2001) su napravili simulacije kako bi istražili u kojoj mjeri odbijači djeluju na miješanje. Usporedili su odbijače širine 5 i 10 cm unutar bubnja čiji je promjer bio 30 cm, tako da su ugradili četiri ravna odbijača kao što je prikazano na slici 7. Mali odbijači su imali mali efekt na povećanje miješanja u kotrljajućem režimu, iako pri nižim brzinama pomažu da se spriječi prevrćući režim strujanja. Veći odbijači su poboljšali djelotvornost miješanja.



Slika 16. Osvrt na matematičko modeliranje i eksperimente koje su proveli Schutyser i sur. (2001): a) Osnove modela odvojenih čestica - strelice koje izlaze iz sredine čestice su vektori gibanja (veličina i smjer) čestice; b) Koncept entropije miješanja - što je veća nasumičnost raspodjele čestica u odnosu na njihov početni položaj, to je veća entropija miješanja; c) Usporedba simulacije (donji niz slika) i eksperimentalnih rezultata (gornji niz slika) nakon 0, 1, 2, 3, i 10 rotacija uz koeficijent punjenja bubnja 0.4 i brzinu rotacije 0.5 o/min.

Daljnjim proširenjem modela odvojenih čestica, Schutyser i sur. (2002) su uključili treću dimenziju u analizu radijalnog i aksijalnog miješanja i pritom su koristili tri izvedbe bubnja - bez podizača, s četiri ravna podizača (širina svaki od njih iznosila je 66 % od radijusa bubnja) i s zakrivljenim podizačima.



Slika 17. Osvrt na eksperimente koje su proveli Schutyser i sur. (2002): a) upotreba zakrivljenih podizača biomase i nagiba osi bubnja za poboljšanje aksijalnog miješanja sloja (prikazana su samo dva odbijača, ali ih može biti više, kako je prikazano u originalnom radu) (adaptirano u Mitchell i sur., 2006);
b) dinamički kut nagiba sloja miješane krutine koji predstavlja gornju granicu nagiba bubnja (adaptirano u Mitchell i sur., 2006);
c) izgled zakrivljenih odbijača u nagnutom rotirajućem bubnju ($\alpha = 20°$).

Rezultati su pokazali da ravni podizači poboljšavaju aksijalno miješanje (u odnosu na bubanj bez podizača), iako nisu posebno dizajnirani za za guranje materijala duž aksijalne osi bubnja. Takav utjecaj pripisuje se činjenici da pri korištenju ravnih podizača dolazi do veće brzine gibanja čestica na površini sloja materijala. Daljnji rezultati su pokazali da je najbolji dizajn za postizanje dobrog aksijalnog i radijalnog miješanja sloja onaj sa zakrivljenim podizačima biomase, kod kojeg je sloj dobro izmiješan već nakon 3 do 4 rotacije bubnja (u usporedbi s bubnjem bez podizača koji treba napraviti 50 do 100 rotacija da bi došli do istog stupnja aksijalne izmiješanosti). Također je naglašeno da naginjanje središnje osi bubnja u odnosu na horizontalnu os ima pozitivan učinak na aksijalno miješanje sloja (slika 17). Korišten je nagib od 35°, ali autori preporučaju korištenje nagiba od 20° kao prikladnije (Schutyser i sur., 2002).

2.3.3.2. Režimi protoka plina u vršnom prostoru bioreaktora s rotirajućim bubnjem

Poznavanje režima protoka plina u vršnom prostoru bubnja je važno za izračunavanje koeficijenta prijenosa sa sloja na vršni prostor, te se za primjer može uzeti primjer konvektivnog prijenosa topline, a koji vrijedi i za prijenos vode i kisika. Konvektivno uklanjanje topline u plinove vršnog prostora je dano relacijom koja vrijedi uz pretpostavku dobre izmiješanosti sustava:

$$R_{conv} = hA\,(T_{bed} - T_{head})$$

gdje je:

h - koeficijent prijenosa topline [W m^{-2} °C^{-1}],

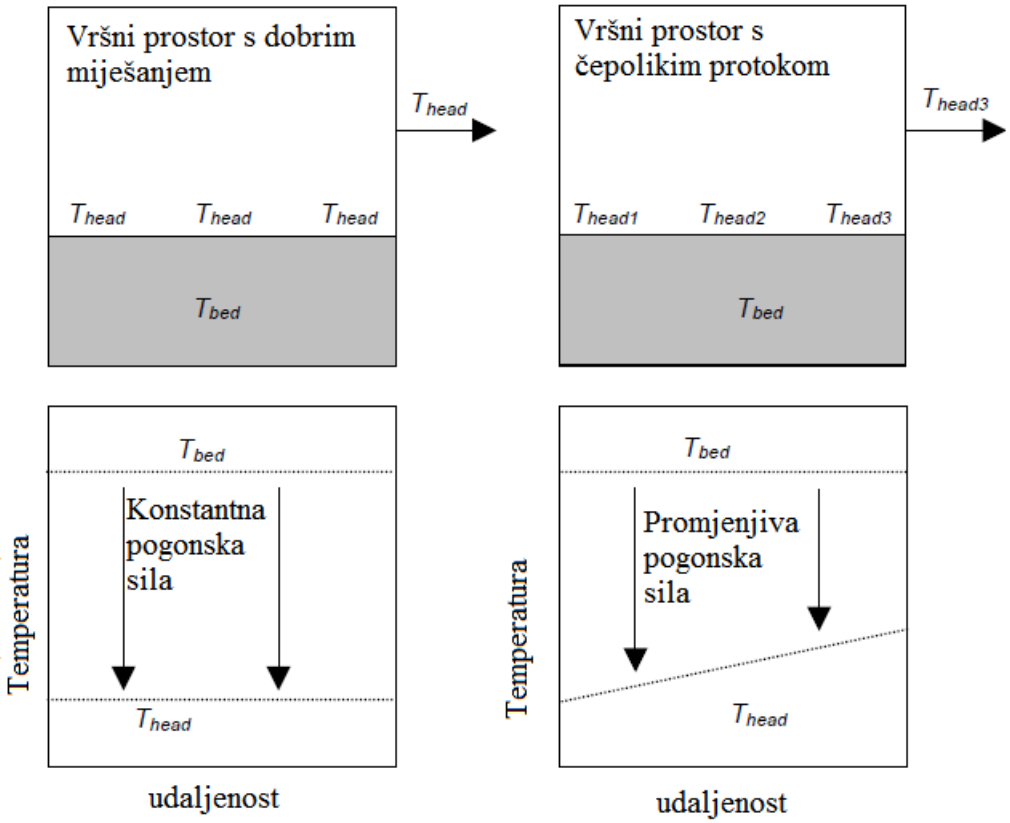
A - kontaktna površina između sloja i vršnog prostora,

T_{bed} - temperatura sloja,

T_{head} - temperatura plinova u vršnom prostoru bubnja.

Kao što je prikazano u slici 18, ako je vršni prostor dobro izmiješan onda je pogonska sila za prijenos topline konstantna i brzina prijenosa topline je ista u svakoj točci površine sloja supstrata. S druge strane, ako strujanje plinova u vršnom prostoru bubnja prati čepoliki režim strujanja, onda se pogonska sila za prijenos topline smanjuje sa povišenjem temperature

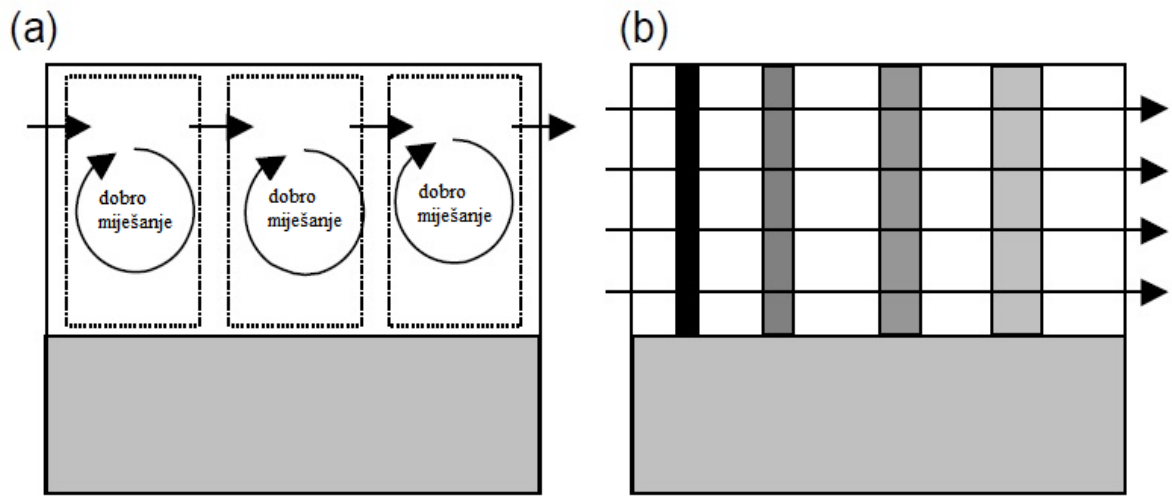
plinova koji struje kroz bubanj. U ovom slučaju je brzina izmjene topline između sloja i plinova vršnog prostora veća kod ulaznog kraja plinova nego kod izlaznog.



Slika 18. Važnost utjecaja režima protoka plinova u vršnom prostoru na prijenos topline i mase između sloja materijala i plinova u vršnom prostoru. Prikazana su dva ekstremna slučaja, uz pretpostavku dobrog stupnja izmiješanosti sustava. (a) Ako je vršni prostor dobro izmiješan, onda je pogonska sila prijenosa topline jednaka u svim aksijalnim točkama bubnja. (b) Ako je režim strujanja u vršnom prostoru čepolik, onda se pogonska sila prijenosa topline smanjuje strujanjem zraka po površini sloja materijala (Mitchell i sur., 2006).

Stuart (1996) je također provodila istraživanja vezana uz protok plinova u vršnom prostoru u bubnju čiji je unutarnji promjer iznosio 19 cm, a duljina 85 cm. U početku je bio aeriran zrakom, a kasnije se tijekom 5 minuta u bubanj uvodio čisti dušik. Na izlaznom ventilu sustava postavljen je paramagnetski analizator kisika, te je dobiven oblik krivulje

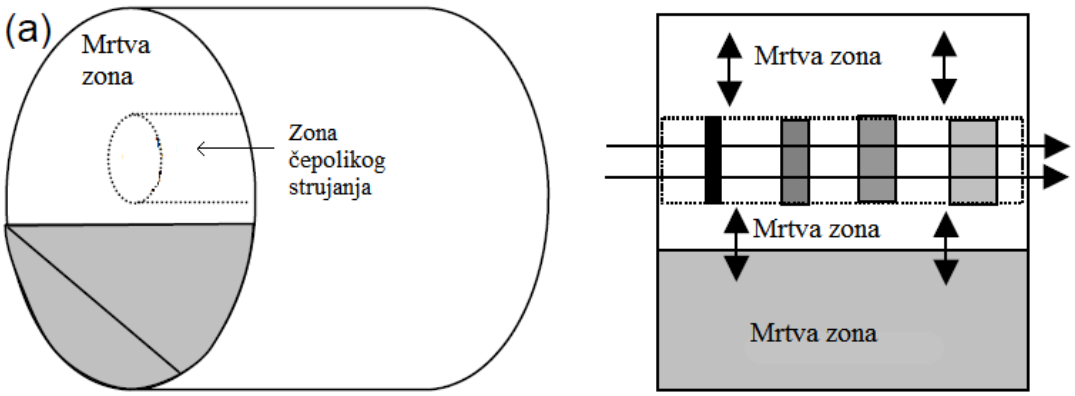
odaziva uspoređivan s krivuljama koje bi se mogle očekivati pri nekoliko mogućih teorijskih režima strujanja. Istraživanje je uključivalo utjecaje faktora poput volumnog protoka (2.7 i 5.0 L/min), količine supstrata (0, 1 i 2 kg pšeničnih mekinja) i 4 brzine rotacije (0, 5, 10 i 50 o/min). U nekim slučajevima su dobivene krivulje odgovarale režimu tečenja u kojem postoji nekoliko dobro miješanih područja spojenih u seriju (slika 19a), dok su krivulje u drugim slučajevima odgovarale čepolikom tečenju s aksijalnom disperzijom (slika 19b). Brzina rotacije bubnja nije utjecala na tip režima protoka plinova u vršnom prostoru bubnja. Pri obje istražene vrijednosti volumnih protoka je režim protoka plinova u bubnjevima bez supstrata odgovarao režimu koji se javlja kad se unutar vršnog prostora u bubnjevima nalazi jedno do dva dobro miješana područja spojena u seriju. Nadalje, u prisutnosti supstrata postojala je razlika u režimima protoka plinova pri različitim volumnim protocima. Pri obje vrijednosti koeficijenta punjenja supstrata i pri volumnom protoku plinova 2.7 L/min krivulja odaziva je pokazala da u vršnom prostoru postoji jedno do tri područja dobrog miješanja spojena u seriju. Krivulja odaziva u bubnju sa protokom od 5.0 L/min odgovarala je čepolikom strujanju s aksijalnom disperzijom.



Slika 19. U različitim uvjetima, režim protoka plinova u bubanjskim bioreaktorima može biti (Mitchell i sur., 2006):
a) sastavljen od nekoliko dobro miješanih područja spojenih u seriji, ili
(b) čepoliki protok sa aksijalnom disperzijom.

Hardin i sur. (2001) su provodili istraživanje režima strujanja plinova pomoću ugljikovog monoksida u bubnju volumena 200 L. Režimi strujanja su odgovarali središnjem čepolikom strujanju, okruženom vanjskom mrtvom zonom miješanja (slika 20). Mrtva zona miješanja uključuje dio plinova vršnog prostora i sav plin koji se nalazi između čestica sloja. U mrtvoj regiji dolazi do dobrog miješanja u radijalnom smjeru, ali nema aksijalnog transporta.

Najveći učinak na udio koji u bubnju zauzima mrtva zona i na brzinu prijenosa mase između sloja sa čepolikim strujanjem i vanjske mrtve zone imale su prisutnost ili odsutnost podizača i površinska brzina zraka. Površinska brzina zraka definirana je kao omjer volumnog protoka zraka i površine presjeka praznog bubnja. S povećanjem površinske brzine zraka bilo je manje miješanje između čepolike i mrtve regije, a mrtva zona je zauzela veći udio volumena plina u bubnju. U usporedbi sa situacijom kada su odsutni podizači, njihova prisutnost je dovela do veće izmjene između čepolikog i mrtvog područja pa je mrtva regija zauzimala mali udio bubnja (slika 20).



Slika 20. Deskriptivni model napravljn prema istraživanjima koja su provodili Hardin i sur. (2001) (adaptirano u Mitchell i sur., 2006).

Nažalost, uz sva dosadašnja istraživanja ne mogu se izvesti generalni zaključci o faktorima koji utječu na protok plina u vršnom prostoru bioreaktora s rotirajućim bubnjem. Do sada je jedino jasno da protok plinova u vršnom prostoru uvelike ovisi o pozicioniranje ulaznih i izlaznih otvora za plinove i da protočna aeracija ne znači nužno i da je miješanje plinova u vršnom prostoru bubnja adekvatno (Mitchell i sur., 2006).

Na temelju ranije navedenih spoznaja i eksperimentalnih podataka dostupnih u literaturi koja se bavi primjenom rotirajućih bubanjskih bioreaktora u procesu uzgoja na čvrstim supstratima, mogu se donijeti ovi zaključci:

1. Pri korištenju bioreaktora s rotirajućim bubnjem bitno je odrediti brzinu rotacije. Korištenje podizača nije ključno ako je brzina rotacije veća od 10% kritične brzine, no takvo rješenje zahtijeva više energije za rotaciju. Pri korištenju podizača dovoljne su male brzine rotacije da bi se ostvario efekt miješanja.
2. Korištenje zaobljenih podizača i naginjanje bubnja u odnosu na horizontalan položaj potiče miješanje. Dosadašnja istraživanja nisu u mogućnosti odrediti optimalni oblik zaobljenih podizača, ali je poznato da nagibni kut aksijalne osi bioreaktora ne smije biti veći od dinamičkog kuta nagiba sloja.
3. Primjena isprekidanog miješanja najvjerojatnije neće donijeti veliku korist u velikom mjerilu, a donosi dodatni problem svadanja intercije prilikom pokretanja i zaustavljanja miješanja.
4. Volumni koeficijent punjenja ne bi trebao biti veći od 0,4, tj. trebao bi biti što veći a da pritom pretjerano ne ometa učinkovitost miješanja, što se mora odrediti eksperimentalno za svaku kombinaciju čvrste hranjive podloge i mikroorganizma.
5. Saznanja o bioreaktoraima s rotirajućim bubnjem još uvijek su nedovoljna da bi se moglo reći koji je najbolji dizajn miješala za taj tip bioreaktora.

Anonymous 1 (2015)
<http://www.hortico.com.au/products/plant-food/hortico-plant-fertiliser-for-flowers-fruit-vegies>. Pristupljeno 14. lipnja 2015.

Ali H. Kh. Q., Zulkali M.M.D. (2011), Utilization of agro-residual ligno-cellulosic substances by using solid state fermentation: A Review. *Croat. Journal of Food Tech., Biotech. and Nut.* **6** (1-2), 5-12.

Brinchi, L., Cotana, F., Fortunati, E., Kenny, J.M. (2013), Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: *Technology and applications*. *Carbohyd. Polym.* **94**, 154-169.

Buljubašić, M. (2012) Mogućnosti korištenja lignoceluloznih sirovina poljoprivrednog porijekla u Republici Hrvatskoj. Završni rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

De Reu J.C., Zwietering M.H., Rombouts F.M., Nout M.J.R. (1993) Temperature control in solid substrate fermentation through discontinuous rotation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**:261–265.

Dominguez A., Rivela I., Couto S.R., Sanroman M.A. (2001) Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. *Process. Biochem.* **37**:549–554.

Fazenda M. L., Seviour R., McNeil B., Harvey L. M. (2008), Submerged culture fermentation of ‘‘higher fungi’’: The macrofungi. U: *Advances in Applied Microbiology*, **64**, 34-92. Elsevier academic press inc, San Diego, USA.

Fung C.J., Mitchell D.A. (1995) Baffles increase performance of solid-state fermentation in rotating drums. *Biotech. Techniques* **9**:295–298.

Hardin M.T., Howes T., Mitchell D.A. (2001) Residence time distributions of gas flowing through rotating drum bioreactors. *Biotech Bioeng* **74**:145–153.

Henein H., Brimacombe J.K., Watkinson A.P. (1983) Experimental study of transverse bed motion in rotary kilns. *Metall. Trans.* **14B**: 191-205.

Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., Howard S. (2003), Review: Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African J. Biotechnol*. **2** (12), 602-619.

Kalogeris E., G. Fountoukides, D. Kekos, Macris B.J. (1998), Design of a solid-state bioreactor for thermophilic microorganisms, *Biores. Technol*., **67**: 313-315.

Kubicek, C. P. (2013), Fungi and lignocellulosic biomass. Wiley New York, str. 3.

Mienda B.S., Idi A., Umar A. (2011), Review Article - Microbiological features of solid state fermentation and its applications - An overview, *Res. in Biotech*., **2**(6): 21-26.

Mitchell, D. A., Berovič, M., Krieger, N. (2002) Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnol. Annu. Rev.* **8**, 183-225.

Mitchell D. A., Krieger N., Berovič M. (2006), Solid-state fermentation bioreactors, Fundamentals of design and operation, Springer, Berlin Heidelberg, 1-114.

Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., Teixeira, J. A. (2009), Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. U: Biotechnology for agro-industrial residues, (Singh nee' Nigam P.; Pandey A., ured.), 121-140.

Nigam, P.S., Pandey, A. (2009) Solid state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. U: Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. Nigam, P.S., Pandey, A. Coleraine, 197-219.

Pandey A., Soccol C. R., Mitchell D. (2000), New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* **35** (10) 1153–1169.

Schutyser M.A.I., Padding J.T., Weber F.J., Briels W.J., Rinzema A., Boom R.M. (2001) Discrete particle simulations predicting mixing behavior of solid substrate particles in a rotating drum fermenter. *Biotech Bioeng* **75**: 666–675.

Stuart D.M. (1996) Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors. Ph.D. thesis, The University of Queensland.

Stuart D.M., Mitchell D.A., Johns M.R., Litster J.D. (1999) Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: Operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. *Biotech. Bioeng.* **63**:383–391.

Wightman C., Muzzio F.J. (1998) Mixing of granular material in a drum mixer undergoing rotational and rocking motions I. Uniform particles. *Powder. Technol.* **98**:113–124.