

Jędrzej WICZKOWSKI, Maciej PILAREK, Anna ZAMOJSKA-JAROSZEWICZ, Krzysztof W. SZEWCZYK

e-mail: pilarek@ichip.pw.edu.pl

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Hodowla mikroalg w fotobioreaktorze typu *air-lift driven*

Wstęp

Hodowla mikroalg i otrzymywanie z nich preparatów (granulaty, ekstrakty, oczyszczone związki chemiczne) są istotnymi gałęziami współczesnej biotechnologii. Różnorodne tradycyjne aplikacje hodowli mikroalg dotyczą produkcji biomasy jako dodatku żywieniowego dla ludzi oraz zwierząt hodowlanych a także jako odnawialnego źródła związków chemicznych o wysokiej wartości handlowej, takich jak barwniki spożywcze, znakowane izotopowo węglowodany, aminokwasy i lipidy [Spolaore i in., 2006; Becker, 2007]. Obecnie coraz więcej uwagi poświęca się badaniom, których celem jest wykorzystywanie gatunków mikroalg charakteryzujących się wysoką zawartością frakcji tłuszczowej o potencjalnej przydatności w produkcji biopaliw typu *biodiesel* z alternatywnych źródeł bioodnawialnych [Chisti, 2007; Li i in., 2008].

Tradycyjnie, hodowle komórek mikroalg o metabolizmie fotoautotroficznym prowadzone są w otwartych systemach zbiorników naturalnych lub sztucznych. Jednakże układy te wykazują wiele oczywistych cech ograniczających ich zastosowania. Brak możliwości kontrolowania parametrów hodowli oraz utrzymania warunków pozwalających na hodowlę monokultury wymaga stosowania szczepów o zwiększonej odporności na warunki środowiska hodowlanego oraz zakażenia innymi mikroorganizmami [Becker, 2007; Li i in., 2008]. Obecnie specjalistyczne przemysłowe aplikacje coraz częściej wymuszają potrzebę projektowania i stosowania zamkniętych układów hodowlanych, czyli fotobioreaktorów. Urządzenia tego typu pozwalają zapewnić pełną kontrolę nad warunkami prowadzenia procesu hodowli, jednakże konstrukcja bioreaktorów używanych do hodowli alg różni się od urządzeń wykorzystywanych do hodowli innych typów mikroorganizmów. Mikroalgi, jako organizmy fototroficzne wykorzystują światło, słoneczne lub sztuczne, jako główne źródło energii. Z tego powodu podczas projektowania fotobioreaktorów szczególną uwagę poświęca się problematyce dostarczania oraz dystrybucji światła wewnątrz całej objętości zbiornika hodowlanego [Carvalho i in., 2006]. Z oczywistych powodów klasyczne aspekty projektowania bioreaktorów uwzględniające takie zagadnienia procesowe jak mieszanie medium hodowlanego oraz jego napowietrzanie, kontrola temperatury oraz odczynu *pH* także muszą zostać uwzględnione.

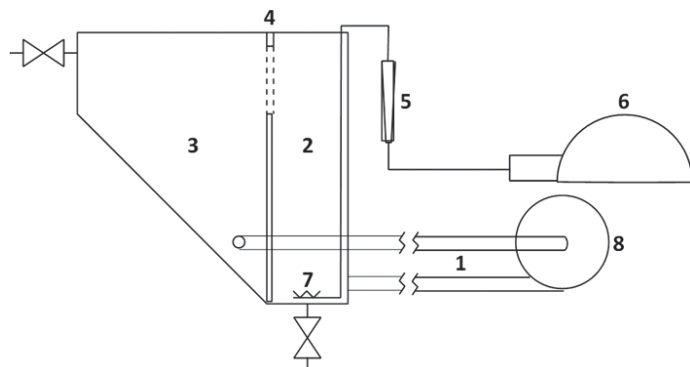
Spośród proponowanych w literaturze rozwiązań aparaturowych z zakresu fotobioreaktorów do propagacji biomasy mikroalg coraz większym zainteresowaniem cieszą się konstrukcje hybrydowe zwane fotobioreaktorami typu ALD (*Air-Lift Driven*) [Carvalho i in., 2006; Posten, 2009]. Układy tego typu pozwalają na cyrkulację komórek pomiędzy naświetlanymi i ciemnymi strefami naczynia hodowlanego a przy tym nie posiadają ruchomych elementów. Ponadto aparaty typu ALD nie wymagają stosowania zewnętrznych modułów wymiany gazowej w celu usunięcia tlenu powstającego w wyniku fotosyntetycznych przemian komórek mikroalg. W najprostszej konfiguracji, hybrydowy fotobioreaktor typu ALD składa się z kolektora słonecznego, który stanowi zestaw przezroczystych rur połączonych w pętlę, oraz połączonego z nim modułu *air-lift*. W kolektorze na skutek intensywnego naświetlania komórek zachodzi proces fotosyntezy natomiast moduł *air-lift* odpowiada za wymuszenie przepływu medium hodowlanego przez pętlę kolektora oraz usuwanie z hodowli tlenu, który hamuje przemiany fotosyntetyczne [Carvalho i in., 2006; Posten, 2009].

Celem badań była ocena przydatności fotobioreaktora typu ALD do hodowli mikroalg w warunkach temperaturowych i nasłonecznienia okresu letniego w środkowej Polsce oraz ilościowa charakterystyka

hodowli komórek *Scenedesmus obliquus* w fotobioreaktorze o hybrydowej konstrukcji typu ALD.

Materiały i metody

Fotobioreaktor wykorzystywany w badaniach fotobioreaktor typu ALD charakteryzował się objętością roboczą 5,6 dm³, na którą składała się: objętość kolektora słonecznego (0,86 dm³) oraz objętość modułu *air-lift* (4,74 dm³). Pętlę kolektora stanowiła pleksiglasowa rura o średnicy zewnętrznej 20 mm, średnicy wewnętrznej 18 mm i długości 3 m. Moduł *air-lift* wykonano z pleksiglasowych płyt o grubości 10 mm a w jego wnętrzu umieszczono płaską przegrodę oddzielającą strefę napowietrzania (wznoszenia), do której od dołu dostarczano przy użyciu bełkotki sprężone powietrze, od strefy opadania, stanowiącej większość objętości modułu. W celu ograniczenia parowania wody z medium hodowlanego część płytowa przykryta była pokrywą z otworami do poboru prób oraz pomiaru temperatury i odczynu *pH* medium hodowlanego. Wykorzystane zostały dwa warianty aparaturowe bazujące na hybrydowej konstrukcji, które schematycznie zostały przedstawione na rys. 1. W pierwszej serii doświadczałnej przepływ medium hodowlanego przez pętlę kolektora słonecznego był wymuszany jedynie dzięki wstępującemu ruchowi pęcherzy powietrza dostarczanego do modułu *air-lift*. W drugiej serii doświadczałnej przepływ medium hodowlanego przez kolektor był wspomagany pompą perystaltyczną.



Rys. 1. Schemat konstrukcji badanego fotobioreaktora typu *air-lift driven*: pętla kolektora słonecznego – 1, strefa wznoszenia – 2, strefa opadania – 3, przegroda – 4, rotametr – 5, sprężarka tłokowa – 6, bełkotka – 7; w zmodyfikowanym wariantcie instalacji ze wspomaganiem przepływu medium hodowlanego w połowie długości pętli kolektora dołączona była pompa perystaltyczna – 8, która nie występowała w wariantcie klasycznym

Materiał biologiczny. Komórki mikroalg gatunku *Scenedesmus obliquus* pochodziły z banku komórek Zakładu Biologii Wydziału Inżynierii Środowiska Politechniki Warszawskiej. Rodzaj *Scenedesmus* to jednokomórkowe glony systematycznie zaliczane do glonów zielonych z gromady zielenic właściwych (*Chlorophyceae*). Mikroalgi *Scenedesmus* sp. występują w zbiornikach wód słodkich w wielu częściach świata o różnych strefach klimatycznych. Komórki *S. obliquus* są owalne, wrzecionowate lub w kształcie półksiężyca, o długości od 5 do 30 μm. W hodowli komórki mogą występować pojedynczo, lecz znacznie częściej tworzą cenobia zbudowane z parzystej liczby (od dwóch do trzydziestu dwóch) komórek (najczęściej cztero- lub ośmiokomórkowe) [Mandal i Mallick, 2011].

Metodyka doświadczeń. Podczas wszystkich hodowli komórki *S. obliquus* podlegały promieniowaniu słonecznemu występującemu w śred-

kowej Polsce, w okresie od czerwca do października. W celu zapewnienia maksymalnego nasłonecznienia, kolektor słoneczny został ustawiony w osi E-W, a moduł *air-lift* został ustawiony ścianą o największej powierzchni w kierunku południowym. Dzięki temu układ badawczy pozostawał pod bezpośrednim nasłonecznieniem przez około 10 h dziennie. Pożywkę ($pH\ 7,7$) stanowił roztwór soli mineralnych ($4\text{ mM K}_2\text{HPO}_4$, $4\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $8\text{ mM NH}_4\text{Cl}$, 1 mM MgSO_4) w wodzie redestylowanej [de Moraes i Costa, 2007]. Zadana wartość natężenia przepływu powietrza dostarczanego do części wznoszącej modułu *air-lift* wynosiła od $0,3$ do $0,4\text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$. Temperatura inkubacji układu badawczego zmieniała się w zakresie $23\div 35^\circ\text{C}$, co było związane z niejednorodnością warunków pogodowych (temperatury zewnętrznej, natężenia promieniowania słonecznego).

Metody analityczne. Ze strefy opadania fotobioreaktora pobierano próby medium hodowlanego o jednostkowej objętości $5\cdot 10^{-3}\text{ dm}^3$. Stężenie biomasy *S. obliquus* oznaczano turbidymetrycznie (spektrofotometr Spectronic 601; Milton Roy, USA) na podstawie krzywej wzorcowej ($\lambda_{\text{max}} = 670\text{ nm}$) zależności absorbancji (A) od stężenia komórek mikroalg (C_X) o równaniu:

$$C_X = \frac{A}{0,131} [\text{g}] \quad (R^2 = 0,997) \quad (1)$$

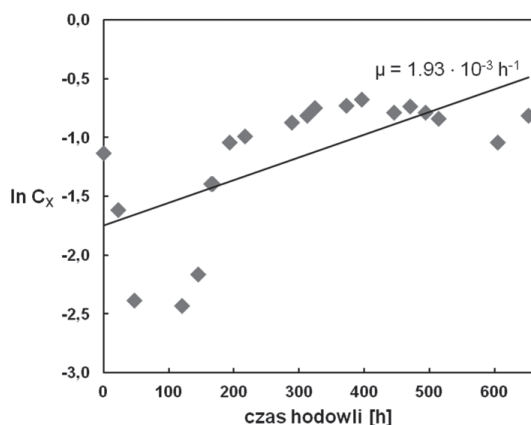
Odczytu wartości absorbancji pobranych prób dokonywano wobec wody destylowanej jako tła. Dla stężeń biomasy przekraczających $2\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ referencyjnie dokonywano dodatkowych wagowych pomiarów suchej biomasy. Oznaczone wartości stężenia biomasy komórek *S. obliquus* wykorzystano do numerycznego wyznaczenia wartości właściwej szybkości wzrostu (μ) poprzez regresję liniową funkcji:

$$\ln C_X = \mu t - \ln C_{X0} \quad (2)$$

Natężenie oświetlenia mierzono luksometrem LUX-DT-8809A (SEMI Ltd.; Chiny) o częstotliwości próbkowania 57 s.

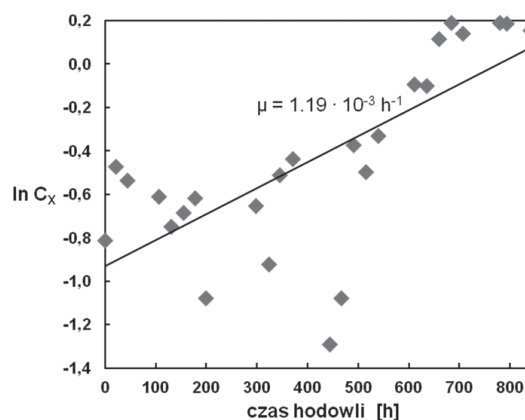
Wyniki badań

Podczas hodowli *S. obliquus* przeprowadzonej w klasycznym układzie ALD natężenie przepływu powietrza dostarczanego do części wznoszącej modułu *air-lift* wynosiło $F_p = 0,4\text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$. Proces prowadzono przez 27 dni, a jego wyniki przedstawiono na rys. 2. Zaobserwowany początkowy spadek stężenia biomasy był efektem adaptacji komórek mikroalg do warunków hodowli i mógł być związany ze zjawiskiem fotoinhibicji stanowiących inokulum komórek będących początkowo w stanie anabiozy. Maksymalna zaobserwowana wartość stężenia biomasy w medium hodowlanym wynosiła $C_{X\text{max}} = 0,5\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Wyznaczona wartość średniej właściwej szybkości wzrostu komórek w trakcie hodowli w klasycznym fotobioreaktorze *air-lift driven* wyniosła $\mu = 1,93\cdot 10^{-3}\text{ h}^{-1}$. W trakcie hodowli obserwowano powolny spadek odczynu pH medium hodowlanego, co wynikało ze zużywania składników pożywki przez komórki i powodowanych tym zmian równowagi kwasowo-zasadowej pomiędzy elementami medium hodowlanego.



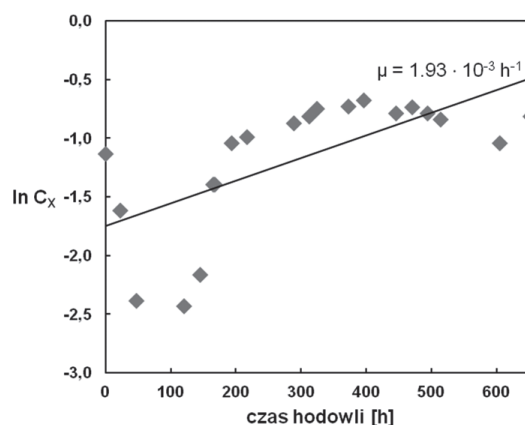
Rys. 2. Zależność logarytmu stężenia biomasy (C_X) w funkcji czasu trwania hodowli komórek *S. obliquus* prowadzonej w klasycznym układzie *air-lift driven*

W celu poprawy warunków hodowli i intensyfikacji mieszania medium hodowlanego kolejną hodowlę komórek *S. obliquus* przeprowadzono w zmodyfikowanym układzie ALD. Modyfikacja polegała na zastosowaniu pompy perystaltycznej, którą umieszczono w połowie długości pętli kolektora słonecznego. Pozwoliło to uzyskać przepływ medium hodowlanego przez kolektor rzędu $F_{mh} = 63\text{ dm}^3\cdot\text{h}^{-1}$. Jednocześnie utrzymywano wartość przepływu powietrza dostarczanego do modułu *air-lift* ($F_p = 0,4\text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$). Proces prowadzono przez 35 dni a jego wyniki przedstawione zostały na rys. 3. W przeciwieństwie do hodowli mieszanej pneumatycznie (klasyczny układ ALD) nie zaobserwowano początkowego spadku stężenia biomasy charakterystycznego dla fazy adaptacji, co wynikało z zastosowania jako inokulum komórek z hodowli w układzie klasycznym, a więc w pełni funkcjonalnych metabolicznie. Maksymalne oznaczone stężenie biomasy w medium hodowlanym wynosiło $C_{X\text{max}} = 1,2\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ natomiast średnia właściwa szybkość wzrostu komórek *S. obliquus* w trakcie hodowli w zmodyfikowanym układzie osiągnęła wartość $\mu = 1,19\cdot 10^{-3}\text{ h}^{-1}$. Analogicznie do hodowli w układzie klasycznym obserwowano powolny spadek odczynu pH medium hodowlanego będący skutkiem zużywania składników pożywki przez komórki mikroalg.



Rys. 3. Zależność logarytmu stężenia biomasy (C_X) w funkcji czasu trwania hodowli komórek *S. obliquus* prowadzonej w układzie z wspomaganym mechanicznie przepływem medium hodowlanego ($F_p = 0,4\text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$)

W celu sprawdzenia potencjalnie niszczącego działania warunków intensywnego napowietrzania w module *air-lift* na komórki hodowanego gatunku mikroalg, kolejną modyfikację układu badawczego polegała na zmniejszeniu natężenia przepływu powietrza przez strefę wznoszenia modułu *air-lift* do poziomu $F_p = 0,3\text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$. Wyniki 52-dniowej hodowli komórek *S. obliquus* przeprowadzonej w zmodyfikowanym układzie *air-lift driven* ze wspomaganym mechanicznie przepływem medium hodowlanego, przy zmniejszonym przepływie powietrza przedstawione zostały na rys. 4. Dla tego układu, maksymalne odnotowane stężenie



Rys. 4. Zależność logarytmu stężenia biomasy (C_X) w funkcji czasu trwania hodowli komórek *S. obliquus* prowadzonej w układzie z wspomaganym mechanicznie przepływem medium hodowlanego ($F_p = 0,4\text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$)

biomasy wyniosło $C_{Xmax} = 4,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, natomiast średnia właściwa szybkość wzrostu komórek *S. obliquus* osiągnęła wartość $\mu = 1,52 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Dyskusja wyników

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że zastosowana modyfikacja fotobioreaktora typu ALD polegająca na mechanicznym wspomaganie przepływu medium hodowlanego przez pętlę kolektora słonecznego nie wpłynęła znacząco na wartość właściwej szybkości wzrostu hodowanych komórek mikroalg. Także zmniejszenie natężenia przepływu gazu przez moduł *air-lift* nie spowodowało zwiększenia μ , jednak w hodowli o zredukowanym przepływie gazu uzyskano stałą, regularny przyrost biomasy, w przeciwieństwie do skokowych zmian stężenia komórek obserwowanych w hodowlach charakteryzujących się wyższym przepływem powietrza przez moduł *air-lift*. W tab. 1 porównano wartości wyznaczonych parametrów hodowli z danymi literaturowymi dotyczącymi fotobioreaktorowych hodowli komórek mikroalg.

Tab. 1. Porównanie wyników hodowli okresowych komórek mikroalg przeprowadzonych w różnych fotobioreaktorach obejmujące dane literaturowe: CPBR – fotobioreaktor cylindryczny [de Moraes i Costa, 2007; Ho i in., 2010], TPBR – fotobioreaktor rurowy [Hullat i Thomas, 2010]; oraz dane doświadczalne: ALD – fotobioreaktor typu *air-lift driven*

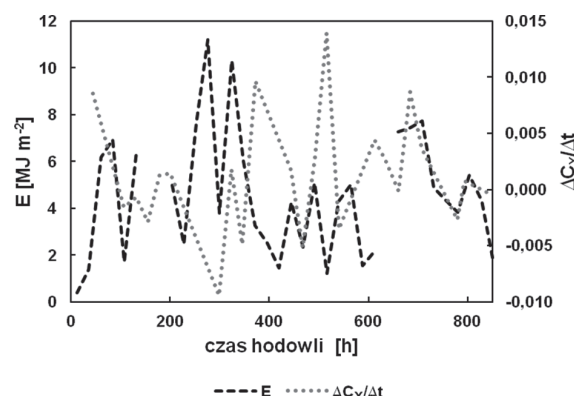
Fotobioreaktor	$\mu \text{ [h}^{-1}\text{]}$	$C_{Xmax} \text{ [g} \cdot \text{dm}^{-3}\text{]}$	Czas hodowli [h]
CPBR	$1,50 \cdot 10^{-1}$	0,72	504
CPBR (+ 10% CO ₂)	$3,22 \cdot 10^{-2}$	1,30	295
TPBR	brak danych	2,45	480
ALD (0,4 m ³ ·h ⁻¹)	$1,93 \cdot 10^{-3}$	0,50	652
ALD (0,4 m ³ ·h ⁻¹) + pompa	$1,19 \cdot 10^{-3}$	1,20	841
ALD (0,3 m ³ ·h ⁻¹) + pompa	$1,52 \cdot 10^{-3}$	4,40	1 259

Odnótowane w zbadanych układach typu ALD wartości μ są niższe niż opublikowane wcześniej dane dotyczące hodowli w fotobioreaktorach płytowych. Może to wskazywać na niszczące oddziaływanie mieszania pneumatycznego na cenobia *S. obliquus*. Zaobserwowana wysoka wartość stężenia biomasy ($C_X = 4,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) osiągnięta podczas hodowli komórek mikroalg w układzie z ograniczonym napowietrzaniem pozwala założyć, że po ustaleniu optymalnych wartości przepływu gazu można oczekiwać znacznej poprawy wydajności biomasy osiąganej w układzie ALD. Wydaje się, że korzystniejsze warunki wzrostu mikroalg są także możliwe do osiągnięcia przez zmianę geometrii fotobioreaktora. Zmniejszenie objętości modułu *air-lift* zwiększyłoby szybkość przepływu medium hodowlanego w pętli kolektora słonecznego przy jednoczesnym niższym natężeniu przepływu powietrza przez strefę wznoszenia.

Intensywne napowietrzanie powodowało także osadzanie się kropeł medium hodowlanego na ścianach fotobioreaktora powyżej poziomu cieczy. Skutkowało to zmniejszaniem ogólnej liczby komórek mikroalg w objętości medium hodowlanego i jednocześnie ograniczało ilość światła przedostającego się przez ścianę modułu *air-lift* fotobioreaktora. Osadzanie się aglomeratów komórek *S. obliquus* obserwowano także wewnątrz całego układu fotobioreaktora, szczególnie w miejscach o skomplikowanej geometrii, takich jak króćce łączące moduł *air-lift* z pętlą kolektora czy zawory łączące pętlę kolektora słonecznego z elastycznym przewodem pompy perystaltycznej. W hodowli ze zredukowanym przepływem powietrza zaobserwowano także zarastanie ścian strefy opadania modułu *air-lift*.

Na rys. 5 przedstawiono przykładowy wykres zależności zmiany energii promieniowania fotosyntetycznie aktywnego oraz zmiany stężenia biomasy w czasie hodowli. Analogiczne zależności obserwowano we wszystkich zbadanych układach. Wynika z nich, że lepsze nasłonecznienie fotobioreaktora wywoływało wyższe przyrosty biomasy komórek mikroalg. Pomiarów stężenia biomasy dokonywano w odstępach czasu wynoszących przynajmniej 20 h, przez co nie dostarczają one wystarczającej ilości danych potrzebnych do skwantyfikowania zaobserwowanej zależności. Występowanie innych czynników wpływających na wzrost komórek mikroalg takich, jak np. powstawanie aglomeratów

komórkowych i zarastanie ścian reaktora czy opisywany w literaturze efekt rozbłysku (*flashing light effect*) dodatkowo utrudnia analizę zebranych danych pod kątem opracowania ilościowej zależności pomiędzy szybkością wzrostu mikroalg, a promieniowaniem fotosyntetycznie aktywnym.



Rys. 5. Przykładowa zależność zmierzzonego natężenia promieniowania fotosyntetycznie aktywnego oraz zmian stężenia biomasy w hodowlach z wspomaganym przepływem medium hodowlanego: $F_p = 0,4 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$

Podsumowanie i wnioski

Na podstawie wyników przeprowadzonych hodowli okresowych mikroalg *S. obliquus* w badanych układach stwierdzono, że wykorzystując promieniowanie słoneczne dostępne w okresie letnim (w miesiącach VI-X) w środkowej Polsce można prowadzić hodowle mikroalg w fotobioreaktorze typu *air-lift driven*. Ponadto:

- najwyższe stężenie biomasy ($C_X = 4,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) zanotowano podczas hodowli w układzie z wspomaganie i natężeniu przepływu powietrza przez moduł *air-lift* wynoszącym $F_p = 0,3 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$;
- zastosowanie pompy perystaltycznej wspomagającej przepływ medium hodowlanego przez pętlę kolektora słonecznego nie wywołało negatywnego wpływu na biomasę komórek *S. obliquus*;
- zaobserwowano negatywny wpływ intensywnego napowietrzania w module *air-lift*, które działało niszcząco na znajdujące się w strefie wznoszenia komórki oraz ich cenobia;
- zaobserwowano zależność między natężeniem energii promieniowania słonecznego padającego na fotobioreaktor a przyrostem biomasy mikroalg, jednakże uzyskane wyniki nie wystarczyły do jej ilościowego opisu.

LITERATURA

- Becker E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207-210. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002
- Carvalho A.P., Meireles L.A., Malcata F.X., 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system design and performances. *Biotechnol. Prog.* 22, 1490-1506. DOI: 10.1021/bp060065r
- Chisti Y., 2007. Biodiesel from microalgae *Biotechnol. Adv.* 25, nr 3, 294-306. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Hullat C.J., Thomas D.N., 2010. Energy efficiency of an outdoor microalgal photobioreactor sited at mid-temperate latitude. *Bioresour. Technol.* 102, nr 12, 6687-6695. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.098
- Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C.Q., Dubois-Calero N., 2008. Algae-based biofuels. *Biotechnol. Prog.* 24, 815-820. DOI: 10.1021/bp070371k
- Mandal S., Mallick N., 2011. Waste utilization and biodiesel production by the green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 374-377. DOI: 10.1128/AEM.01205-10
- de Moraes M.G., Costa J.A.V., 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in three-stage serial tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 129, 439-445. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.01.009
- Posten C., 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.* 3, 165-177. DOI: 10.1002/elsc.200900003
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87-96. DOI: 10.1263/jbb.101.87