



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО

КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ”

ас. инж. Тодор Великов Иванов

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА БИОПРОЦЕСИ В
МАГНИТНО АСИСТИРАН СЛОЙ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия и химия на
физиологичноактивните вещества)

Научни ръководители: проф. д-р инж. Йордан Янков Христов

проф. д-р инж. Любов Константинова Йотова

Научно жури:

1. доц. д-р Нели Вladoва Георгиева – кат. „БТ”, ХТМУ - председател
2. проф. д-р Венко Николаев Бешков – ИИХ-БАН - рецензент
3. проф. д-р инж. Драгомир Симеонов Янков – ИИХ-БАН – рецензент
4. проф. д-р Калоян Кирилов Петров – ИИХ-БАН
5. проф. д-р инж. Йордан Янков Христов - кат. „ИХ”, ХТМУ

София, 2017

Дисертационният труд е написан на 119 страници, съдържа 60 фигури и 27 таблици. Цитирани са 113 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на Разширен научен съвет на научното звено на катедра „Биотехнология”, състояло се на 12.12.2016г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 27.03.2017г. от 14 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересувашите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

HGMS – високоградиентно магнитно сепариране

CHГМП – сепаратори с нисък градиент на магнитното поле

CBГМП – сепаратори с висок градиент на магнитното поле

MSFBR (МСФСР) – реактор с магнитно стабилизиран флуидизиран слой

MAC - магнитно асистиран слой

magn.FIRST – полето е включено преди началото на работа на апарата

Re_g – критерий на Рейнолдс за газовата фаза

Re_L – критерий на Рейнолдс за течната фаза

ID – вътрешен диаметър на апарата

L – височина на апарата

PANAM – поли(акрилонитрил-съ-акриламид)

PANMA – поли(акрилонитрил-съ-малеинова киселина)

АСБ – абсолютно суха биомаса

РИИ – реактор с идеално изместване

РИС – реактор с идеално смесване

ЕПС – екстрацелуларни полимерни субстанции

ХПК - химическа потребност от кислород

УВОД

За голяма част от промишлените операции като пречистване на отпадъчни води, фармацевтични производства, хранително-вкусова промишленост, биологичните процеси в енергийно отношение са по-ефикасни и замърсяват по-малко околната среда отколкото използването на стандартните методи. Например, възможно е да се получат липиди при 60°C като се използва ензима липаза, докато стандартните производства се основават на хидролиза, провеждана при висока температура в присъствие на катализатор или високо налягане. Етапът на сепариране при такъв биотехнологичен процес обаче може да се окаже сложен и трудоемък, да увеличи капиталовложенията и производствените разходи. Процесите за изолиране на ензимите като центрофугиране и хроматография могат да причинят т.нар. “тясно” място в производствения процес. Освен това поради загуба на ензимите при непрекъснатите процеси, използването им се ограничава до провеждането на периодични процеси. За да се преодолеят затрудненията при използването на ензими, последните могат да бъдат имобилизирани върху носители.

При имобилизирането на биокатализатори върху носители се повишава ефикасността при сепарирането. Възможно е процесът да се води непрекъснато и в много случаи се повишава ензимната стабилност. Необходимостта от големи размери на носителите за бързо сепариране е в противоречие с изискванията за масообмен. Например, при увеличаване размера на ензимния носител, поради субстратна дифузия, скоростта на реакцията може да бъде намалена. За да стане възможно използването на малки по размер носители за имобилизиране на ензими, се разработват носители с магнитни свойства. Носителят с магнитни свойства се състои от магнитен материал, който придава магнитни свойства на частиците и повърхностна функционална група, която свързва желаните биоагенти.

Като се формулират физичните, химични и повърхностни свойства на носителите може да се достигне специфично или неспецифично свързване и изолиране на ензими, протеини, колоиди и макромолекули. Веднъж имобилизирани на магнитни носители, ензимите могат да бъдат ефикасно изолирани и манипулирани в редица апарати, създаващи магнитно поле. Следователно при прилагане на магнитно поле, могат да се използват и разделят частици с висока активност понякога с диаметър само от няколко μm . Магнитните носители, в зависимост от своите размери и свойства, намират приложение в следните процеси: Непрекъснато изолиране и пречистване на белтъци; Ензимни процеси; Алкохолна ферментация; Пречистване от ксенобиотици и тежки метали; Транспорт на лекарства и др.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Въз основа на направения литературен обзор и установените основни изисквания към реакторите с МАС (магнитно-асистиран слой), специфичните изисквания към носителите с магнитни свойства, които могат да бъдат използвани за провеждане на биопроцеси в такъв тип реактори, си поставихме цел в реактори с МАС да бъдат проведени и изследвани, при различни режими, биопроцеси с имобилизирани ензими (трипсин) и клетки (бактерии *P. Denitrificans* и дрожди *Saccharomyces Cerevisiae*). За осъществяване на поставената цел са поставени следните основни задачи:

1. Получаване и изследване на различни полимери, подходящи за получаване на носители с определени размери, както и използване на съществуващи полимери и материали.
2. На база съществуващи, и синтезирани полимери и материали да бъдат получени частици с магнитни свойства, като се използват различни методи за включване на магнитния материал.
3. Охарактеризиране на частиците по отношение на основни физични и механични свойства (външен вид, еднородност, размери, плътност, свободен обем).
4. Върху получените носители да бъдат имобилизирани по различни методи, ензими и клетки, и охарактеризирани по отношение на тяхната активност.
5. Създаване на колонен биореактор, подходящ за използване на имобилизираните ензими и клетки, и монтиран в системата от намотки на Хелмхолц, като размерите и положението на апарата да гарантират, наличието на хомогенно магнитно поле в обема му.
6. Провеждане на основни хидродинамични изследвания, които да установят основните режими: фиксиран слой и стабилизиран флуидизиран слой, както и възможността за задържане на частиците в слоя, въз основа на техните магнитни свойства.
7. Провеждане на процеси на ензимна трансформация, денитрификация и алкохолна ферментация.
8. Разработване на модели, които да описват влиянието на хидродинамичните условия върху масообмена в апаратите.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. ПОЛУЧАВАНЕ НА СЪПОЛИМЕРИ ЗА ФОРМУВАНЕ НА НОСИТЕЛИ.

- Получаване на поли(акрилонитрил-съ-акриламид)

Съполимеризацията на акрилонитрил и акриламид протича по свободнорадикаловия механизъм, като инициатори на полимеризацията се използват FeSO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ и $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. Съполимеризацията протича за 1 час при стайна температура и разбъркване. Съполимерът се филтрува и промива обилно с вода на бюхнерова фуния като накрая се промива с метанол. Суши се във вакуум сушилня при 50°C . За получаване на съполимери, съдържащи различни количества акриламид бяха заредени следните реактиви (представени в таблица 1):

Таблица 1. Реакционни системи за получаване на съполимери на акрилонитрил и акриламид

№	H_2O (ml)	Акрило- нитрил (ml)	Акриламид 50%разтвор (ml)	Състав на съполимерите (%)	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 1%(ml)	FeSO_4 1%(ml)	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 1%(ml)
1	177	15	3,0	10%	5	5	10
2	175,5	15	4,5	15%	5	5	10
3	174	15	6	20%	5	5	10

За анализ на съполимерите, и доказване на съдържанието на амидни групи е използвана FTIR (Perkin Elmer 1600), в диапазона от 3500 до 500cm^{-1} . За определяне на добива, изсушения до постоянно тегло съполимер беше претеглен на аналитична везна, и полученото количество сравнено с теоретичния добив.

- Получаване на поли(акрилонитрил-съ-малеинова киселина)

Съполимеризацията на акрилонитрил и малеинов анхидрид протича по свободно радикаловия механизъм като началния стадий е иницирирането, в резултат на което се получават свободни радикали. За иницирирането на полимеризацията във водна среда се използват неорганичните инициатори динатриев сулфит, диамониев пероксодисулфат (Таблица 2). Процесът на съполимеризация продължава 2 h и 30 min, при непрекъснато разбъркване и подгряване на водна баня при температура 60°C . Следва филтруване на бюхнерова фуния, промиване обилно с дестилирана вода и метанол. Съполимерът полиакрилонитрил-малеинова киселина се суши във вакуум сушилня при 50°C .

Таблица 2. Реакционни смеси за получаване на поли(акрилонитрил-съ-малеинова киселина)

Получен съполимер	Акрилонитрил [ml]	Малеинов анхидрид [g]	Съдържание на малеинова киселина [%]	Na ₂ SO ₃ [g]	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ [g]
PANMA ₁	16	5	2.4	0.3	0.5
PANMA ₂	15	6	3.7	0.3	0.5

В получените съполимери са определени процентното съдържание на малеиновата киселина, чрез титруване с 0.05N натриева основа при индикатор фенолфталеин. ИЧ – спектрите на двата полимера са снети в таблетка калиев бромид на апарат FTIR Perkin – Elmer 1600 в областта 3500 – 500 cm⁻¹ с разделителна способност 4 cm⁻¹.

2. ФОРМУВАНЕ НА МАГНИТНИ НОСИТЕЛИ

• Магнитни носители на база пенополиуретан

За имобилизиране на микроорганизми бяха получени магнитни носители на база полиуретанова пяна (преполимер, (Siroflex Ltd England) и търговски продукт пенополиуретан. Използвани са два вида магнетитен материал: “железни стружки” (0,2-0,5mm) и магнетит (Fe₃O₄, Merck). След смесване и хомогенизиране в продължение на 1min получената смес се изчаква да се втвърди 24h при стайна температура. Полимеризирания материал се нарязва на кубчета с размери 3x3x3mm. Частици от готова търговската полиуретанова пяна, се формират чрез нарязване на частици 3x3x3mm в мокро състояние на пяната. Магнитните свойства на получените частици се придават чрез In-situ формиране на магнитни частици в полимерната матрица.

Наночастици от метални оксиди, като магнетит Fe₃O₄ и мехамит γ-Fe₂O₃ най-често се синтезират чрез преципитиране в алкална среда на феро и фери соли. В 20ml дестилирана вода се разтварят железните соли в определено молно съотношение FeCl₃·6H₂O и FeSO₄·7H₂O (молно съотношение Fe³⁺:Fe²⁺ = 1.5:1). Към получения разтвор се прибавят 1g полиуретанови носители. След омокрянето на носителите от разтвора, те се отделят чрез филтруване и при интензивно разбъркване се потапят в концентриран разтвор на NH₄OH. След нагряване до 80-100 °C, частиците престояват 24 часа, филтруват се, промиват се няколкократно и се изсушават при 105 °C. Процедурата се повтаря няколко пъти до достигане на нужното количество магнетит на g носител.

Плътността на получените частици е определена пикнометрично. Плътността на твърдото тяло се определя по формулата: $\rho_{\text{тяло}} = m_{\text{тяло}}/V_{\text{тяло}}$, където $V_{\text{тяло}} = V_{\text{мерителна колба}} - m_{\text{H}_2\text{O}}/\rho_{\text{H}_2\text{O}}$. Определяне на свободния обем на единица обем от

носителите, се осъществява чрез претегляне на определено количество частици, определяне на обема им от геометричните им размери, и претеглянето им след сушене при 50 °C. $V_{\text{void}} = ((M_{\text{support_wet}} - M_{\text{support_dry}}) / \rho_{\text{H}_2\text{O}}) / V_{\text{support}} [\text{m}^3/\text{m}^3]$

- **Магнитни микрочастици (носители) на база получените съполимери**

За формуване на магнитни носители 10g от изсушения полимер се разтварят в 100ml диметилформамид, след което се добавя Fe_3O_4 (Мерк) в различни количества 0, 10 и 20% спрямо съполимера. Така получения вискозен разтвор се нагрява до 60 °C, и се формува [1].

3. ИМОБИЛИЗИРАНЕ НА ЕНЗИМИ КЪМ МАГНИТНИ ЧАСТИЦИ

- **Имобилизиране на трипсин към поли(акрилонитрил-съ-малеинова киселина) и поли(акрилонитрил-съ-акриламид)**

Имобилизиран е трипсин при pH 4.0 и 7.5 върху съполимер PANMA_1 и PANMA_2 под формата на частици. Активиране на съполимера, се осъществява във вакуум при температура 120 °C в продължение на 3 часа. Имобилизирането на трипсин върху съполимери, съдържащи акрилонитрил и малеинов анхидрид, се провежда като в мерителна колба от 100 ml се суспендират 2 g активирани частици (PANMA_1 - съполимер, съдържащ 2.4% малеинова киселина; PANMA_2 - съполимер, съдържащ 3,7% малеинова киселина) в 20 ml 0.1M фосфатен буфер с pH 7.5 или 20 ml 0.1M ацетатен буфер с pH 4.0. Към получения разтвор се прибавя предварително определено количество трипсин (от 50 mg до 500 mg белтък). Пробата се разбърква при 4°C в продължение на 19 часа. При тези условия ензимът се свързва ковалентно чрез връзки между анхидридните групи на полимера и аминокрупите от ензимните молекули.

Имобилизирането на трипсин към частици от поли(акрилонитрил-съ-акриламид) е проведено по азидния метод [1].

- **Определяне съдържанието на имобилизиран белтък в носителите**

За определяне на количеството имобилизиран белтък се използва модифициран метод на Лоури [2]. Методът се основава на измерване на получаващото се синьо оцветяване, резултат на взаимодействието на белтъка с меднотартаратните йони в алкална среда и редукцията на фосфомолибденовата – фосфоволфрамвата киселина от наличните в белтъчната молекула аминокиселини тирозин и триптофан. Необходимите реактиви са: I. Реактив на Folin и Ciocalteu, Реактив II. 0,5 ml 1 % разтвор на $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,5 ml 2 % разтвор на сегнетова сол и 50 ml 2 % разтвор на Na_2CO_3 в 0,1 M NaOH.

В чаша се претеглят 0,5 g носител с имобилизиран трипсин. Към него се прибавят 5 ml от реактив II и 0,5 ml дестилирана вода. Така приготвената проба се разбърква на магнитна бъркалка при стайна температура. След 1,30 часа се отпипетира 0,5 ml реактив

Folin и Ciocalteu. Пробата се разбърква в продължение на 30 минути, след което се фотометрира при 750 nm срещу контрола, приготвена паралелно с пробата и съдържаща 5 ml от реактив II, 1 ml дестилирана вода и 0,5 ml реактив на Folin и Ciocalteu. По стандартна права се отчита количеството белтък, съответстващо на измерената абсорбция.

- **Определяне на ензимна активност спрямо нискомолекулен субстрат BAPNA**

Методът се основава на спектрофотометричното определяне на продукта на ензимната реакция при използване на субстрат N α -бензоил-DL-аргинин-p-нитроанилид (BAPNA) [3]. Реакционната система съдържа 1ml 2,2 mM BAPNA, 1,8ml 0,1M триетаноламинов буфер и 0,2 ml трипсинов разтвор (100 μ g/ml в 0,001N HCl) или 0,2g частици с имобилизиран ензим. Разтворът се хомогенизира. След 15 минути, след което реакцията се спира с 1ml 5M оцетна киселина и се измерва абсорбцията при 405 nm срещу контролата.

- **Определяне на протеолитичната активност на свободен и имобилизиран трипсин при използване на естествения субстрат казеин**

Разтваря се 1ml от разтвора на свободен трипсин с концентрация 0,5 mg/ml в 1ml от 1% разтвор на казеин. Така полученият разтвор престоява 20 минути при стайна температура. След изтичане на определеното време се спира ензимната реакция като се прибавя 3ml 5% разтвор на трихлорооцетна киселина. Разтворът престоява 30 минути при стайна температура, за да се окрупни утайката. Филтрува се получения разтвор. На филтратата се определя абсорбцията при 280nm. За определяне на протеолитичната активност на имобилизиран трипсин при използване на субстрат казеин се използва 0,1000g, носител с имобилизиран трипсин, след което се прибавят 3,9ml 0,1M фосфатен буфер с pH=7,6 [1].

- **Определяне на инхибиторна активност**

Методът се основава на определяне остатъчната трипсинова активност на трипсина, който не участва в трипсин-инхибиторния комплекс и катализира хидролизата на N α -Бензоил-DL-аргинин-p-нитроанилид. Образуваният се в хода на реакцията p-нитроанилин се определя при 405 nm. Активността на аprotинина се изразява в протеиназни инхибиторни единици (ПИЕ). Една ПИЕ дефинира онова количество аprotинин, което потиска активността на 2 ПЕ (протеиназни единици) до 50 %. Една ПИЕ съответства на 1000 антитрипсинови единици (АтрЕ). Трипсиновата и инхибиторната проба се фотометрират при 405 nm. Абсорбцията на инхибиторната проба трябва да бъде в границите на 0.5 – 0.7. Абсорбцията на инхибиторната проба трябва да бъде от 40 до 60 % от абсорбцията на трипсиновата проба.

Активността на аprotинина се изчислява по следната формула:

$$A_{trE}/mg = \frac{(A_T - A_{in}) \cdot 6 \cdot 1000}{10,4 \cdot 15 \cdot 0,4 \cdot c}, \text{ където:}$$

A_T – абсорбция на трипсиновата проба; A_{in} – абсорбция на инхибиторната проба;

6- обем на реакционната смес (ml); 10,4 – моларен абсорбционен коефициент на р-нитроанилина при 405 nm ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$); 15- реакционното време (min); 0,4 – вложен обем апротинин (ml); c – концентрация на апротинина (mg/ml).

- **Афинитетно свързване на базичен трипсинов инхибитор**

За афинитетно свързване на трипсинов инхибитор, 1 g от носителя с имобилизиран трипсин се суспендира в 8,5ml Трис буфер с рН 7,8. Към суспензията се прибавя 1 ml разтвор на инхибитора. В продължение на 30 минути, при разбъркване, се провежда афинитетното свързване. Количеството на несвързания лигат се определя по метода за инхибиторна активност. След промиване на носителя със свързания инхибитор, последният се десорбира при рН 2 на разтвора.

- **Имобилизиране на пероксидаза от хрян върху магнитни частици от поли(акрилонитрил-съ-акриламид)**

Пероксидаза от хрян (HRP, EC 1.11.1.7), Fluka е имобилизирана върху магнитни частици, чрез окисление с перйодна киселина [4]. Определено е количеството имобилизиран ензим, ензимната активност, температурния и рН оптимум на свободния и имобилизиран ензим, както и кинетичните параметри на имобилизиранения ензим [5].

4. ДЕНИТРИФИКАЦИЯ

- **Развитие на чиста култура от *P. Denitrificans***

Леофилизирана чиста култура от щам of *Pseudomonas denitrificans* (NBIMCC 1625) е закупена от Националната Банка за Промислени микроорганизми. След отварянето на ампулата, нейното съдържание се разтваря в 0,9% р-р на NaCl. Първоначално културата се развива на скосен агар. Използваната среда съдържа местен екстракт, пептон и агар (месен екстракт 10g/l; пептон 10g/l; NaCl 5g/l; агар 20g/l) [6].

- **Развитие на *P. Denitrificans* на хранителни среди с различен въглероден източник**

За развитие на щама бяха използвани хранителни среди с въглероден източник калиев аспартат, метанол и глюкоза. Състав на хранителната среда: (в g/l): калиев аспартат 15; дрождеви екстракт 14; KNO_3 8; $MnSO_4$ 0,0025; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0,0025; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,006; рН 6,75. Състав на хранителната среда с въглероден източник глюкоза: (в g/l): глюкоза 10; KNO_3 8; NH_4Cl 6; KH_2PO_4 0,7, NaCl 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,18 + 1ml разтвор на микроелементи $CaCl_2$, $MnCl_2$, $FeSO_4$ по 0,1g в 100ml.

- **Получаване на растежни криви**

Растежните криви се получават, чрез определяне на оптичната плътност при 540nm. Пробите от културалната течност се центрофугират, след което биомасата се ресуспендира в 0,9 % р-р на натриев хлорид, и след подходящо разреждане се определя A_{540} . Аналогично, за определяне на сухо тегло (АСБ), след центрофугиране биомасата се прехвърля в тегловно стъкло и се суши при 105 °C за 24h.

- **Денитрификация**

Денитрификацията се провежда в хранителна среда (синтетична отпадъчна вода за денитрификация) се състои от (в g/l): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 13,68; KH_2PO_4 3,54; CH_3OH 0,576 (0,738ml); KNO_3 0,303. при слабо разбъркване и температура 30°C. Използвана е 2g свежа биомаса. По време на процеса е проследена концентрацията на нитрити и нитрати. Концентрацията на нитрати се определя чрез UV-спектрофотометрия [7]. Концентрацията на нитрити се определя спектрофотометрично, чрез измерване на образувалата се диазониева сол на сулфаниловата киселина, чрез свързване с α -нафтиламин при pH = 2.0–2.5 [7].

- **Получаване на биофилм от *Pseudomonas denitrificans* (NBIMCC 1625) върху немагнитни и магнитни носители.**

За формиране на биофилм са използвани 4 носителя: гранули от поли (акрилонитрил съ-акриламид) със среден диаметър 2mm с включен магнетит и без магнетит; кубчета от пенополиуретан 3x3x3mm с включен магнетит и без магнетит. Получените носители се култивират в хранителна среда в продължение на 10 дни, като на всеки 48h хранителната среда се подменя. Получените носители с биофилм са изследвани чрез оцветяване с кристалвиолет [8].

5. АЛКОХОЛНА ФЕРМЕНТАЦИЯ

- **Имобилизиране на дрожди *Saccharomyces cerevisiae* към полиуретанови магнитни носители**

Към 100ml частици се добавя 200ml дрождева суспензия, получената чрез центрофугиране и промиване на 24h култура. След инкубиране на клатчка в продължение на 3h при 25 °C, се провежда омрежване с 10ml 2,5% разтвор на глутаров алдехид за 15min [9]. Дрождева биомаса е имобилизирана и чрез адсорбция и последващо култивиране на носителите с имобилизирана биомаса. Биомасата се култивира, заедно с носителя, като на всеки 24h, след филтруване на носителите се добавя свежа хранителна среда. Хранителната среда за провеждане на алкохолна ферментация има следния състав (g/l): глюкоза 180, дрождеви екстракт 2,5, пептон 5, $CaCl_2$ 0,025, $(NH_4)SO_4$ 3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,025. Процеса се провежда при 30 °C, pH 4,5 за 8 часа. По време на процеса на всеки час

се взимат проби за определяне съдържанието на остатъчна глюкоза, по DNS метод. За изследване на процес на алкохолна ферментация е използвана и хранителна среда на база царевичен хидролизат с начална концентрация на редуциращи вещества 225g/l, суспендирани вещества 126g/l и плътност 1030kg/m³.

- **Определяне на съдържанието на етанол**

За определяне съдържанието на етанол е използван модифициран метод за определяне на химична потребност от кислород (ХПК) [10]. Съдържанието на етанол се определя чрез дестилация на пробата над разтвор на $K_2Cr_2O_7$ в K_2SO_4 в специално конструирано устройство [11] и преизчисляване на ХПК спрямо етанол, въз основа на теоретични стойности за ХПК на 1mg C_2H_5OH . Етанол като mg/l = ХПК/2,09 mg/l.

6. ИЗСЛЕДВАНЕ НА БИОПРОЦЕСИ В АПАРАТИ С МАС

- **Хидродинамични изследвания**

Експериментите са проведени в лабораторна инсталация (фиг.1), която се състои от стъклена колона с вътрешен диаметър 50mm и височина 600mm, като за различните процеси са използвани колони с различен обем, и магнитна система, състояща се от две Хелмхолцови намотки (вътрешен диаметър 200mm) създаващи хомогенно аксиално магнитно поле с максимален интензитет 50 kA/m. Експериментите са проведени чрез първоначално включване и регулиране на силата на магнитното поле (magn FIRST mode). Чрез у-образен манометър се следи пада на налягане, а чрез линейна скала, се отчита височината на слоя. Хидродинамичните режими бяха определяни чрез визуално наблюдение на слоя и измерване на пада на налягането при интензитет на полето от 0 до 20 kA/m и скорост на флуида 0,001-0,006m/s.



Фигура 1. Снимка лаб. инсталация с магнитна система за изследване на биопроцеси

- **Изследване на ензимни процеси с имобилизиран трипсин**

В колона с общ обем 50ml, е изследвано влиянието на интензитета на полето (при постоянна скорост) върху ензимната активност спрямо нискомолекулен субстрат. Изследвана е и възможността за афинитетно пречистване на трипсинов инхибитор.

- **Изследване на процес на денитрификация**

Периодичен и непрекъснат процес на денитрификация е проведен в колона с обем 100 ml, запълнена с 40 g носители. Синтетичната отпадъчна вода се подава в долната част на колоната с дебити от 200 до 500ml/h. Определена е степента на денитрификация при различните дебити и постоянен интензитет на полето от 10кА/м.

- **Изследване на алкохолна ферментация**

Непрекъснат процес на алкохолна ферментация със субстрат царевичен хидролизат е изследван в колона с общ обем 1000 ml, при постоянен интензитет на полето 10 кА/м и различни дебити на подаване на субстрат. Определена е производителността по отношение на етанол, както и параметрите в модела за масообмен.

7. МАСООБМЕН В БИОРЕАКТОР С МАС

При провеждане на биопроцеси в реактори с имобилизирана биомаса и фиксиран слой, в редица случаи може да се предположи, че няма инхибиране от субстрата и продукта, както и наличието на кинетика от първи порядък. При това скоростта на реакцията се представя със зависимостта: $r_c = \text{Карр} \cdot C_0$, където Карр е параметър който зависи от експерименталните условия и отчита сложността на биопроцеса. Когато хранителната среда преминава през слой от имобилизирани частици в биореактора се появяват райони близо до повърхостта на частиците, където скоростта на флуида е много малка. През този слой субстрата преминава по-бавно, основно чрез дифузия, ето защо наблюдаемата скорост на реакцията е по-малка. Скоростта на дифузия през граничния слой е пропорционална на площта на масообмен и движещата сила на масообмена, т.е. разликата в концентрациите в обема и на повърхността на имобилизираните клетки:

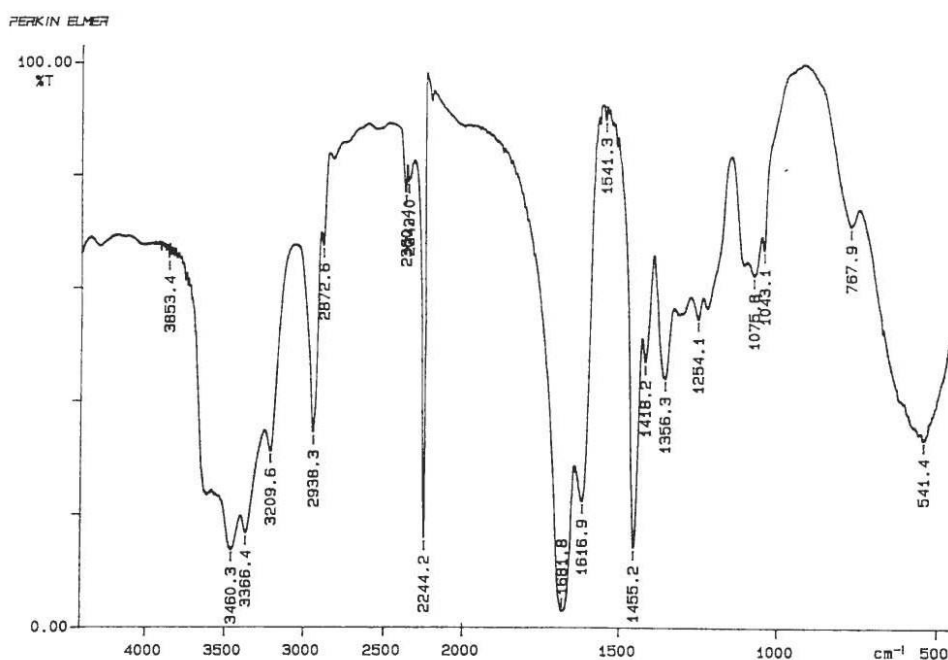
$r_m = k_m \cdot a_m \cdot (C_0 - C_s)$, където r_m е скоростта на масообмен, k_m е коефициента на масообмен, a_m е повърхността на масообмен, C_0 е концентрацията на субстрата в обема, C_s , концентрацията на повърхността на клетките. За математическо описание на влиянието на хидродинамичните условия върху масообмена е използван фактора на Колбърн: $j_D = (k_m \cdot \rho / G) \cdot (\mu / (\rho \cdot D_f))$ [12]. Построяват се прави $1/\text{Карр}$ като функция на $1/G^n$, се получава права с наклон $1/(A \cdot a_m)$ и отрез $1/(k \cdot a_m)$. Тези прави при различни стойности на n и K имат различен наклон и отрез. Правата, която дава стойност на a_m равна на експерименталната, дава точна корелация за масообмена.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ПОЛУЧЕНИТЕ СЪПОЛИМЕРИ

- Поли(акрилонитрил-съ-акриламид)

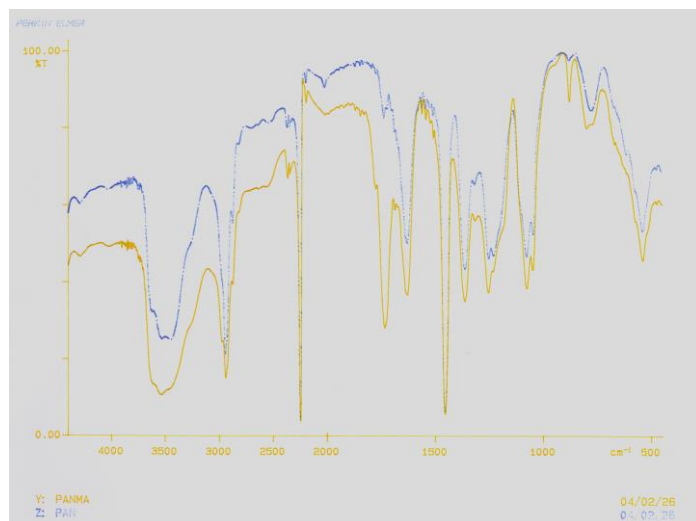
Полученото количество съполимер е 80% от теоретичното. В ИЧ спектъра се наблюдават характерни пикове при $1681,8\text{cm}^{-1}$ за $\nu_{\text{C=O}}$ от амидната група и $2244,2\text{cm}^{-1}$ за ν_{CEN} от нитрилната група (фиг.2). Увеличаването на количеството на акриламида, води до слабо увеличаване на интензитета на пика при $1681,8\text{cm}^{-1}$ и съответно увеличаване на количеството на амидната група



Фигура.2. ИЧ спектър на поли(акрилонитрил-съ-акриламид)

- Поли(акрилонитрил-съ-малеинова киселина)

При ИЧ-спектъра на полимерите с малеинова киселина се наблюдава характерната абсорбция за нитрилната група около 2200 cm^{-1} . Наблюдават се ивици на поглъщане, характерни за карбоксилните функционални групи. Освен интензивната абсорбционна ивица на карбонилната група $\nu_{\text{C=O}}$ около 1700 cm^{-1} , се наблюдава и друга характерна абсорбция на ν_{OH} , която потвърждава отнасянето на карбонилната група към карбоксилната група (фигура 3). Поради значително по-здравите водородни връзки при карбоксилните киселини, тяхното уширено ν_{OH} се отмества към 3000 cm^{-1} . Проведените спектроскопски изследвания са доказателство, че макромолекулата на чистия съполимер PANAM е изградена от мономерите акрилонитрил и малеинова киселина.



Фигура 3. ИЧ спектър на поли(акрилонитрил-съ-малеинова киселина)

2. СВОЙСТВА НА ПОЛУЧЕНИТЕ НОСИТЕЛИ

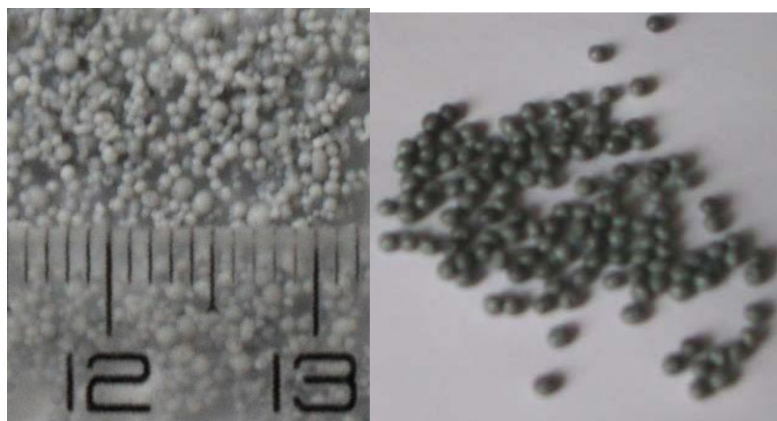
• Физикохимични и механични свойства

От съполимерите поли(акрилонитрил-съ-акриламид) поли(акрилонитрил-съ-малеинов анхидрид) са получени частици със сферична форма, като не се наблюдава тенденция за агрегиране. Свободния обем на частиците от PANAM е 0,8, докато частиците на база PANMA има свободен обем 0,2. Плътността им зависи от съдържанието на магнетит, и варира от 1030 до 1045 kg/m³ (таблица 3). Не се наблюдава остатъчен магнетизъм, и не се формират агрегати след изключване на магнитното поле (тествано по време на експериментите в колона поставена в магнитната система. Средния размер на частиците варира от 100 до 1000 μm (фигура 4).

Таблица №3. Плътност на частиците в зависимост от съдържанието на магнетит

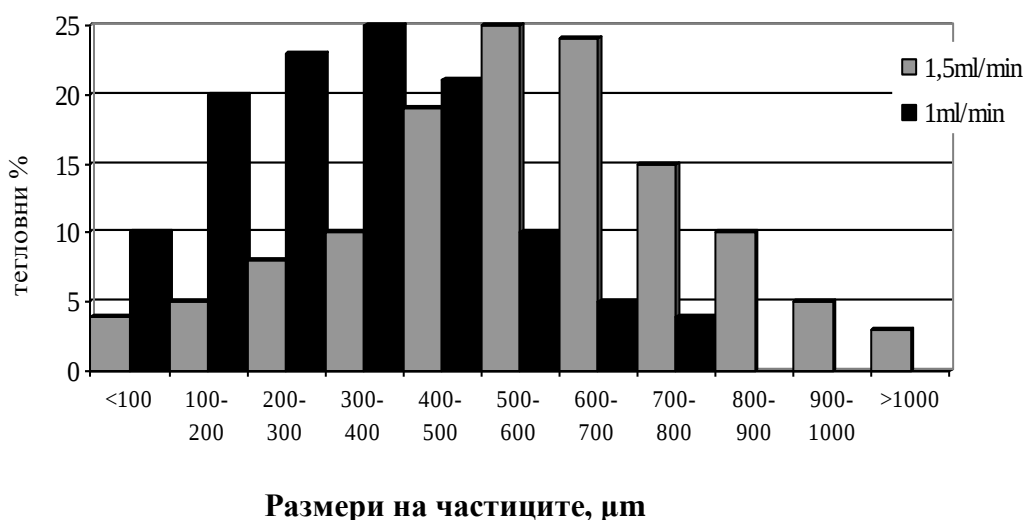
Съдържание на магнетит в частиците	ρ , kg/m ³
Без магнетит	1015
10%магнетит*	1030
20%магнетит*	1045

* Количеството на магнетита е спрямо съдържанието на съполимер



Фигура 4. Снимки на полимерни магнитни частици с различни размери и съдържание на магнетит 10% и 20%

Размерът на частиците, зависи от условията на получаване и скоростта на подаване на разтвора на полимера. Когато скоростта намалява се образува струя от по-малки капки, и обратно. При режим на подаване на разтвора със скорост 1,5ml/min, 49% (w/w) от частиците са с диаметър 500-700 μ m (фигура 5). Тази фракция частици беше използвана за имобилизационните експерименти, като най-подходяща за работа.

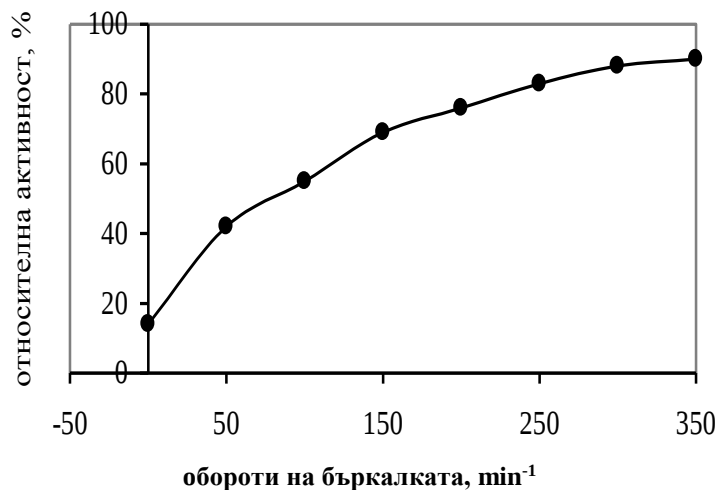


Фигура 5. Разпределение на частиците по размери при два различни дебита на подаване на разтвора, при дебит на въздуха 1L/min.

От фигура 5 се вижда, че успешно могат да се получават частици с различни размери, като при дебит на полимера 1,5ml/min частиците са с размери предимно в диапазона 500-1000 μ m, а при дебит 1ml/min са с по-малки размери (100-400) μ m.

Получената зависимост за влиянието на скоростта на разбъркване на реакционната система (фиг.6), показва, че при скорост на разбъркване (n) над 250rpm/min, относителната ензимна активност достига 80%. В този случай Re на бъркалката = $(n \cdot r_F \cdot d^2 / \mu_F) = 1664$. Повишаването на оборотите на бъркалката над тези стойности не влияе

върху скоростта, и показва, че за нискомолекулен субстрат BAPNA, не се наблюдава лимитиране от масообмена. За високомолекулен субстрат от значение е лимитирането от дифузията на субстрата. Експериментите с казеин показаха, че ензимната активност намалява до 50%, дори и при високи обороти на бъркалката.



Фигура 6. Влияние на оборотите на бъркалката върху относителната активност на имобилизиран трипсин при субстрат BAPNA

Данните за свойствата на получените полиуретанови магнитни частици, показват влияние на количеството магнетит, както върху плътността, така и върху свободния обем (порьозността) на частиците (Таблица 4).

Таблица №4. Физикохимични свойства на получените частици

% (масови) желязна фракция	Плътност влажен kg/m ³	Плътност сух kg/m ³	Свободен обем на единица обем [m ³ /m ³]
Пенополиуретан със затворени пори			
37,8	890	64	0,93
39,2	920	71	0,85
71,4*	1100	175	0,84
72,6	1108	146	0,85
76	1146	201	0,83
% (масови) магнетит	Плътност влажен kg/m³	Плътност сух kg/m³	Свободен обем на единица обем
21,4	660	45	0,93
28	978	65	0,92
42,9	1010	92	0,89
% (масови) магнетит натрупан чрез преципитация	Плътност влажен kg/m³	Плътност сух kg/m³	Свободен обем на единица обем
Пенополиуретан с отворени пори			
100	1050	100	0,9

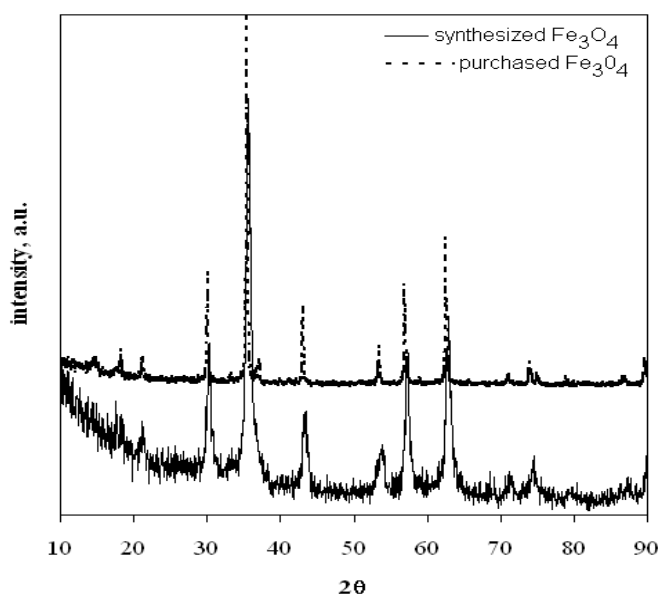
Подходящи носители се получиха при използването на магнитна фракция, което най-вероятно се дължи на невъзможността по-фината фракция да се разпредели в обема на пяната. Въпреки, че по-отношение на свободен обем се получават малко по-добри

резултати, не е възможно постигането на желаната плътност и магнитни свойства, ето защо като най-подходящ беше избран носителя със съдържание на магнетит 71,4%.



Фигура 7. Сепариране на магнитни носители под действие на постоянно магнитно поле.

Получените на база покритие с магнетит на немагнитна частица от пенополиуретан съдържат 100% магнетит, имат отворена структура на порите и плътност съизмерима с тази на използваните субстрати. Вследствие на техните свойства те могат лесно да бъдат сепарирани от реакционната система под действието на постоянно магнитно поле (фиг.7).



Фигура 8. Рентгеноструктурни изследвания на магнитни частици.

X-ray спектри на проба от магнетит Fe_3O_4 (Merck) и синтезиран чрез утаяване на железни соли магнетит, получени на Прахов рентгенов дифрактометър Philips PW1050 с генератор PW1830 с $\text{CuK}\alpha$ ($1.5406\text{\AA}$) лъчение в диапазона от 10 до $90^\circ 2\theta$ при 25°C . Чрез рентгеноструктурен анализ е изследвано дали са синтезирани очакваните частици от Fe_3O_4 . За тази цел са сравнени кристалните структури на определените частици и получените

при експериментите. При сравняване със спектър на Fe_3O_4 (Merck) е установено, че в спектъра на синтезираните частици се наблюдават аналогични пикове, като при чистия продукт. Пиковите при 2θ (Brag angle) стойности от 30.1, 35.5, 43.2, 53.5, 57.1, 62.6°, (фиг.8) съответстват на типичните пикове на частици от Fe_3O_4 .

Таблица 5. Механични свойства на носителите

Тип носител	Промяна под натиск, 500g	Загуби на Fe_3O_4 при работа и съхранение
Сфера, PANAM, 20%AA	Не се наблюдава	не
Сфера, PANAM, 30%AA	Податливи на натиск, въстановяват се	не
Сфера, PANMA	Податливи на натиск, чупливи и нестабилни	-
Куб пенополиуретан затворени пори	Неподатливи на натиск	Да, 0,01%/24h
Куб, пенополиуретан отворени пори	Податливи на натиск, въстановяват се	Да, 0,1%/24h

От изследванията на механичните свойства на носителите е установено, че всички носители освен тези на основа съполимер PANMA имат подходящи механични свойства за приложение в биореактори (таблица 5). Загубата на Fe_3O_4 при частиците е незначителна и за времето на изследванията те не губят магнитни свойства.

- Охарактеризиране на носителите по отношение на количество имобилизиран белтък и ензимна активност**

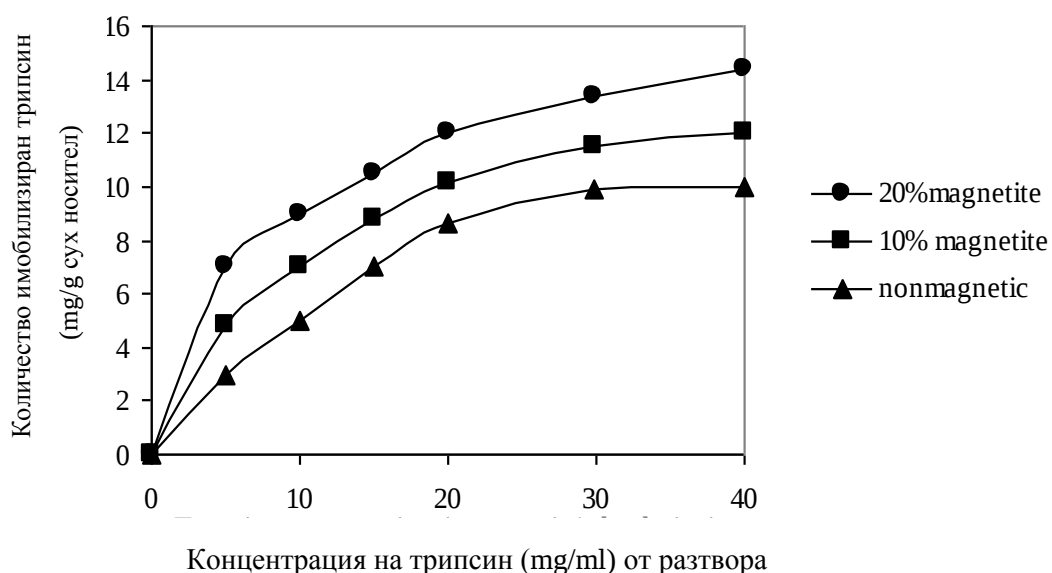
Влиянието на рН върху ефективността на имобилизиране при носители от PANAM е показано на таблица 6. Установено е, че най-голямо количество имобилизиран белтък се достига при рН=6,3. При това рН се достига и най-висока (90%) относителна активност. При увеличаване на рН, количеството имобилизиран трипсин и относителната активност намаляват. Всички имобилизационни експерименти са извършени при рН=6,3.

Таблица №6. Влияние на рН на имобилизация върху ензимната активност и количеството имобилизиран ензим

рН	Количество имобилизиран трипсин, mg/g dry support	Активност U/mg	Активност на свободен трипсин U/mg	Относителна активност, %
6,3	9,20	0,67	0,75	90
7,5	7,65	0,54	0,75	72
9	8,80	0,47	0,75	63

С цел оптимизиране на условията за имобилизиране са проведени експерименти при начални концентрации белтък от 10 до 40g/l. Както се вижда на фигура 9 с увеличаване на

концентрацията на протеина се увеличава и имобилизираното количество белтък, като максималната стойност е 13,0-14,0mg/g сухи частици. По-висок имобилизационен добив е достигнат при концентрация на белтък 20g/l. Максимум 21% от протеина се имобилизира, в зависимост от съдържанието на магнетит и началното съотношение количество белтък/количество частици.



Фигура 9. Влияние на началната концентрация върху количеството имобилизиран белтък

Съдържанието на магнетит влияе положително, както на количеството имобилизиран ензим, така и на ензимната активност (таблица 7). Най-висока активност 0,67U/mg и относителна активност от 90% се наблюдава при частици с 20% съдържание на магнетит. Отчитайки и по-високата плътност на тези частици, може да се твърди, че наличието на магнетит най-вероятно променя вътрешната структура и/или повърхността на частиците, или оказва влияние върху процеса на имобилизиране.

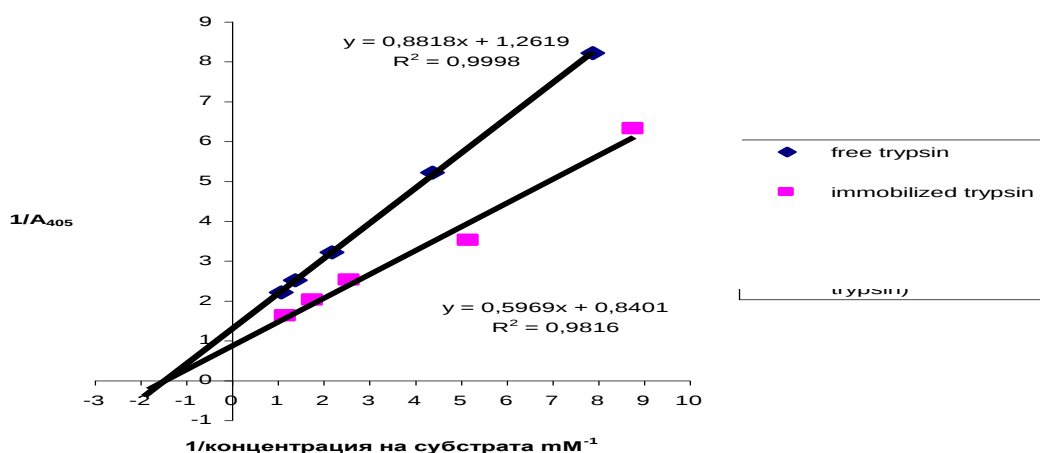
Таблица 7. Влияние на количеството магнетит в частиците от PANAM върху количеството имобилизиран белтък

Съдържание на магнетит в частиците, %	Количество белтък в разтвора, mg/ml	Количество имобилизиран трипсин, mg/g dry support	Активност U/mg	Относителна активност, %
Без магнетит	20	7,85	0,49	65
10%	20	9,20	0,65	87
20%	20	11,40	0,67	90

Имобилизирания трипсин, запазва същия рН оптимум (7,8) и вид на кривата, както и свободния [1].

Имобилизиран на магнитни частици трипсин показва висока относителна активност, и близки стойности на константите K_m и V_{max} , за субстрат BAPNA сравнен

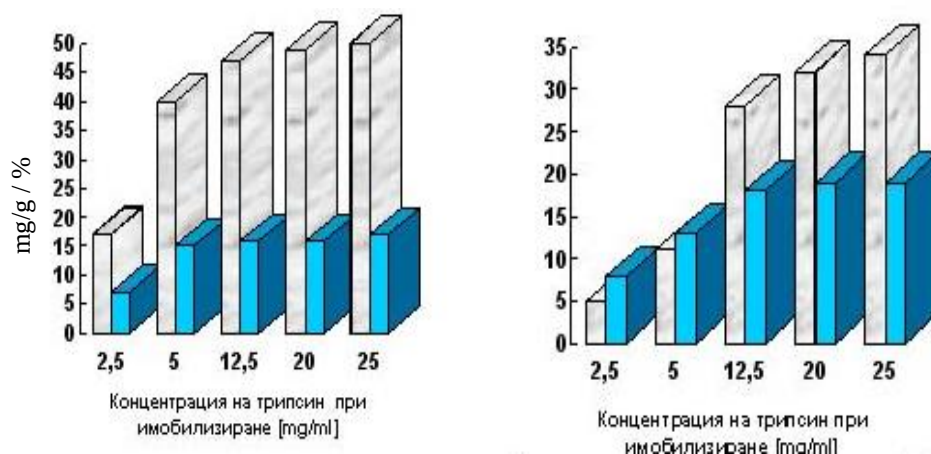
със свободния ензим. Получената стойност за отреза от абсцисната ос е $-1,5 = -1/K_m$, следователно $K_m = 0,67 \text{ mM}$ (фигура 10). Резултатите показват, че имобилизирането на ензима към поли(акрилонитрил-съ-акриламид) магнитни носители, не променя неговото сродство към нискомолекулен субстрат, съответно няма изменения в ензимната молекула, както и ограничения за достъпа на субстрата до активния център на ензима.



Фигура 10. Прави в координати на Лайнуивър-Бърк за свободен и имобилизиран трипсин при субстрат BAPNA

Имобилизиране на трипсин върху носители от PANMA е проведено при pH 4.0. На Фиг. 11 са представени зависимости между количеството на имобилизирания трипсин и относителната му активност в зависимост от концентрацията на ензима в имобилизационната смес при pH 4.0.

При концентрация на трипсин в имобилизационната смес 12.5 mg/ml , частици от съполимерите PANMA1 и PANMA2 свързват най-голямо количество от вложения ензим. Върху тях се имобилизират съответно 47.0 mg/g носител и 28.0 mg/g носител. Понататъшното увеличение на съдържанието на белтък в реакционната смес води до незначително нарастване на количествата ковалентно свързан трипсин (Фиг. 11). Увеличеното количество имобилизиран белтък води и до постепенно, но минимално нарастване на специфичната и относителна активности на имобилизирания трипсин, определени при използване на синтетичния субстрат BAPNA, като 50.0 mg/g и 34.0 mg/g са максималните количества имобилизиран трипсин, съответно върху носителите PANMA1 и PANMA2. Максималните относителни активности са респективно 17% и 19%.



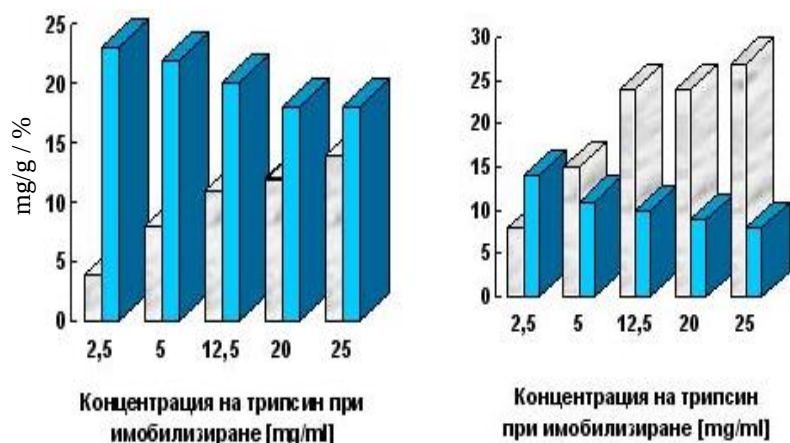
■ - количество имобилизиран трипсин [mg/g]

■ - относителна активност [%]

PANMA1

PANMA2

Фигура 11. Количество имобилизиран ензим и относителна активност при pH 4



■ - количество имобилизиран трипсин [mg/g]

■ - относителна активност [%]

PANMA1

PANMA2

Фигура 12. Количество имобилизиран ензим и относителна активност при pH 7.5

Имобилизация при pH 7.5 При pH 7.5 на имобилизационната среда, носителят PANMA1 достига своя максимум от 8.0 mg имобилизиран трипсин/g носител при концентрация на ензим в разтвора 5.0 mg/ml. Постепенното увеличаване на трипсина довежда до минимални увеличения на имобилизирания ензим. Подобни резултати се наблюдават и за PANMA2, но при концентрация 12.5 mg/ml трипсин в имобилизационната смес. При извършените опити с по-големи концентрации на белтък в пробите, количеството на свързания трипсин нараства в минимална степен (Фиг. 12), като същевременно постепенно намаляват специфичната и относителна активности на имобилизирания трипсин спрямо субстрата BAPNA. Техните максимални стойности се достигат при концентрация 2.5 mg/ml на свободния трипсин при имобилизацията. Въпреки, че при тези условия ензимната активност е най – висока, количеството на имобилизирания белтък е сравнително малко. При носителите PANMA1 и PANMA2

максималните относителни активности на имобилизирания трипсин са съответно 23% и 14%, а количествата свързан белтък съответно са 4.0 mg/g и 8.0 mg/g. При концентрация на трипсин в имобилизационната смес 25.0 mg/ml върху носителите е свързано най-голямо количество ензим, но активностите му са сравнително ниски. Максималните количества имобилизиран белтък, върху съполимерите PANMA1, и PANMA2 са респективно 14.0 mg/g и 27.0 mg/g, като съответните относителни активности достигат само 17% и 8%.

При определяне на протеолитична активност на имобилизиран върху синтетични магнитни носители трипсин с цел избягване на дифузионните ограничения, които могат да възникнат при използване на субстрат с висока молекулна маса, експериментите бяха проведени при интензивно разбъркване 250-300rpm/min. При частиците и от двата полимера, беше наблюдавано значително намаляване на относителната ензимна активност (таблица 8), което показва че дифузията във вътрешността на частиците е скоростопределяща. Разбира се, вероятно има ограничения, които се дължат на имобилизирането на ензима, и достъпността за високомолекулните субстрати.

Таблица 8. Протеолитична активност на имобилизиран трипсин спрямо субстрат казеин

Съполимер в магнитните частици	Относителна активност спрямо нискомолекулен субстрат, %	Относителна активност спрямо високомолекулен субстрат (казеин), %
Поли(акрилонитрил-съ-акриламид)	90	16
Поли(акрилонитрил-съ-малеинова киселина)	17	5

Таблица 9. Количество афинитетно свързан трипсинов инхибитор към магнитни частици от съполимери

Съполимер в магнитните частици	Количество имобилизиран ензим, mg/g сух носител	Количество свързан инхибитор, mg
Поли(акрилонитрил-съ-акриламид)	11,4	2,4
Поли(акрилонитрил-съ-малеинова киселина)	50	2,1

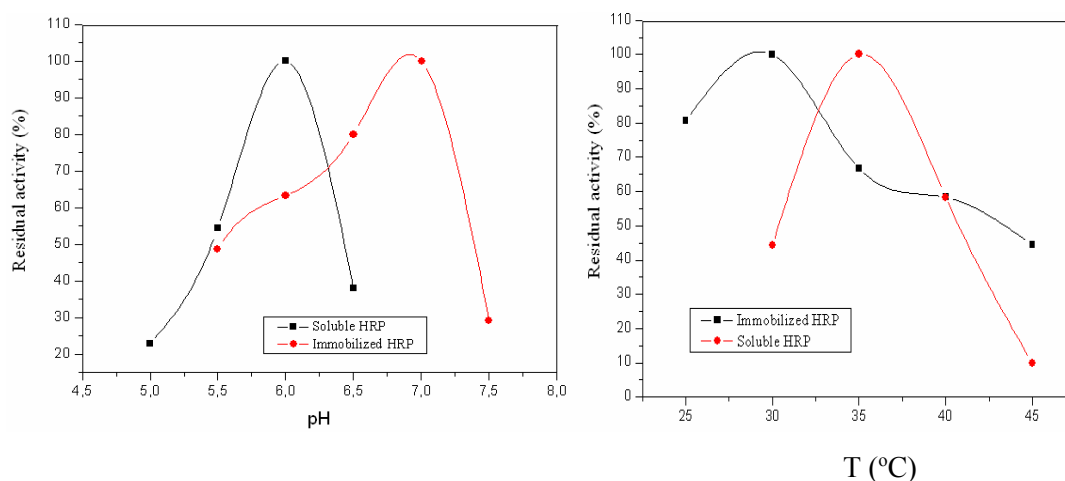
От таблица 9 следва, че съполимера, на база малеинова киселина, свързва малко по-малко количество инхибитор, въпреки голямото количество имобилизиран трипсин. Теоретично 11,4mg трипсин могат да свържат афинитетно 3,2mg инхибитор, като в

магнитните частици от Поли(акрилонитрил-съ-акриламид), което означава 73% активен трипсин, докато в магнитните частици от поли(акрилонитрил-съ-малеинова киселина), активния трипсин е много по-малко, и те не са подходящи за провеждане на процеса.

Относителната активност и кинетичните параметри на имобилизирана пероксидаза от хрян върху магнитни частици от поли(акрилонитрил-съ-акриламид) са показани на таблица 10 и фигура 13.

Таблица 10. Резултати за свободна и имобилизирана пероксидаза

Ензим	Специфична активност U/mg	Относителна активност %	Km [M]	Vm M.10 ⁻⁶ /sec	R ²
Свободен	210		1,19.10 ⁻³		
Имобилизиран	181	86	0,23.10 ⁻³	0,0517	0,9989



фиг.13. рН и температурен оптимум на имобилизирана и свободна пероксидаза [5]

От резултатите, показани в таблица 22, добре се вижда, че имобилизирания ензим, запазва висока относителна активност. При изследване на рН оптимума, се забелязва влиянието на използвания носител, като в случая (фиг.13), се наблюдава промяна от рН 6 до 7. Тази промяна, най-вероятно настъпва поради неравномерното разположение на протоните, причинено от заряда на използвания носител, както и от вероятни дифузионни ограничения. Може да се заключи, че магнитните частици, оказват влияние на ензимните молекули.

- **Охарактеризиране на носителите в процеси на денитрификация**

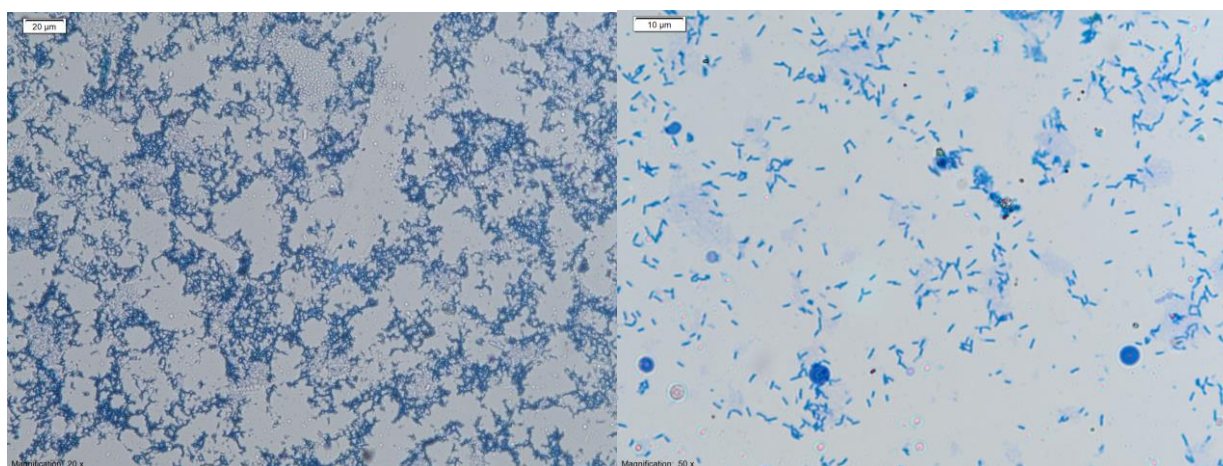
При култивиране *P. Denitrificans* на хранителна среда с въглероден източник калиев аспартат, се наблюдава натрупване на най-голямо количество биомаса, до 9,6g/l, като свежа биомаса. Получената биомаса е с характерен червено-розов цвят, който най-вероятно се дължи на натрупването на пигмента пиорубин [13], а според други

източници причина е пигмента родоксантин, който е характерен за много от микроорганизмите от вида *Pseudomonas*. (фигура 14). Поради връзката на оцветяването с активността на биомасата е възможно то да се дължи на цитохром, който участва в процеса на денитрификация



Фигура 14. Биомаса от *Pseudomonas denitrificans* (NBIMCC 1625) след центрофугиране

При микроскопските наблюдения се наблюдават микроорганизми с продълговата форма и дължина 5-6 μm , както и отсъствието на други микроорганизми (фиг.15).



Фигура 15. Микроскопски наблюдения при оцветяване и две увеличения 120 и 200 пъти (наблюдават се пръчковидни клетки с дължина около 5-6 μm).

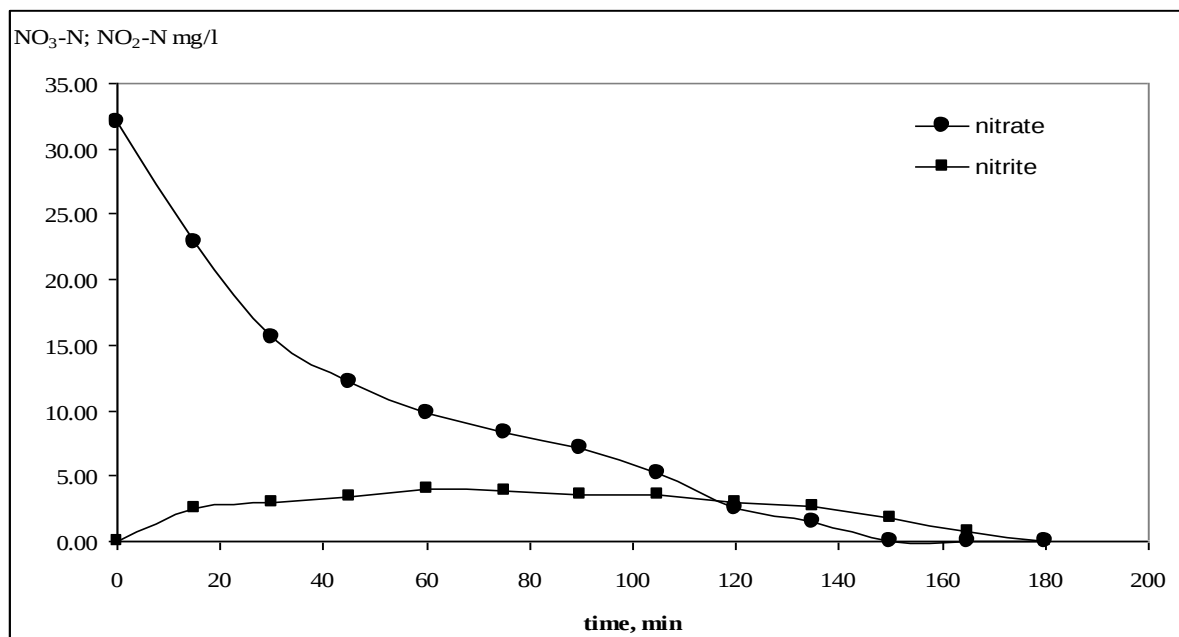
При развитие на въглероден източник глюкоза се наблюдава развитие на биомасата с голяма лаг фаза, до 12 часа, много по-ниски добиви, промяна в цвета на биомасата, и по-ниска денитрифицираща активност (таблица 11).

Таблица 11. Количество на натрупана свежа биомаса

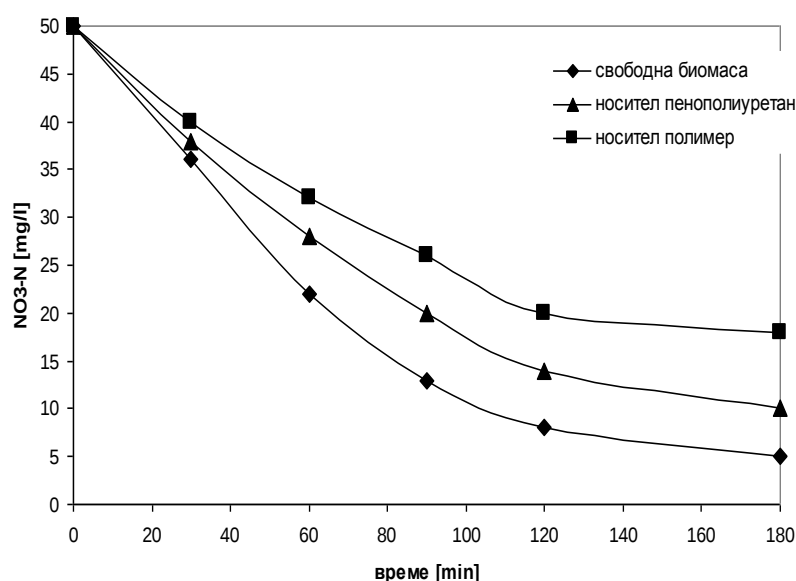
Въглероден източник	Биомаса g/l	Цвят
Калиев аспартат	9,6	Розово-червен
метанол	8,8	Червено-кафяв
глюкоза	5,0	светлокафяв

При измерване на A_{540} при култивиране на хранителни среди на калиев аспартат и метанол се наблюдава приблизително сходен ход на зависимостите, като за 24 часа се достигат максималните стойности [6].

Получената биомаса показва много добра денитрифицираща активност, като за 200 min, или 4 часа се наблюдава пълно изчерпване на нитратите и незначително натрупване на нитрити по време на процеса (фигура 16). Подобна е и активността на имобилизираната биомаса, като за 3 часа се наблюдава намаляване на концентрацията на нитрати от 50 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ до нула (фигура 17).

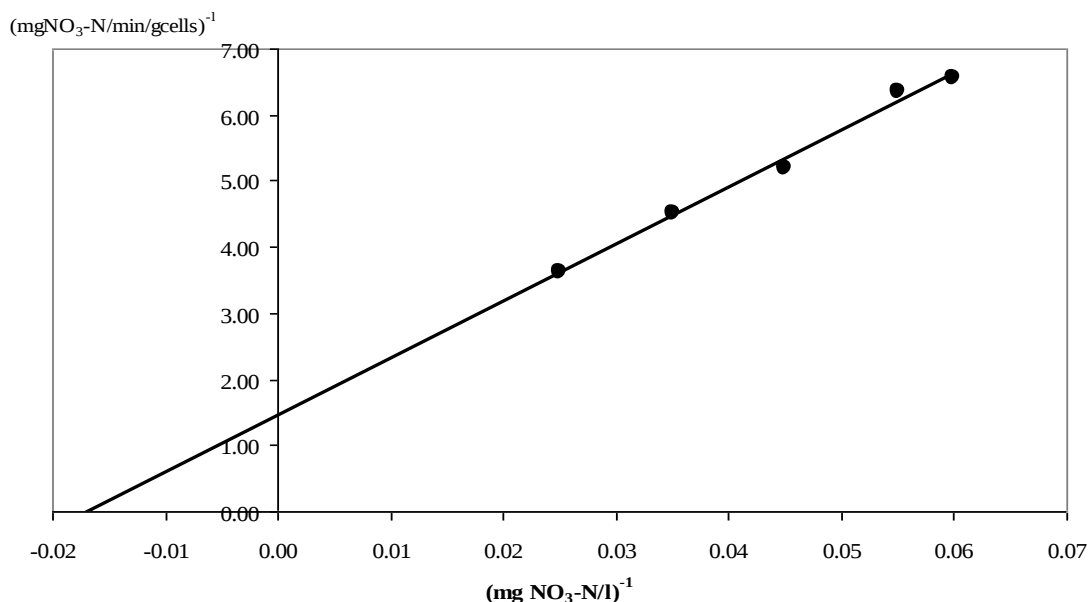


Фигура 16. Денитрификация със свободна биомаса от *Pseudomonas denitrificans* (NBIMCC 1625) (2g/l асб)



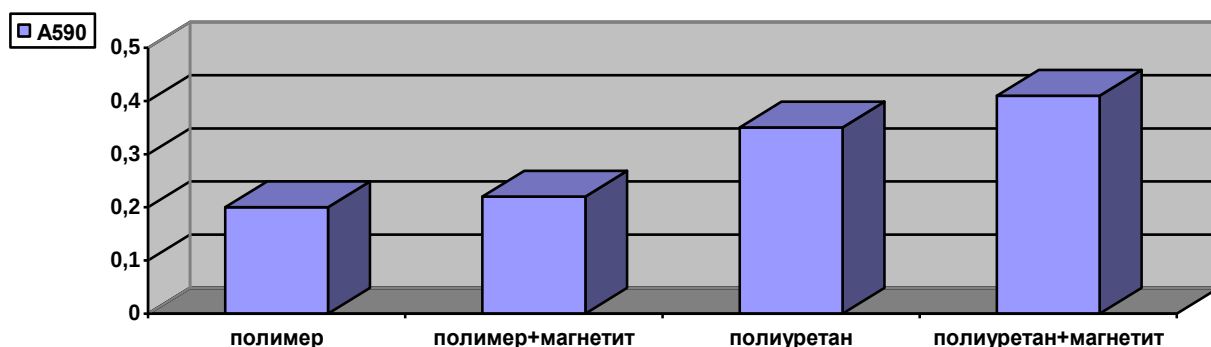
Фигура 17. Денитрификация със свободна и имобилизирана биомаса 50mg/l $\text{NO}_3\text{-N}$ и 20g/l магнитни частици от пенополиуретан (3x3x3) и полимер

С цел по точна оценка на процеса са определени константите V_{max} и K_m е използвано уравнение на Михаелис и Ментен, тъй като при анаеробни условия и при ниски концентрации на субстрата може да се предположи, че определяща за скоростта е ензимната реакция на денитрификация и не се наблюдава инхибиране от нитритите (фиг.18).



Фигура 18. Определяне на константите K_m и V_{max} ($63\text{mg NO}_3\text{-N/l}$ and $0,671\text{mg NO}_3\text{-N/min/g cells}$)

Натрупването на биофилм върху носителите е бавен процес, който протича за 3-4 седмици, като продължителност на процеса той е съизмерим с аналогични изследвания, при които за 5 седмици се наблюдава денитрифицираща активност [14]. Количеството имобилизирана биомаса е най-голямо върху носителите на основа пенополиуретан магнетит, като са достигнати стойности от 91mg/g (таблица 12). Оцветяването с кристалвиолет потвърждава, резултатите от асб (фигура 19).



Фигура 19. Оцветяване с кристалвиолет с цел полуколичествено определяне на биофилма

Таблица 12. АСБ като биофилм върху различни носители

носител	АСБиомаса mg/g
Поли (акрилнитрил-съ-акриламид)	40
Поли (акрилнитрил-съ-акриламид)+Fe ₃ O ₄	48
пенополиуретан	90
пенополиуретан+Fe ₃ O ₄	91



Фигура 20. Снимки на частици, върху които добре се различават части от биофилма

На снимките е показан етап от формирането на биофилма с колоната, както и самите частици с натрупан биофилм. В някои частици, биофилмът е разположен и извън частицата, което увеличава нейните реални размери (фиг.20).

- Охарактеризиране на носителите в процеси на алкохолна ферментация**

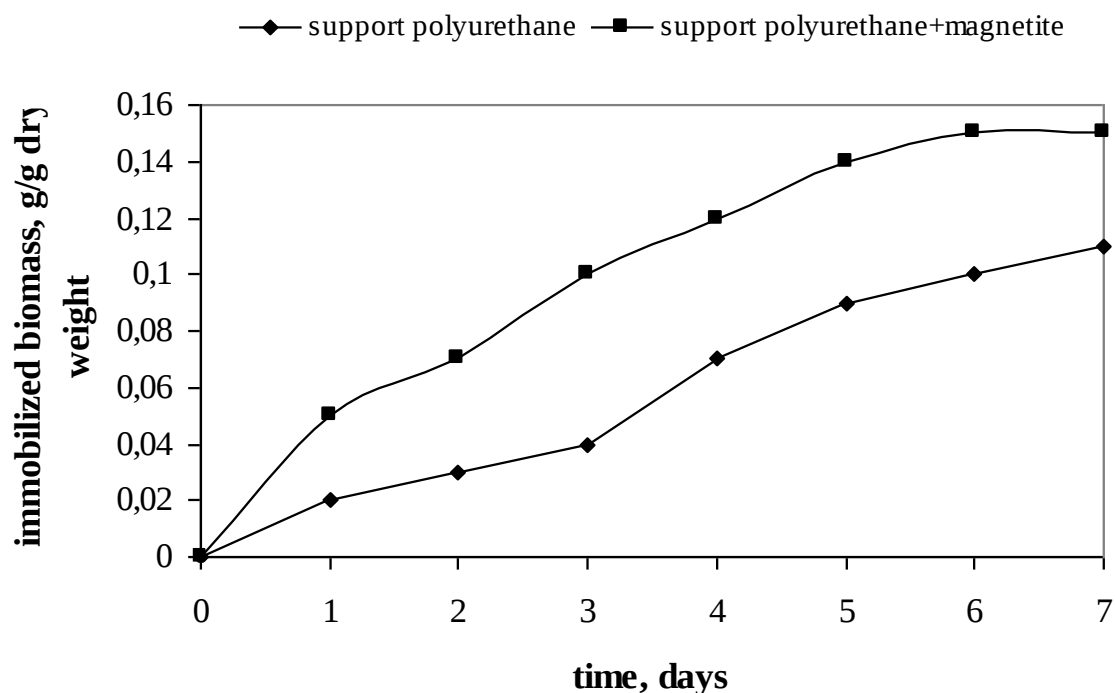
Съпоставянето на получените стойности за имобилизирана биомаса, върху носителите с отворени и затворени пори, при омрежване и адсорбция и култивиране са представени в таблица 13.

Таблица 13. Имобиализирана биомаса върху различни носители

Тип носител	Количество имобилизирана биомаса
Пенополиуретан	0,12g/g dry (сухо тегло)
Пенополиуретан+Fe ₃ O ₄	0,15g/g dry (сухо тегло)
Пенополиуретан затворени пори +магнитна фракция	0,04g/g dry (сухо тегло)

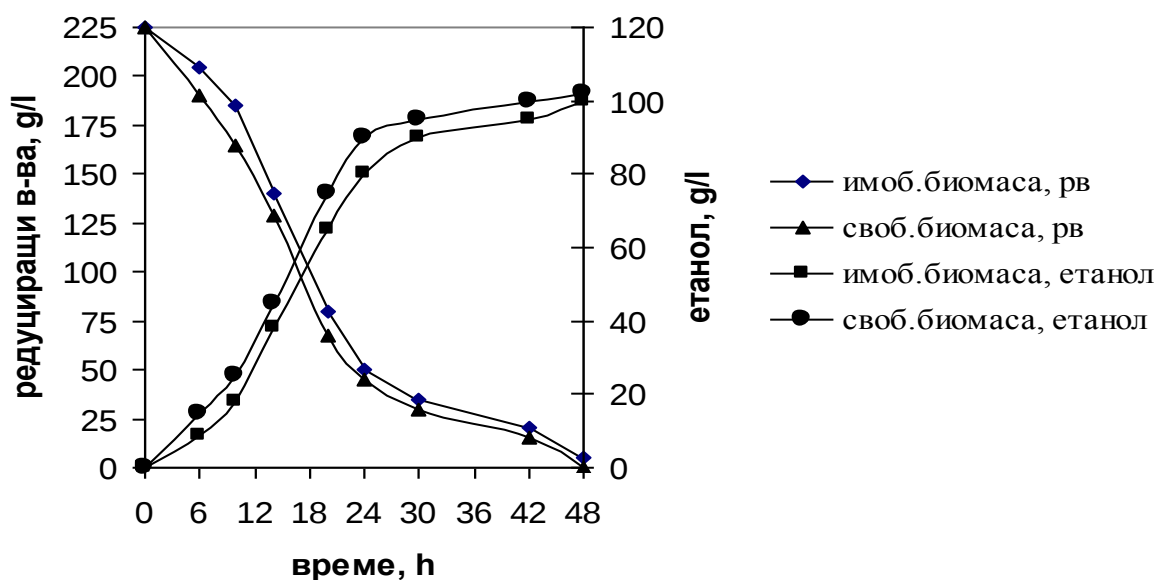
Носителите със структура с отворени пори дават възможност за имобилизиране на 3-4 пъти повече биомаса, като при отворени пори и микрочастиците от Fe₃O₄, които в случая са на повърхността на носителя, ускоряват процеса на първоначална адсорбция (фиг.21). Изследването на периодичен процес на ферментация на царевичен хидролизат

със свободна и имобилизирана биомаса е представено на фигура 22. Като при изследването количество имобилизирана биомаса е равно на свободната.



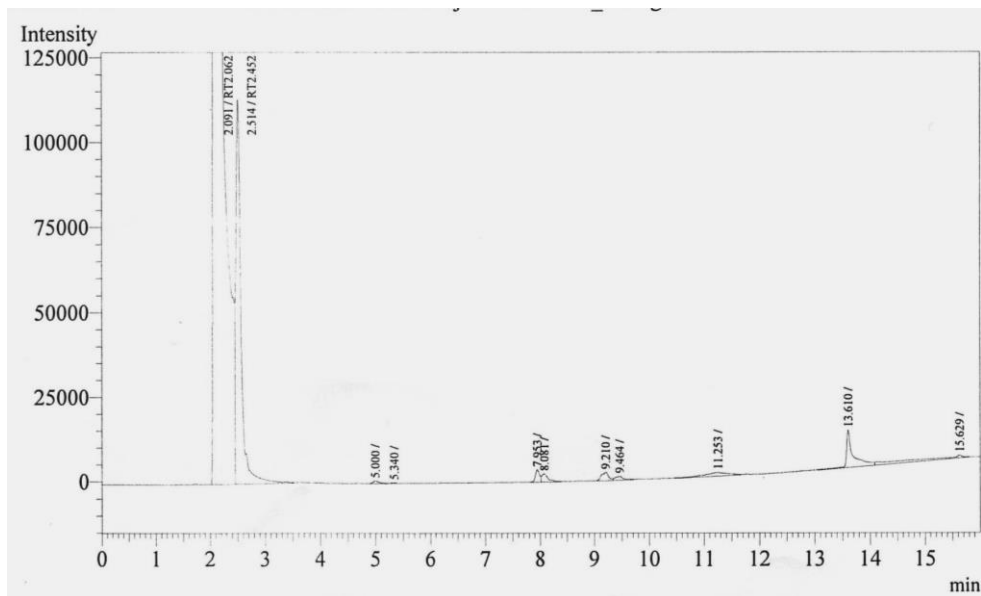
Фигура 21. Натрупване на биомаса върху носители от пенополиуретан с отворени пори

Достигнатите количества имобилизирана биомаса са съизмерими с тези, достигнати при други методи за имобилизиране [15] (100mg/ml), като се отчете, че относителната плътност на носителя е близка до единица.



фиг.22. Резултати от периодичен процес на алкохолна ферментация на царевичен хидролизат със свободна и имобилизирана биомаса

Превръщането на субстрата в етанол протича напълно за 48 часа (фигура 22). Прави впечатление забавянето на скоростта на реакцията в началния и крайния етап, което може да се дължи на инхибиране от високите концентрации на субстрата, или на етанола в крайния етап. Хранителната среда (царевичен хидролизат) има сравнително висок вискозитет и съдържание на суспендирани вещества, което допълнително забавя процеса



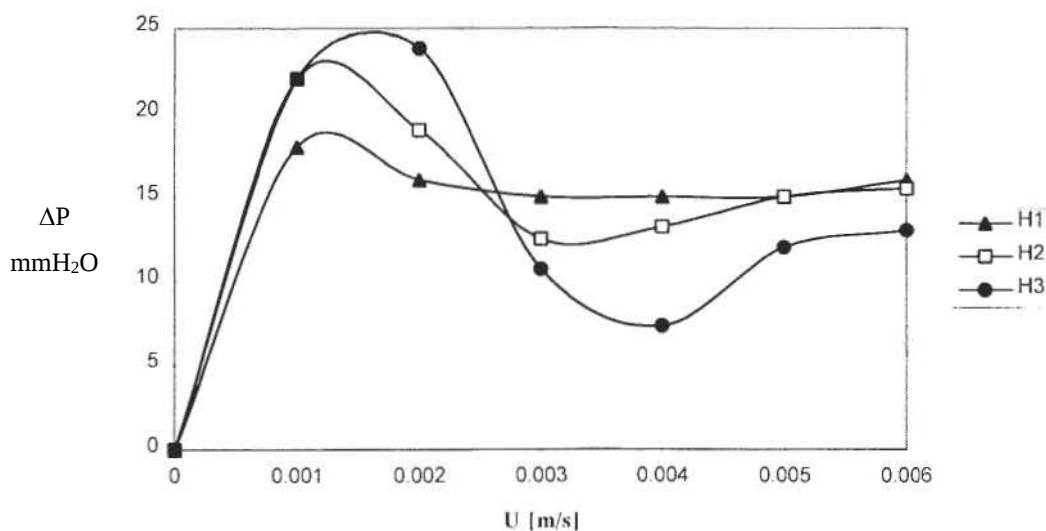
Фигура 23. Газхроматографско изследване на получения при ферментацията продукт

При газхроматографското изследване (фигура 23) се наблюдават няколко продукта с различно време на задържане, но с нисък интензитет, т.е. основното количество продукт е етанол. Резултатите за алкохолна ферментация на царевичен хидролизат със свободна и имобилизирана биомаса са представени на фиг.46.

3. ИЗСЛЕДВАНЕ НА БИОПРОЦЕСИ В БИОРЕАКТОРИ С МАС

- **Хидродинамични изследвания**

Резултатите от хидродинамичните изследвания на носители от пенополиуретан (фиг.24) показват, че стабилизираният слой се получава при дебити 1-4mm/sec, като тази сравнително ниска стойност се дължи на ниската плътност на частиците, сравнима с плътността на средата. Слой има сравнително малко съпротивление и падовете на налягане са малки.

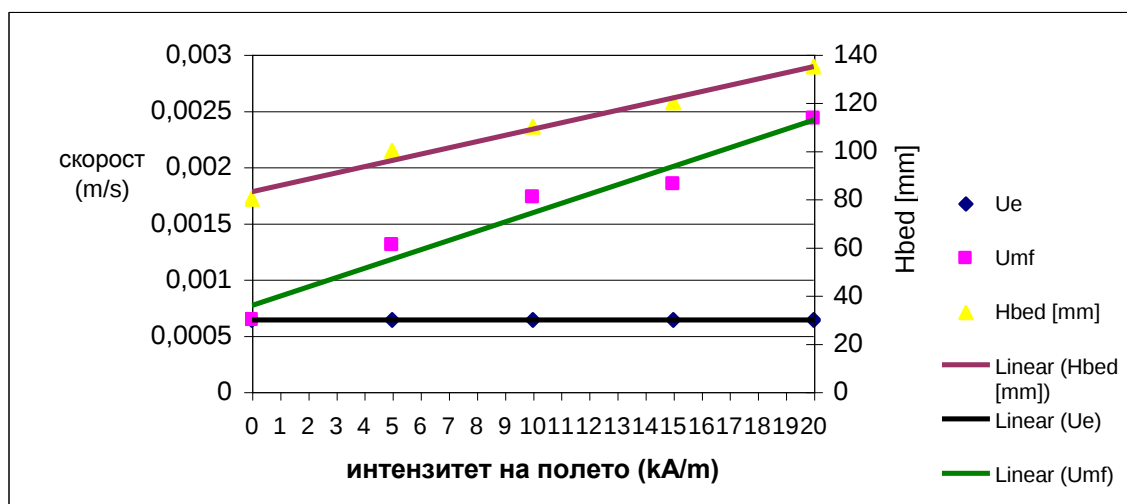


H1-без поле; H2-10кА/м; H3-20кА/м

Фиг.24. Пад на налягане в слоя при различни дебити и интензитети на полето

При увеличаване на интензитета на полето, започва да се наблюдава образуването на агрегати от частици. Поради размера, и формата на частиците този процес не е изразен толкова добре, но могат добре да се разграничат отделните режими на слоя [16].

На фиг. 25 са показани работните области на апарата при използване на магнитни частици от поли(акрилонитрил-съ-акриламид). Изследвани са два слоя с височина 8 и 10cm. И при двете височини на слоя, скоростта на минимална флуидизация U_{mf} , без поле, е около 1mm/s, като има възможност за разширяване на слоя, със 100%, до скорости 3mm/s. Получените резултати са близки, с тези за магнитни полиуретанови частици, вероятно поради близката стойност на плътността на различните видове частици.



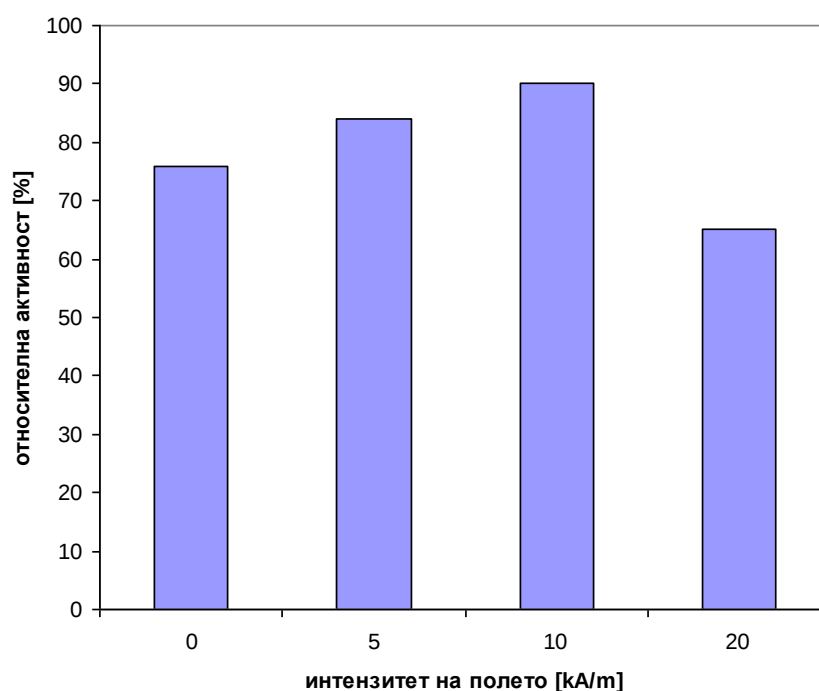
Фигура 25. Основни хидродинамични режими при полимерни носители при (Височина на слоя Hbed и скорост на минимална флуидизация Umf при слой 80mm)

Проведените хидродинамични изследвания със слой частици с размери 0,5mm, получени от съполимер акрилонитрил-акриламид и магнетит, показват сходни стойности

на скоростта на минимална флуидизация U_{mf} , с частиците от полиуретан-магнетит. При увеличаване на интензитета на полето, U_{mf} се променя в сравнително малък диапазон, от 1 до 2 mm/s. Това вероятно се дължи на сравнително ниското съдържание на магнитна фаза, в частиците. Началната височина на слоя, почти не влияе на скоростта на минимална флуидизация.

- **Ензимни процеси в колонен апарат**

Изследването на ензимна активност в зависимост от интензитета на полето е проведено в колона с общ обем 50ml. Резултатите от изследване на относителната активност на имобилизиран върху полимерен носител трипсин са представени на фигура 26. Наблюдава се линейно увеличение на активността до достигане на 90% относителна активност при интензитет на полето от 10 kA/m. Увеличаването на интензитета на полето до 20 kA/m води до намаляване до 65%. При този интензитет на полето се наблюдава подреждане на частиците по дължина на силовите линии и освобождаването на канали през апарата, на което най-вероятно се дължи влошения масообмен, и оттам по-ниската активност.



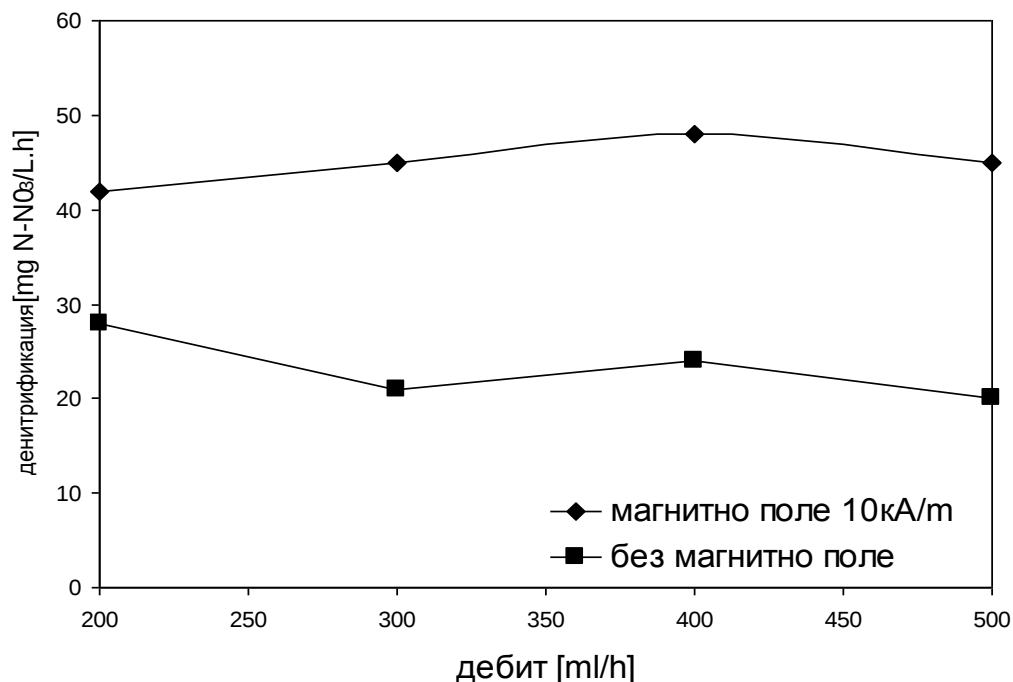
Фигура 26. Относителна ензимна активност на имобилизиран трипсин спрямо нискомолекулен субстрат в зависимост от интензитета на полето при скорост 1mm/s

При афинитетно пречистване на трипсинов инхибитор е установено, че при периодичен процес, дебит 1mm/s. и интензитет на полето 5 kA/m, могат да бъдат свързани 2,4 mg/g [1]. Този резултат показва, че при тези условия е активна цялата повърхност на частиците, което е от съществено значение при провеждане на процеса и неговото

мащабиране. Интерес представлява преценяването на възможностите за преработка на субстрати съдържащи примеси, както и изследването на непрекъснат процес.

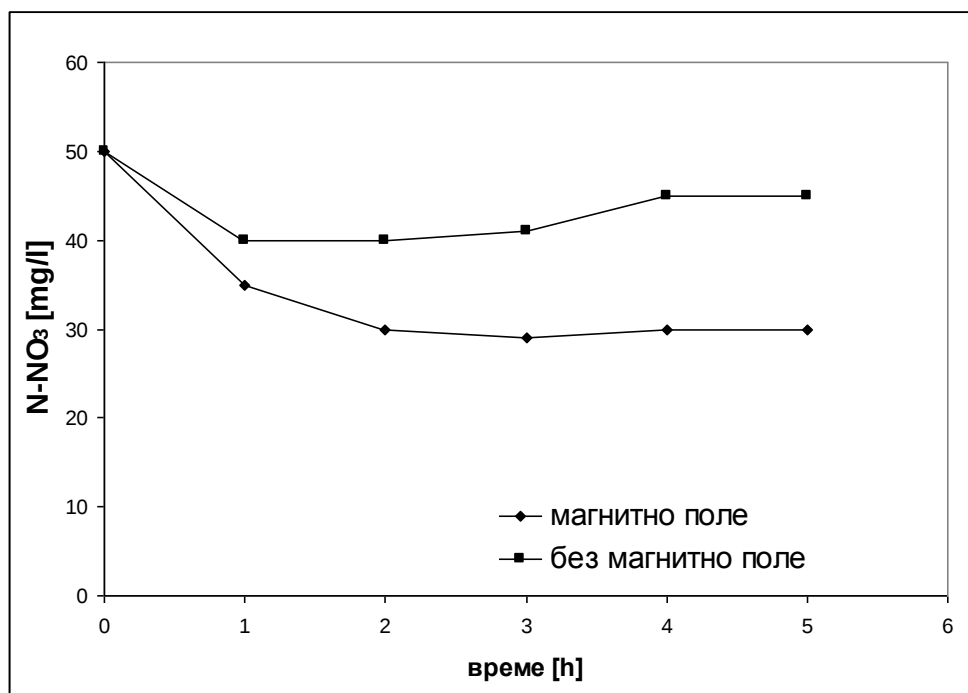
- **Денитрификация**

Изследването на непрекъснат процес на денитрификация, като производителност на денитрификацията при различни дебити без поле и с интензитет на полето е представено на фигура 27.



Фигура 27. Денитрификация при различни дебити без поле и с магнитно поле 10кА/м

На фигурата се отчита леко увеличение на производителността на процеса при наличие на магнитно поле, от 40 до 48mg/l.h, като без прилагането на поле се наблюдава намаляване на производителността, при увеличаване на дебита. Тези явления се дължат отчасти на подобряване на масообмена от една страна, но и на отделянето на биомаса при получаването на флуидизиран слой, при търкането и удрянето между частиците. Вероятното отделяне на биомаса и нестабилната работа на слоя се потвърждават и от изследването на работата на апарата във времето (фиг.28). При непрекъснатата работа на апарата се наблюдава стабилизиране на изходящата концентрация на нитрати на 30mg/l, като в случая магнитното поле степента на конверсия се запазва постоянна и по-висока от тази без поле.

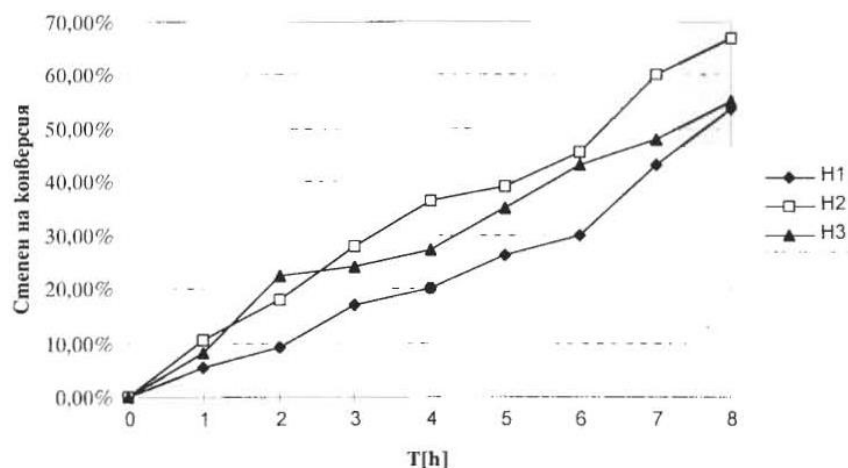


Фигура 28. Непрекъснат процес на денитрификация с имобилизирана биомаса от *Pseudomonas denitrificans*

При високи дебита на субстрата и периодичен процес може да се приеме модел на идеално смесване: $dS/dt = -V_{max} \cdot S / (K_m + S)$. При това определените стойности на наблюдаемите константи са близки до тези определени за свободна биомаса, като $K_m = 74 \text{ mg/l}$. В случая може да се предположи, че при тези условия влиянието на масообмена върху скоростта на реакцията е пренебрежимо малко.

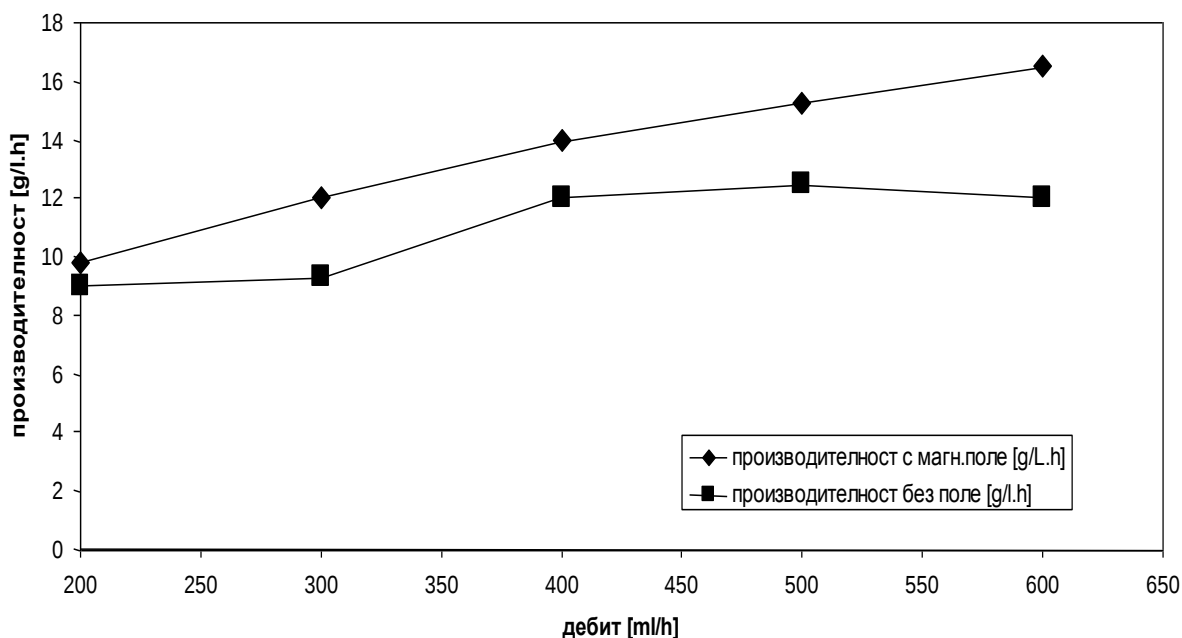
- **Получаване на етанол**

При провеждане на биопроцеси определящ за степента на конверсия е времепрестоят в апарата. Използваният носител позволява да се редуцира дебита и да се увеличи времепрестоя в апарата. Достига се до увеличаване на скоростта на конверсия и на получаване на етанол от 5,2 g/l.h (без поле, H1), до 7,1 g/l.h (H2=10 kA/m). При висок интензитет на полето (H3=20 kA/m), скоростта намалява до 4,8 g/l.h, което най-вероятно се дължи на агрегирането на частиците, и образуването на канали в слоя. (Фиг.29).



фиг.29. Степен на конверсия без поле H1, при H2=10кА/м и H3=20кА/м

Получените резултати при периодичен процес, показват сравнително ниски стойности на конверсия в началния етап на процеса, като това се дължи на сравнително малкото количество имобилизирана биомаса. Резултатите без поле и с магнитно поле 10кА/м са подобни, като при увеличаване интензитета на полето се наблюдава намаляване на степента на конверсия. Микроскопските наблюдения показват и висок процент мъртви клетки (20%), което се дължи на метода за имобилизиране и характера на носителя. Резултатите от непрекъснат процес са представени на фигура 30. Наблюдава се увеличаване на производителността от 10 g/l.h до 17 g/l.h при използване на магнитно поле.



Фиг. 30. Производителност по етанол без поле и при интензитет на полето 10кА/м

Постигането на магнитно стабилизиран слой дава възможност за подобряване на масообмена, намаляване на инхибиращия ефект на етанола, както и по-лесното отделяне на газовата фаза от CO_2 . Използването на високи скорости на потока, води до по-ниска степен на конверсия на субстрата, поради малкото време на контакт в слоя.

4. МОДЕЛ ОПИСВАЩ ВЛИЯНИЕТО НА ХИДРОДИНАМИЧНИТЕ УСЛОВИЯ ВЪРХУ МАСООБМЕНА

Резултатите за модел на масообмена при алкохолна ферментация със субстрат царевичен хидролизат са представени в таблици 14 и 15.

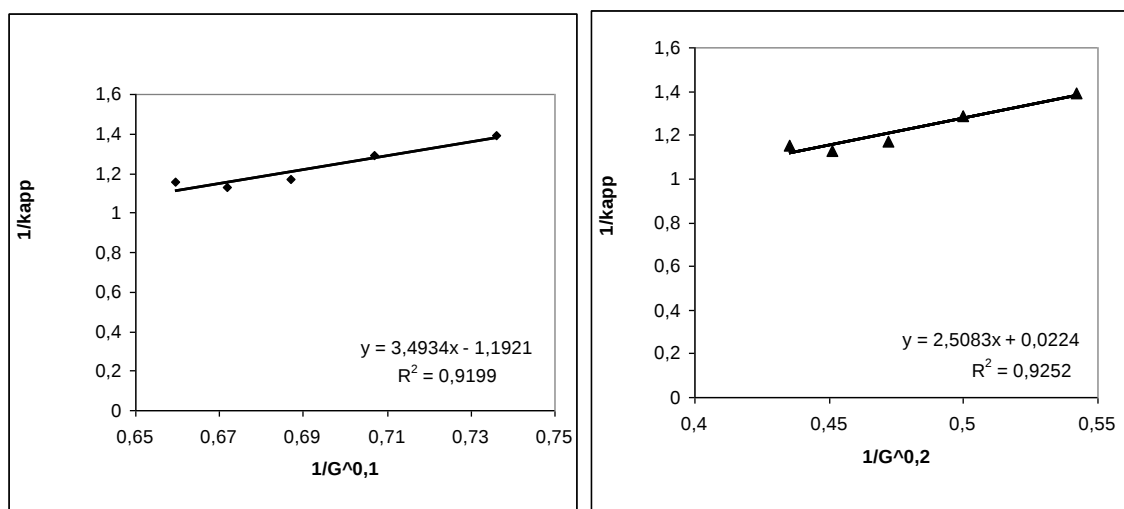
Таблица 14. Експериментални данни за зависимост на K_m и степента на конверсия от дебита

Q [cm ³ /h]	u [cm/h]	K_m [cm.h ⁻¹]	G [g/(cm ² .h)]	C [mg/cm ³]
200	20,37183	0,1484	21,39042	52
300	30,55775	0,1686	32,08564	70
400	40,74367	0,1996	42,78085	80
500	50,92958	0,2141	53,47606	89
600	61,1155	0,2055	64,17127	98

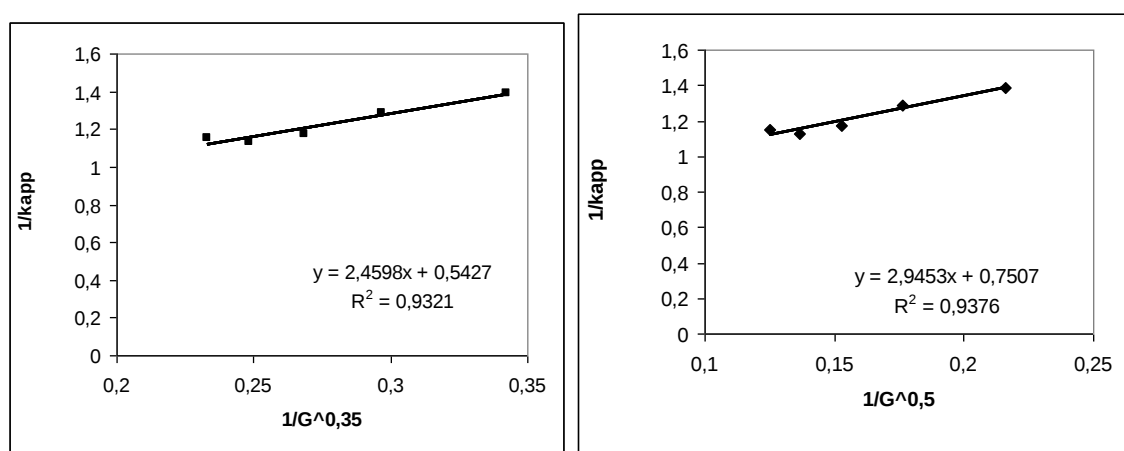
Таблица 15. Изчислени стойности от модела

$\ln(c/c_0)/t$ [h ⁻¹]	$1/k_{app}$ [h]	$1/G^{0,4}$ [(cm ² .h)/g]	$1/G^{0,35}$ [(cm ² .h)/g]	$1/G^{0,2}$ [(cm ² .h)/g]	$1/G^{0,1}$ [(cm ² .h)/g]	K_m [cm.h ⁻¹]
0,7193	1,3900	0,216217	0,342313	0,541946	0,73617	0,1484
0,7763	1,2881	0,176541	0,297024	0,499733	0,706918	0,1686
0,8537	1,1713	0,152889	0,268573	0,471792	0,686871	0,1996
0,8861	1,1284	0,136748	0,248396	0,451199	0,671713	0,2141
0,8671	1,1531	0,124833	0,23304	0,435043	0,659578	0,2055

Получените стойности за наблюдаемата скоростна константа Карп, показват увеличение от 0,71 до 0,86 h⁻¹. Константата на масообмен k_m също се увеличава от 0,14 до 0,20 cm.h⁻¹, при увеличаване на дебита от 200 до 600 ml/h. Правите, необходими за намиране на параметрите на модела K и n са представени на фигури 31-32. Получените стойности на константите са аналогични на получените в подобни изследвания [12]



Фигура 31. Прави в координати $1/K_{app} - 1/G^{0,1}$ и $1/K_{app} - 1/G^{0,2}$



Фигура 32. Прави в координати $1/K_{app} - 1/G^{0,35}$ и $1/K_{app} - 1/G^{0,5}$

От получените прави се вижда, че правата $1/K_{app} - 1/G^{0,1}$ е с отрицателен отрез, т.е. $n=0,1$ не може да се използва в модела за масообмен. Другите три прави са с положителен отрез, но само при $n=0,35$ изчислената по модела стойност на масообменната повърхност a_m е равна на експериментално определената ($7,9\text{cm}^2/\text{cm}^3$). Можем да приемем, че стойностите на $K = 1,625$ и $n = 0,35$. При тези стойности са определени стойностите на константата $A=0,00038$, k и константата на масообмен k_m .

Получените стойности на k_m , представени в координати $\ln(k_m) - \ln(G)$, съгласно модела трябва да лежат на права линия, с наклон $n = 0,34$ и $\ln(\text{наклона}) = A$. При използване на изчислените стойности на константите се получава зависимост от вида: $J_D = 1,625 \cdot \text{Re}^{-0,65}$. Подобна зависимост е използвана и от редица автори за описание на зависимост между хидродинамичните условия и масообмена при биопроцеси с имобилизирана биомаса и ензими [17]. Получения модел може да бъде използван при изчисляване и проектиране на апарати с магнитно асистиран слой и оценка на масообмена при различните режими на работа, като интерес би представлявала работата на апарата при по-високи интензитети на полето.

Направените изследвания върху получаването и охарактеризирането на съполимери на акрилонитрил, и формуването от тях на магнитни микрочастици са свързани с оптимизиране на условията и химичния състав за получаване на съполимери с определен състав, и определена молекулна маса. Тези свойства са важни, както за формуване на носители, така и за възможността за имобилизиране на ензими.

От съществено значение е плътността на носителите, и съдържанието на магнетит. Използването на по-малки частици има редица предимства с цел подобряване на масообмена, но същевременно изисква и наличието на повече магнетит в тях, за да бъдат задържани в слоя, това пък от своя страна води до по-голяма плътност на частиците, и увеличаване на скоростта на минимална флуидизация. При сравнение на количеството имобилизиран трипсин, върху различните полимери, се наблюдава по-голямо количество имобилизиран белтък, върху съполимера с малеинова киселина, вероятно поради наличието на повече достъпни функционални групи в активирания съполимер. Същевременно, при съполимерите на база акриламид, количеството имобилизиран белтък е по-малко, но се наблюдава по-висока ензимна активност, което показва известно предимство, както на метода за имобилизиране, така и на самия носител.

Получените резултати, за имобилизирани върху магнити носители от поли(акрилонитрил-съ-акриламид) трипсин и пероксидаза, както и стойностите на кинетичните параметри, дават възможност те да се използват за провеждането на биопроцеси в апарати с магнитно-стабилизиран слой.

Изследването на процес на денитрификация в непрекъснат режим показва устойчива работа на апарата при прилагане на магнитно поле, но вследствие на малкия обем на апарата, наблюдаваната промяна на производителността, при увеличение на дебита е ниска. Затруднено е и поддържането на стабилен слой, поради това, че плътността на частиците е близка с тази на средата, и магнитното съдържание е ниско. Установено е, че при перидичен процес и интензитет на полето 10 кА/т може да се приеме модел на идеално смесване, като константите са близки по стойност до тези за свободна биомаса.

При изследването на непрекъснат процес на алкохолна ферментация на хранителна среда царевичен хидролизат е постигната устойчива работа на апарата при поле 10 кА/т и повишение на производителността на апарата. Определени са и константите на масообмен при различни режими, като е показано, че в случая има подобрене на масообмените характеристики на апарата.

ИЗВОДИ

Въз основа на получените експериментални резултати при получаването и изследването на носители с магнитни свойства и приложението им в биореактори с магнитно асистиран слой могат да бъдат направени следните основни изводи:

1. Получените съполимери (PANAM и PANMA) са подходящи за формване на частици с магнитни свойства с размери от 100-2000 μm . В зависимост от условията се получават частици с размери 100-500 μm , а при по-висок дебит от 1,5ml/min, получените частици са с размери в диапазона 500-1000 μm .

2. При имобилизиране на трипсин върху носителите от поли (акрилонитрил-съ-акриламид) чрез хидразиден метод най-подходящата стойност за имобилизиране е pH=6,3. При това pH, върху частици съдържащи 20% магнетит се достига до най-висока относителна активност от 90% и до 14mg/g носител имобилизиран белтък. При имобилизиране на трипсин върху носители от поли(акрилонитрил-съ-малеинова к-на) най-подходящото pH за имобилизиране е 4, като се достигат стойности от 50mg/g носител и 19% относителна активност.

3. И двата типа носители показват ниска протеолитична активност спрямо високомолекулен субстрат, съответно 16% за PANAM, и 5% за PANMA. При свързване на трипсинов инхибитор частиците от PANAM достигат до 73% активен трипсин, докато в частиците от PANMA достигната стойност е много по-малка.

4. Константата K_m при имобилизиран трипсин се увеличава незначително до 0,67mM. При имобилизирана пероксидаза константата K_m намалява до 0,23.10⁻³M, същевременно се наблюдава и промяна на pH и температурния оптимум

5 При използване на пенополиуретан с отворени пори и съутаяване на железни соли се натрупват до 100% магнетит спрямо сухото тегло на носителя, което прави частиците управляеми в магнитно поле. Върху тези частици след култивиране в продължение на 30дни се натрупва биофилм от *P. denitrificans* в количество 91mg/g носител. Чрез адсорбция и култивиране върху същите частици се натрупва биомаса от *S.cerevisiae* до 0,15g/g носител. Включването на магнетит в частиците води до повишаване на имобилизираното количество биомаса.

6. При денитрификация в биореактор с MAC при увеличаване на дебита се наблюдава слабо увеличение на производителността от 40 до 48mg/l.h. При изследване на алкохолна ферментация се наблюдава увеличаване на производителността от 10g/L.h до 17g/L.h. Повишаването на дебита на подавания субстрат от 200 до 600ml/h води до увеличаване на k_m от 0,148cm/h до 0,2cm/h. Използваният модел $J_D = 1,625.Re^{-0,65}$ за РИИ адекватно описва влиянието на хидродинамичните условия върху масообмена.

НАУЧНИ ПРИНОСИ

Въз основа на направените изследвания на носители с магнитни свойства с имобилизирани биоагенти и изследването на техните свойства при моделни процеси, както и на процеси в реакторите с МАС са постигнати следните научни приноси:

- Получени, чрез оптимизиране на условията и изследвани са два съполимера на акрилнитрила с акриламид и малеинов анхидрид. Получените полимери са доказани като съдържание на функционални групи, чрез техните ИЧ спектри.
- На база пенополиуретан с отворени и затворени пори, и синтезираните полимери са получени магнитни носители по два метода, включване на магнитната фаза в обема и покритие на частицата.
- Получените носители са охарактеризирани по отношение на техните основни физични и механични свойства (външен вид, еднородност, размери, плътност, свободен обем). Установено е, че плътността на носителите е в диапазона $1050\text{--}1100\text{kg/m}^3$, свободния обем на единица обем е в диапазона 0,8-0,9, като размерите им са 0,5-0,7mm до 3mm
- Върху получените синтетични носители ковалентно е имобилизиран ензима трипсин, а върху носителите на основа пенополиуретан чрез адсорбция и култивиране за получаване на биофилм са имобилизирани *P. denitrificans* и *S.cerevisiae*, като получените стойности са: 15mg/g имобилизиран трипсин; 91mg/g биомаса от *P. denitrificans* и 150mg/g *S.cerevisiae*
- Получените носители са охарактеризирани, като ензимна активност, способност за денитрификация и алкохолна ферментация
- Установени са границите на хидродинамичните режими, като скоростта на минимална флуидизация е съответно 0,5 и 1mm/s, а полето, което ги задържа е съответно 10 и 5kA/m. Изследвани са процеси на ензимна активност, денитрификация и алкохолна ферментация, като е установено влиянието на интензитета на полето и различните режими на работа. При денитрификация е установена възможността да се използва модел на ис, при периодичен процес и високи дебители, а при алкохолна ферментация в непрекъснат процес е установено повишаване на производителността на апарата
- Разработен е математически модел, описващ влиянието на хидродинамичните условия върху константата на масообмен в процес на алкохолна ферментация на царевичен хидролизат, като получената зависимост може да бъде използвана при мащабиране на процеса.

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. T. Ivanov, V. Ivanova, M. Kamburov (2009), Magnetic Poly-(acrylonitrile-co-acrylamide) Microparticles for Immobilization of Trypsin, *International Review of Chemical Engineering (Rapid Communications)*, Vol. 1. n. 4, pp. 308-315
2. Hartree E. (1972), Determination of protein: A modification of Lowry method that gives linear photometric response, *Anal.Biochem.*, 48, 422-427
3. Geiger, R., Fritz, H. (1984), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Wieheim, Germany, 3rd ed., vol.5, pp.119-128
4. Zaborsky O., R. Ogletree (1974), Immobilization of Enzymes on Porous Silica Supports, *Biochem Biophys Res. Commun.*, 61, 210-216
5. Yotova L., Ivanov T., Mironova V. (2008), Chuchuranova V., Investigation of the Properties of Immobilized Horseradish Peroxidase on Magnetic Particles, *Bioautomation*, Suppl.65-72
6. T.V. Ivanov, I.G. Lalov, L. Yotova (2015), Denitrification of wastewater with immobilized cells of *Pseudomonas denitrificans*, *Bulg. Chem. Commun.*, 2015, volume 47, 64-69
7. Parvanova-Mancheva T., Beschkov V. (2009), Microbial denitrification by immobilized bacteria *Pseudomonas denitrificans* stimulated by constant electric field, *Biochem. Eng. J.*, 44, 208-213
8. <http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/137085.pdf>
9. Pospiskova. K, Prochaskova G., Safaric I. (2013), One-step magnetic modification of yeast cells by microwave-synthesized iron oxide microparticles, *Letters in Applied microbiology*, V 56, Issue 6, 456-461
10. Anwar Z. et al (2012), Bioethanol productions from rice polish by optimization of dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis, *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(4), pp. 992-998
11. <http://www.outreach.canterbury.ac.nz/chemistry/documents/ethanol.pdf>
12. Nath S. and Chand S. (1996), Mass Transfer and Biochemical Reaction in Immobilized Cell Packed Bed Reactors, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 66, 286-292
13. <http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=13132>
14. Andersson S. (2008), Assessment of carrier materials for biofilm formation And denitrification, *VATTEN* 64: 201-207. Lund
15. Ivanova V , Petrova P., Hristov J. (2011), Application in the Ethanol Fermentation of Immobilized Yeast Cells in Matrix of Alginate/Magnetic nanoparticles, on Chitosan-Magnetite Microparticles and Cellulose-coated Magnetic nanoparticles, *International Review of Chemical Engineering*, Vol. 3., 2, March 2011, *Int. Rev. Chem. Eng.*, 3
16. T.V.Ivanov, J.Y.Hristov, S.Petkova, MAGNETIZABLE BIOSUPPORTS FOR MAGNETICALLY CONTROLLED FLUIDIZED BED BIOREACTORS, 1st South-East European Symposium on FLUIDIZED BEDS IN ENERGY PRODUCTION, CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING AND ECOLOGY, 24-27.09.1997, Ohrid, Rep.of Macedonia
17. T. Murugesan and R. Y. Sheeja (2005), A Correlation for the Mass Transfer Coefficients during the Biodegradation of Phenolic Effluents in a Packed Bed Reactor, *Separation and Purification Technology*, Vol. 42, No. 2, 103-110

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. T.V.Ivanov, J.Y.Hristov, S.Petkova, MAGNETIZABLE BIOSUPPORTS FOR MAGNETICALLY CONTROLLED FLUIDIZED BED BIOREACTORS, 1st South-East European Symposium on FLUIDIZED BEDS IN ENERGY PRODUCTION, CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING AND ECOLOGY, 24-27.09.1997, Ohrid, Rep. of Macedonia
2. Yotova L., Ivanov T., Mironova V., Chuchuranova V., Investigation of the properties of Immobilized Horseradish Peroxidase on Magnetic Particles, Bioautomation, 2008, 11, Suppl., 65-72
3. T. Ivanov, V. Ivanova, M. Kamburov (2009), Magnetic Poly-(acrylonitrile-co-acrylamide) Microparticles for Immobilization of Trypsin, International Review of Chemical Engineering (Rapid Communications), Vol. 1. n. 4, pp. 308-315
4. T.V. Ivanov, I.G. Lalov, L. Yotova, Denitrification of wastewater with immobilized cells of *Pseudomonas denitrificans*, Bulg. Chem. Commun., 2015, volume 47, 64-69, (IF 0,349)