

Studio di un reattore enzimatico a membrana per l'idrolisi del lattosio nel siero di latte

Massimo Pizzichini, Roberto Pilloton, Giuseppe Zeddità
ENEA CRE Casaccia - Divisione Chimica - Roma

La trasformazione enzimatica del lattosio nel siero di latte in monosaccaridi edulcoranti e digeribili (glucosio e galattosio) è interessante sia sotto il profilo alimentare (recupero di valori nutritivi) che ambientale (B.O.D. = 50.000).

Un bioreattore enzimatico a membrana è stato realizzato per immobilizzazione della β -galattosidasi in un modulo a fibre cave. Con un substrato di lattosio al 5% in un solo passaggio nel bioreattore (backflushing) si ottengono rese idrolitiche comprese fra il 50 e il 70%.

The hydrolysis of lactose in a cheese whey (by β -galactosidase) into sweet and digestible monosaccharides (as glucose and galactose) is economically interesting for the food industries (recovering of sweet products) and for disposal problems related with the high B.O.D. content (50,000 ppm) in the whey wastes.

A continuous lactose bioreactor obtained by immobilization of a β -galactosidase enzyme in the shell side of an hollow fiber membrane module is studied.

In a single substrate (lactose 5%) pass through, the bioreactor shows a monosaccharides hydrolysis yield between 50 and 70%.

Introduzione

Nel nostro paese la grande produzione di siero di latte, valutata intorno ai 4-5 milioni di tonnellate/anno, crea problemi di smaltimento anche in seguito alla vigente normativa di rilascio dei reflui industriali (Legge Merli). Il siero delle industrie casearie, ma anche i reflui del settore lattiero, presentano generalmente un'elevata carica inquinante (B.O.D. 50.000 ppm) e basso valore economico per la notevole diluizione del prodotto. A ciò si

aggiungono altri aspetti economicamente negativi come l'elevato costo di trasporto, la bassa solubilità del lattosio nel siero, la facile fermentabilità del prodotto dovuta ad un'elevata carica microbica, l'invecchiamento e la colorazione (giallo-verde) del prodotto ecc.

L'applicazione della nuova normativa sul controllo dei reflui industriali pone il problema di riconsiderare, non solo da un punto di vista ambientale, ma

anche produttivo, lo smaltimento, il recupero e la valorizzazione dei costituenti naturali del siero di latte. Il sottoprodotto siero in Italia viene per circa il 75% utilizzato tal quale per l'alimentazione dei suini, il 13% viene disidratato e commercializzato in polvere per l'alimentazione zootecnica e umana, il 5% viene trasformato in ricotta, mentre il rimanente viene disperso in vario modo, generalmente in fogna causando problemi ambientali.

Il trattamento di ultrafiltrazione (UF) del siero (Goldsmith, 1981), più diffuso nei paesi del nord Europa e negli Stati Uniti che in Italia, consente una valorizzazione notevole dei suoi costituenti naturali. Fra questi in particolare vanno considerate le siero proteine, il lattosio e l'acqua.

Le siero proteine, presenti in percentuali intorno allo 0,7%, hanno un elevatissimo valore biologico, sono solubili in un largo intervallo di pH e per questo sono molto richieste come additivo alimentare fragrante e digeribile per linee dietetiche, per l'alimentazione neonatale, infantile, ecc.

L'acqua costituisce circa il 95% del siero, per cui il suo recupero consentirebbe di riciclare questo effluente nel processo produttivo dell'azienda (caseificio) richiedendo solo una piccola integrazione. L'impiego di tecnologie di UF ed in particolare di iperfiltrazione (IF) consentirebbe tra l'altro di riottenere acqua sterile o con bassa carica batterica assai importante nel settore lattiero-caseario. Il lattosio si trova nel siero di latte di vacca ad una concentrazione che oscilla intorno ai 50 g/l. La scarsa digeribilità di questo disaccaride nel latte da parte delle popolazioni mediterranee adulte suggerisce una parziale idrolisi del lattosio nei due monosaccaridi costituenti (glucosio e galattosio). Ciò viene realizzato mediante idrolisi del lattosio in batch per ottenere un latte più digeribile, parzial-

mente edulcorato e meno calorico (Wiseman, 1985).

Attualmente l'impiego di tecnologie UF e microfiltrazione nel settore consente separazioni specifiche (proteine, glucidi, acqua) da cui è possibile un utilizzo integrato dei costituenti del siero di latte. L'UF del siero consente di raccogliere nel concentrato la frazione proteica e nel fluido permeato sostanzialmente lattosio, sali minerali e acqua in ambiente parzialmente sterile poiché la flora batterica viene trattenuta dalle membrane. Su questo permeato è possibile realizzare l'idrolisi del lattosio attraverso l'impiego di un bioreattore enzimatico in continuo (Kohlway et al., 1981).

Questo tipo di reattore, cosiddetto di seconda generazione, in cui l'enzima β -galattosidasi (lattasi) viene immobilizzato sul supporto costituito da una membrana da ultrafiltrazione, presenta interessanti vantaggi pratici:

- a) bassa quantità di enzima impiegato;
- b) reattoristica modulare e quindi impiantistica ridotta;
- c) reazione in flusso continuo;
- d) veloce cinetica di reazione (bassa inibizione da prodotto, nel caso specifico galattosio);
- e) separazione del prodotto dall'enzima;
- f) controllo rigoroso dei parametri di processo.

Nel presente lavoro vengono discusse le prestazioni di un reattore lattasico a membrana realizzato per confinamento del bio-

catalizzatore su membrane polisolfoniche di UF a fibre cave.

Le prestazioni del bioreattore vengono analizzate in un vasto campo di variabili cinetiche e di processo. In termini pratici tale reattore consentirebbe la produzione di un alimento edulcorato (glucosio e galattosio) più digeribile, a basso contenuto calorico e con possibili e vantaggiosi impieghi nell'industria lattiero-casearia (yogurt, latte dietetico, formaggi freschi, bevande, creme di gelateria, ecc.).

2. Parte sperimentale

2.1 Materiali e strumentazione

a) *Reattore.* L'enzima β -galattosidasi (EC 3.2.1.23, grade XI, attività 4,3 U/mg da *Aspergillus oryzae*) prodotto dalla Sigma Co. in forma liofilizzata è stato immobilizzato su moduli di UF Amicon H1P10-20 le cui caratteristiche sono riportate in tabella 1.

b) *Substrato.* Soluzione di lattosio (0,1-5%), in tampone citrato 25 mM pH 4,5. Tale soluzione viene mantenuta a temperatura costante durante le singole fasi sperimentali del reattore con un criotermostato Hetofrig che consente di refrigerare (4°C) e quindi conservare l'enzima immobilizzato nel modulo di UF nei periodi non operativi. Il feed viene inviato attraverso il modulo con una pompa peristaltica Gilson Micropuls 2 e il permeato è raccolto nel tempo con un collettore di frazioni Tokio Rikakikai Co. Ltd. Lo schema operativo del bioreattore viene riportato in fig. 1 insieme alle apparecchiature impiegate.

Tutti i prodotti chimici utilizzati sono puri per analisi (Carlo Erba-Farmitalia RP-ACS).

c) *Strumentazione analitica.* Per le analisi dei glucidi si è fatto uso di diverse tecniche analitiche (HPLC, biosensori amperometrici ad ossigeno e ad acqua ossigenata). Il sistema HPLC della Varian comprende una pompa isocratica 2010, un iniettore Rheodyne con loop da 10 μ l, un rivelatore ad indice di rifrazione RI-3, una colonna specifica per la separazione dei carboidrati (tipo

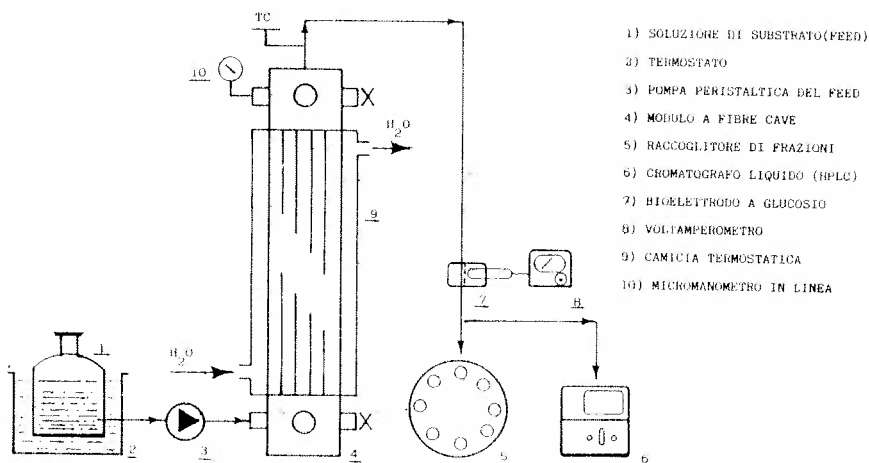


Fig. 1 - Schema operativo del bioreattore lattasico e delle apparecchiature strumentali per il controllo del processo.

CH-620), un computer-integratore Vista 402. Per l'analisi del glucosio nel permeato si è utilizzato un Glucose Analyzer 2 prodotto dalla Beckman, che consente analisi discontinue sui campioni raccolti, e un sensore per l'acqua ossigenata (Yellow Spring Instruments) opportunamente accoppiato con l'enzima glucosio ossidasi (GOD) per seguire in continuo e in tempo reale il comportamento del reattore. L'apparecchiatura per questo bioelettrodo è costituita da un potenziostato Amel mod. 550, un elettrometro Keithley mod. 642, un registratore HP7132A e da una pompa Gilson Micropuls 2. Per il bioelettrodo si è utilizzato l'enzima GOD tipo VII prodotto dalla Sigma Co. (Attività 125 U/mg, da *Aspergillus niger*) immobilizzandolo covalentemente sulla superficie dell'elettrodo.

2.2 Controllo del processo

Il controllo dei parametri chimico-fisici del processo è di notevole importanza per la caratterizzazione del sistema in esame e per la costruzione di un modello matematico in base al quale risulta possibile correlare le variabili in gioco e ottimizzare il comportamento del reattore in termini di resa (Fabiani et al., 1987).

La temperatura è stata controllata con sistemi di termoresistenze (sensibilità $\pm 0,3$ °C, Sigest) inserite in ingresso del feed e in uscita del permeato. La pressione di esercizio del modulo è stata controllata con manometri miniaturizzati (DPI 260, Druk) in linea registrando il segnale in uscita dal lettore digitale.

Dal punto di vista analitico il processo può essere caratterizzato in modo univoco determinando il contenuto in lattosio, glucosio e galattosio nel permeato. Per far questo ci si è avvalsi di diverse tecniche analitiche che brevemente passiamo in rassegna.

HPLC: La separazione e l'analisi dei tre zuccheri è stata condotta con il cromatografo descritto nella sezione 2.1 sulle frazioni di permeato raccolte in tempi variabili di 30, 60 e 90 minuti.

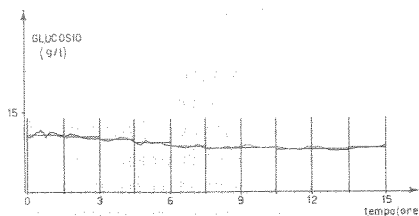


Fig. 2 - Esempio di un tracciato relativo al monitoraggio in continuo del glucosio tramite un biosensore. Le frazioni di permeato sono state raccolte per tempi di 90 minuti e su di esse è stato determinato il contenuto medio in glucosio. In figura si possono comparare i risultati del monitoraggio in continuo con quelli ottenuti sulle frazioni raccolte.

Glucose Analyzer 2 e sensore amperometrico per il glucosio in continuo. Il glucosio prodotto dalla reazione enzimatica è stato analizzato con due sistemi amperometrici ad enzima. Il Glucose Analyzer 2 (Beckman) è costituito da un sensore per l'ossigeno e si basa sulla ben nota reazione catalizzata dall'enzima GOD:



per cui da una misura di corrente è possibile risalire alla quantità di ossigeno consumato dalla reazione enzimatica e quindi alla concentrazione di glucosio nel campione. Le analisi vengono eseguite su frazioni raccolte ogni 30, 60, 90 minuti. Con il Glucose Analyzer 2 e l'HPLC si ottiene, perciò, un controllo discontinuo del processo. Lo sviluppo di un sensore per il glucosio in flusso posto sulla linea del permeato ci ha permesso di eseguire il processo in continuo e in tempo reale. Il controllo on line della resa del processo è importante nella fase di ricerca e studio per consentire la correlazione dei parametri chimico-fisici con la resa idrolitica del processo, ma anche nella fase produttiva dove l'acquisizione in continuo di dati relativi al processo ne consente l'automazione. Questo sistema è basato sulla stessa reazione enzimatica dell'enzima GOD appena citata, accoppiato con un sensore elettrochimico per l'acqua ossigenata (Guilbault, 1984). Il biosensore così ottenuto è posto in una cella a flusso. In figura 2 è riportato un tracciato registrato durante una fase del processo.

La concentrazione di glucosio ottenuta con questo sensore, in continuo, è paragonata con quella ottenuta con il Glucose Analyzer 2 su frazioni di permeato raccolte ogni 90 minuti.

2.3 Immobilizzazione enzimatica

Una delle principali applicazioni dei processi a membrana nelle biotecnologie consiste nell'immobilizzare biocatalizzatori (enzimi o cellule) con l'obiettivo di condurre praticamente la trasformazione chimica di un substrato. Membrane di microfiltrazione, ultrafiltrazione, iperfiltrazione ed anche da dialisi vengono impiegate vantaggiosamente per questo scopo.

Nell'ultimo decennio sono stati studiati molti processi di immobilizzazione che hanno, fra l'altro, classificato il sistema di membrane in base al tipo di immobilizzazione del biocatalizzatore. Per questa classificazione si fa riferimento alla European Federation of Biotechnology (E.F.B., 1983; Gecas, 1983).

Lo scopo dell'immobilizzazione, non solo su membrane ma anche su altri supporti, consiste nell'ancorare saldamente il mediatore biologico al supporto mantenendo la sua attività per lungo tempo. L'immobilizzazione può essere realizzata con legami chimici covalenti fra i gruppi reattivi dell'enzima e particolari gruppi funzionali del supporto (-OH, -NH₂, -COOH) già presenti su quest'ultimo o introdotti appositamente con reazioni di funzionalizzazione. Nella pratica fermentativa, però, il legame covalente fra supporto e biocatalizzatore può ridurre l'attività

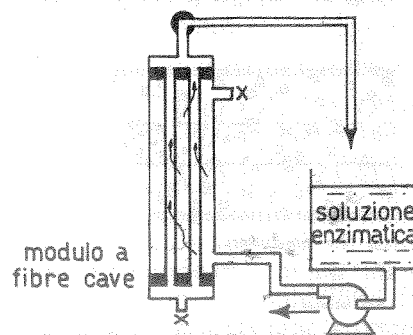


Fig. 3 - Schema idraulico di immobilizzazione con deposito enzimatico sulla superficie esterna delle fibre cave.

enzimatica e quindi le prestazioni del reattore a membrana.

La superficie microporosa della membrana a fibre cave asimmetriche fornisce una buona opportunità per immobilizzare fisicamente enzimi o cellule. Moduli commerciali da UF (Amicon, Romicon, Dow ecc.) sono stati utilizzati con successo a questo scopo. Fabiani e Pizzichini hanno realizzato reattori cellulari a membrana per l'immobilizzazione di lieviti sulla superficie esterna di moduli Amicon HP100-43 con combinazione reattoristica del tipo backflushing (Gecas, 1983; Adami et al., 1986).

2.3.1 Procedura

Nel caso specifico l'immobilizzazione della lattasi viene realizzata in backflushing su modulo Amicon H1P10-20 secondo lo schema di figura 3.

L'enzima è stato solubilizzato (1g/l) a 20 °C in acqua distillata dove si ha una maggiore solubilità della β -galattosidasi (pH 6,5). La soluzione viene inviata nel modulo a fibre cave nella direzione shell-side vs lumen side in modo da confinare la lattasi nella parte esterna porosa delle fibre (Fig. 4). L'immobilizzazione viene condotta a 20 °C inviando la soluzione enzimatica ad una portata di circa 3 ml/min.

Il controllo dell'immobilizzazione è stato effettuato determinando per via spettrofotometrica (assorbimento a 290 nm) il contenuto di proteine e saggiando l'attività lattasica sul fluido permeato. Tali controlli hanno rivelato la presenza di frazioni proteiche (0,3 g/l) che tuttavia non pre-

sentano attività lattasica. Ciò dimostra che nella fase di immobilizzazione l'enzima viene di fatto purificato da altre componenti proteiche non attive. Durante la fase di lavoro del bioreattore si è comunque accertato che non vi è rilascio delle frazioni proteiche anzidette (inquinamento del prodotto) e soprattutto della lattasi il cui peso molecolare si aggira intorno ai 130.000 dalton. Ciò conferma che il cut off delle membrane assicura la completa ritenzione dell'enzima.

2.4 Considerazioni idrodinamiche

Le caratteristiche idrodinamiche del modulo sono state studiate al fine di fissare i limiti operativi di flusso e pressione del bioreattore enzimatico. Come è noto la permeabilità di un modulo è funzione della pressione transmembrana applicata e delle viscosità del fluido permeante (acqua o feed) secondo la relazione:

$$j = \frac{A \Delta p}{\eta} \quad (1)$$

dove:

j è il flusso di permeato

A è il coefficiente di permeabilità del modulo che include i termini caratteristici della membrana (porosità, spessore, superficie, ecc.)

η è la viscosità del fluido permeante
 p è la differenza di pressione applicata sul liquido per la sua permeazione.

Poiché R_m , la resistenza intrinseca che la membrana (modulo) oppone alla permeazione del liquido, è dato dalla relazione:

$$\frac{1}{R_m} = \frac{A}{\eta}$$

la relazione (1) diventa:

$$j = \frac{\Delta p}{R_m}$$

A livello sperimentale il valore di R_m è stato determinato misurando il flusso del permeato con acqua, tampone e feed in un range di pressioni comprese tra 0 e 1 bar e di temperature fra 25 e 35 °C. Nella figura 5 sono riportate le rette flusso/pressione a 25 °C

in diverse condizioni operative del modulo. Dalla figura possono essere ricavati i valori di R_m e da questi si può verificare sperimentalmente che la permeabilità della membrana diminuisce con la viscosità del fluido. Le rette a ($R_m = 0,006 \text{ bar} \times \text{min} \times \text{ml}^{-1}$) e b ($R_m = 0,009 \text{ bar} \times \text{min} \times \text{ml}^{-1}$) rappresentano infatti il comportamento di un modulo con acqua e con lattosio 5% in tampone citrico 25 mM, pH 4,5.

Confrontando le rette b ($R_m = 0,009 \text{ bar} \times \text{min} \times \text{ml}^{-1}$) e c ($R_m = 0,173 \text{ bar} \times \text{min} \times \text{ml}^{-1}$) si può invece osservare l'effetto della carica enzimatica sulla permeabilità. In condizioni di enzima immobilizzato si ha una riduzione di oltre il 90% della permeabilità di membrana al substrato (lattosio 5% in tampone citrato). Ciò costituisce un limite idraulico del bioreattore che tuttavia, anche in questa condizione sfavorevole, può operare in modo soddisfacente come dimostrano le prove idrolitiche di funzionamento in continuo del reattore.

2.5 Prestazioni del bioreattore

Le prestazioni idrolitiche del bioreattore vengono studiate in funzione di alcune variabili di processo come portata e concentrazione del substrato, temperatura e pressione di esercizio, tempo di permanenza del substrato nel reattore, tempo di vita medio del reattore ecc. con l'obiettivo di ricavare i dati di base per lo sviluppo del sistema. Queste variabili vengono messe in relazione con la resa idrolitica del reattore intesa come percentuale di monosaccaridi prodotti rispetto alla concentrazione del lattosio nel feed.

La figura 6 mostra il trend di produzione del bioreattore espresso in milligrammi di monosaccaridi al minuto vs tempo di funzionamento in continuo ad una temperatura costante di 25 °C. Le condizioni operative del reattore vengono riportate in tabella 2.

Il profilo delle due curve di produzione del bioreattore presenta il caratteristico andamento dei biosistemi immobilizzati su diversi supporti (Scott et al., 1984;

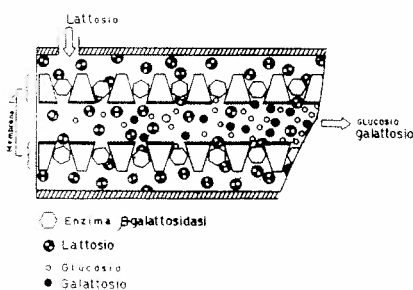


Fig. 4 - Sezione longitudinale di una singola fibra polisolfonica con deposito enzimatico e processo di idrolisi in continuo del lattosio (simboli in figura).

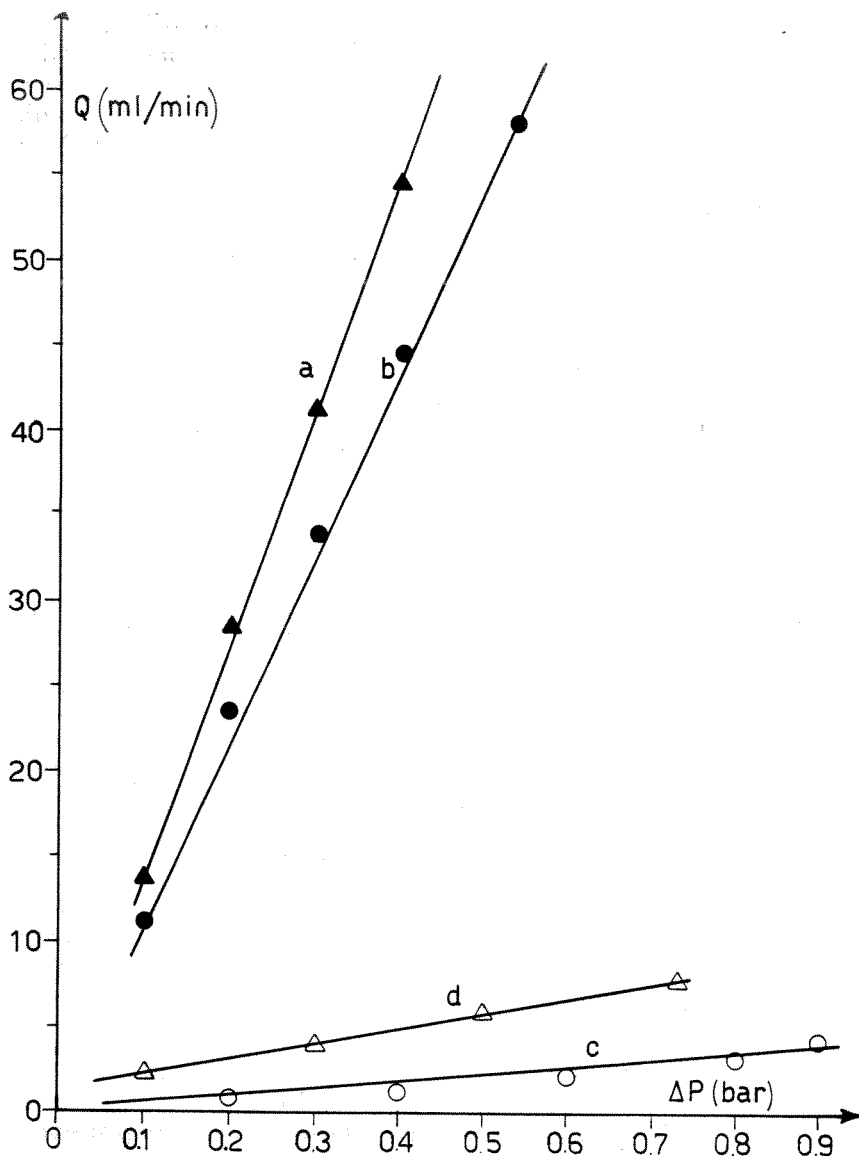


Fig. 5 - Permeabilità del modulo a fibre cave vs pressione idraulica applicata:
 retta a, Δ $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, fluido acqua distillata
 retta b, \bullet $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, fluido lattosio 5% w/v in tampone citrato
 retta c, \circ $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, fluido lattosio 5% w/v in tampone citrato e deposito enzimatico sulla fibra
 retta d, Δ $T=35\text{ }^{\circ}\text{C}$, fluido lattosio 5% mW,V in tampone citrato e deposito enzimatico sulla fibra.

Pizzichini et al., 1988) con un massimo produttivo nelle prime ore di funzionamento e raggiungimento di uno stato stazionario nelle ore successive. Ciò è spiegabile con il fenomeno di attivazione enzimatica da substrato che si traduce in un'alta concentrazione di prodotto, responsabile a sua volta di un effetto inibitorio sulla stessa attività enzimatica.

Ciò si manifesta con una riduzione della produttività, fino a quando, con il raggiungimento

dello stato stazionario, si stabilisce un equilibrio fra i due effetti.

Durante le ore di funzionamento la pressione di esercizio del bioreattore non ha subito incremento, dimostrando che non vi sono fenomeni di compattazione dinamica dell'enzima durante il processo. La bassa pressione di esercizio ($0,6\text{ kg/cm}^2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) dimostra operativamente che la membrana consente di aumentare la carica enzimatica depositata, e/o la portata di esercizio.

2.6 Effetto della temperatura

L'incremento della temperatura agisce favorevolmente sulla permeabilità idraulica del modulo a membrana e sulla cinetica enzimatica.

2.6.1 Sulla fluidodinamica del modulo

L'aumento della permeabilità idraulica si ottiene per effetto della diminuzione della viscosità delle soluzioni (dipendenza esponenziale) e in misura ridotta per effetto della dilatazione dei pori della membrana.

Sulla base delle prove idrauliche effettuate a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ è stato calcolato per la soluzione di lattosio 5% in tampone citrato un incremento di permeabilità espresso dalla variazione del coefficiente angolare della retta q vs Δp di 1,53 per $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 5). Dal punto di vista idraulico ciò significa che il campo di operatività del reattore in oggetto va ricercato nell'intervallo di temperature comprese tra $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (massima temperatura accettabile dalle membrane) e $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Questo condiziona l'impiego del bioreattore solo a temperature inferiori a $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il basso flusso di permeazione, infatti, può limitare l'uso pratico del bioreattore per tempi idrolitici elevati e verosimilmente con substrati reali (siero di latte da caseificio). La permeabilità al feed, a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, attraverso la membrana in condizioni di 1 g di lattasi immobilizzata ($1,66\text{ mg enzima/cm}^2$) subisce un incremento del flusso di permeato di circa il 60% rispetto ai $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (curva d di Fig. 5). In queste condizioni di temperatura i flussi di permeato sono più elevati rispetto a quelli necessari per una resa ottimale di idrolisi.

2.6.2 Sulla cinetica enzimatica

Prima di studiare l'effetto termico sulle prestazioni del bioreattore lattasico, è stato preliminarmente studiato tale effetto in batch in un sistema termostato. La β -galattosidasi ad una concentrazione di $0,09\text{ mg/ml}$ è stata posta in una soluzione di lattosio 5% in tampone citrato pH 4,5 per 25 minuti. In figura 7 si riporta la curva caratteristica di attività enzimatica ($\mu\text{moli di}$

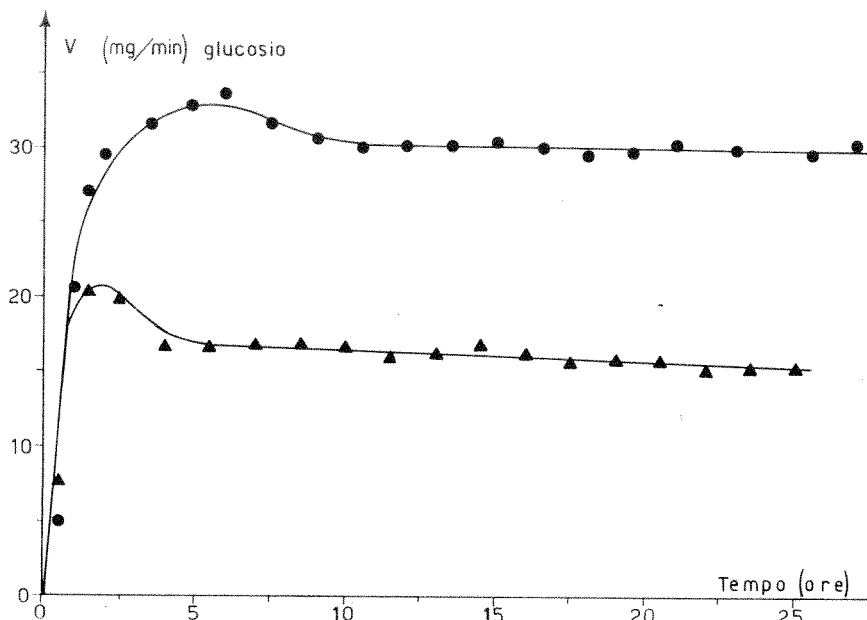


Fig. 6 - Velocità di produzione del bioreattore (V) a 25 °C espresso in milligrammi di glucosio prodotti al minuto vs tempo di idrolisi in continuo per substrato ● 5% e △ 2,5%.

glucosio prodotto x minuto⁻¹ x mg enzima⁻¹) in funzione della temperatura nell'intervallo 25-60 °C. La curva mostra un massimo di attività enzimatica intorno ai 50 °C in buon accordo con i dati di letteratura (Wiseman, 1985). Oltre i 50 °C si nota infatti una disattivazione sensibile dell'attività enzimatica. Ciò significa che la temperatura di 50 °C costituisce il limite massimo di operatività dell'enzima e anche del modulo a fibre cave. Si è pertanto scelto di operare ad una temperatura di 35 °C anche nell'intento di prolungare la vita media del bioreattore.

La figura 8 mostra l'andamento di produzione del glucosio in continuo per 25 ore del bioreattore a 35 °C con un substrato al 5%. La curva presenta il classico andamento con massimo iniziale e fase di stato stazionario a partire dalle 7-10 ore di funzionamento. Le condizioni operative di cui alla figura 8 sono identiche a quelle riportate per la figura 6. Dal confronto delle due curve di produzione, si nota, a 35 °C, un incremento del valore medio di produttività allo stato stazionario (30 mg/min contro 34,5 mg/min corrispondenti ad una concentrazione di circa il 57,5%). Questo dato è significativo per lo sviluppo pratico del bioreatto-

re lattasico a fibre cave. Si osserva comunque che alla temperatura di 35 °C la vita media del reattore diminuisce come appare dalle diverse pendenze nel tempo delle due curve di produzione a 25 e 35 °C (Fig. 8).

2.7 Tempo di vita medio

La valutazione del tempo di vita medio del bioreattore richiede un test più significativo di quanto riportato nelle prove precedenti di 25-30 ore di funzionamento in continuo. Si è cercato perciò di prolungare il più possibile, compatibilmente con le disponibilità sperimentali, le prove di funzionamento in continuo del reattore lattasico. Parallelamente si è cercato di sperimentare sistemi pratici di stoccaggio a freddo del sistema o esperienze del tipo "stop and go" per cercare di far risalire l'attività del reattore che gradualmente tende a scendere nel tempo.

Le prove di lunga durata sono state eseguite con la stessa carica enzimatica (1g/l), flusso di permeato (2,3 ml/min), una concentrazione del substrato di 5 g/l. La figura 9 mostra la velocità di produzione del reattore in funzione del tempo complessivo di funzionamento di circa 230 ore. Durante questo tempo sono state effettuate due variazioni delle

condizioni operative di cui sopra, la prima, di 70 ore a partire dalle 25 ore di funzionamento, inviando diverse concentrazioni di substrato (dall'1% al 5% lattosio), la seconda, di 98 ore a partire dalle 114 ore di funzionamento, in cui si è operato come in precedenza variando la concentrazione di substrato ma in più si è interrotto il flusso di substrato per 12 ore, refrigerando il bioreattore a 4 °C.

Considerando il decadimento di attività nell'arco delle 230 ore di reale immobilizzazione dell'enzima sulle fibre si ottiene un tempo di decadimento di circa 680 ore. Ovviamente questo dato non è molto indicativo poiché dipendente dalle sperimentazioni intermedie effettuate, dalla concentrazione iniziale di substrato e anche dalla temperatura, tipo di enzima ecc. Come si vede dalla figura 9 la refrigerazione del reattore nell'intervallo 114-212 ore ha un effetto stabilizzante sull'attività enzimatica che non soltanto si attesta, dopo lo stop di 12 ore, a valori più elevati, ma rimane anche stabile nelle 22 ore successive di funzionamento. Ciò potrebbe significare una stabilizzazione criogenica del bioreattore particolarmente importante anche per una bonifica microbiologica del bioreattore stesso.

Da quanto discusso in precedenza è ovvio che a temperature più basse di 35 °C è da aspettarsi un tempo di vita media più elevato. Dal punto di vista ingegneristico si tratta quindi di ottimizzare le rese idrolitiche con un tempo di vita media del bioreattore il più lungo possibile.

2.8 Produttività del bioreattore

Da un punto di vista ingegneristico si richiede una valutazione di tipo economico sul sistema e processo proposto. A tal fine è anche utile stimare la variazione della produttività del reattore in funzione, ad esempio, della portata di substrato e della concentrazione in lattosio. Nella figura 10 si riporta in ascissa il tempo di permanenza del substrato all'interno del reattore e, in ordinata (sinistra), la velocità di pro-

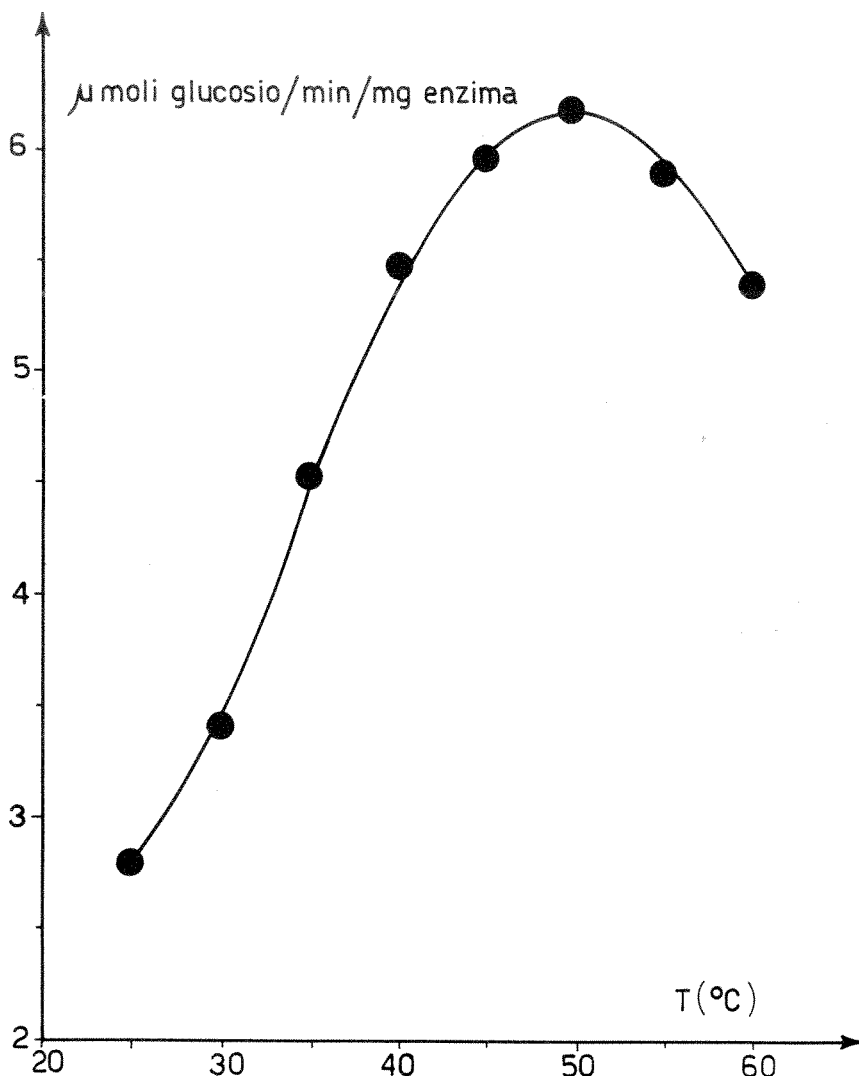


Fig. 7 - Effetto della temperatura sull'attività enzimatica in batch espressa in micromoli di glucosio prodotte al minuto per milligrammo di enzima.

duzione, mentre, in ordinata (destra), la resa idrolitica n per concentrazioni di substrato di 1 e 3%. Queste curve sono state ottenute con una carica enzimatica di 1,5 g ad una temperatura di 35 °C. Per entrambe le due concentrazioni la resa idrolitica aumenta a tempi di permanenza più elevati (20 minuti), e quindi a portate ridotte di substrato. Il rendimento più elevato si ottiene a basse concentrazioni di substrato (1%). Viceversa la velocità di produzione è più elevata a bassi tempi di contatto e a concentrazioni più elevate di substrato. L'incrocio fra le due curve ottenute alla stessa concentrazione di substrato indica una posizione di compromesso fra le due grandezze, di un certo inte-

resse pratico per il tipo specifico di bioreattore considerato.

Conclusioni

Un modulo Amicon a fibre polisolfoniche cave del tipo H1P10-20 consente di confinare in condizioni di UF il 100% dell'enzima β -galattosidasi, che, durante la fase di immobilizzazione (back-flushing) viene spontaneamente purificato da altre componenti proteiche.

L'immobilizzazione enzimatica (1,66 mg enzima/cm² superficie fibre) riduce di circa il 90% la permeabilità idraulica del modulo in condizioni di idrolisi del lattosio, pur consentendo, anche a 25 °C, di operare a flussi accettabili di 1 bar. L'incremento di

10 °C (35 °C) determina un aumento di permeabilità di tre volte, che non si riduce dopo 230 ore di funzionamento del reattore in continuo dimostrando che durante il processo idrolitico non c'è fouling di membrane.

A 35 °C, con un solo passaggio di substrato nel reattore, si ottengono rese idrolitiche fra il 50 e il 70% a seconda della concentrazione di substrato di 50 g/l si ottengono concentrazioni di glucosio (e quindi di galattosio) intorno ai 14,5 g/l ad un flusso di produzione di 2,3 ml/min. Con una concentrazione di 5 g/l si ottiene un tempo di vita medio del reattore valutato intorno alle 700 ore di funzionamento in continuo valutato sulla base di prove di 230 ore.

La refrigerazione a +4 °C dell'enzima dopo le fasi di idrolisi sembra stabilizzare la velocità di produzione del bioreattore e quindi prolungare il tempo di vita medio anche in modo sensibile.

Il bioreattore presenta una notevole versatilità operativa dimostrando di poter essere impiegato, con rendimenti accettabili, nel range 2-7 ml/min di portata di substrato. La disponibilità di membrane polisolfoniche a fibre cave dotate di una più alta permeabilità anche a temperatura ambiente e di un maggior sviluppo superficiale consentirebbe di prolungare la vita media del bioreattore e migliorare ulteriormente le rese idrolitiche del processo.

Ricevuto il 24 Giugno 1988

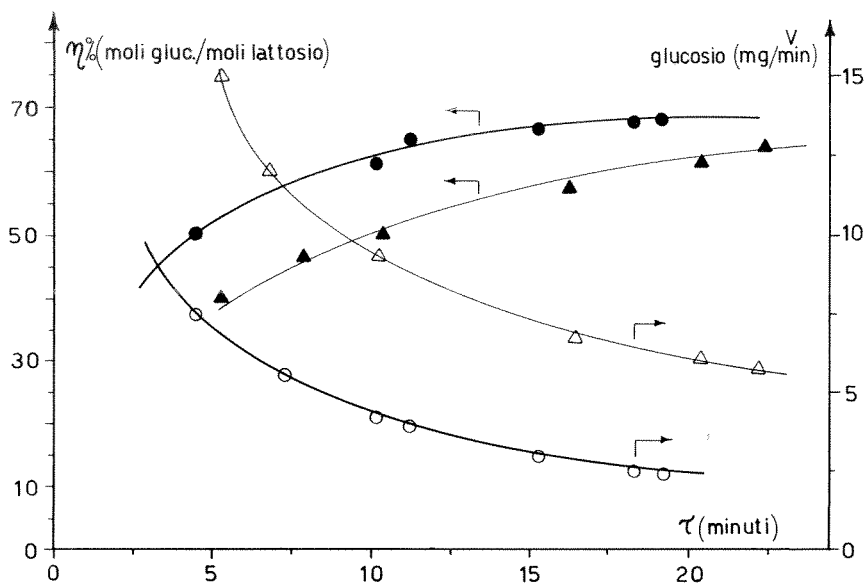


Fig. 10 - Confronto fra i rendimenti di idrolisi η e la velocità di produzione del glucosio per due concentrazioni di substrato (1% ○, ● e 3% △, ▲) in funzione del tempo di permanenza (τ) del substrato nel bioreattore.

Tab. 1 - Specifiche del modulo a fibre cave H1P10-20 Amicon.

Materiale costituente le fibre: polisolfone
Materiale di riempimento: resine epossidiche
Materiale di rivestimento (housing): polietilene
Molecular weight cut off: nominale 10.000 dalton
Area superficiale: 600 cm ²
Diametro interno delle fibre: 0,5 mm
Diametro della cartuccia: 2,3 cm
Lunghezza della cartuccia: 20,3 cm
Numero delle fibre: 250
Pressione massima operativa: 1,8 kg/cm ²
Temperatura massima operativa in continuo: 50 °C
Intervallo di pH: 1,5-13

Tab. 2 - Condizioni operative del bioreattore nel test di idrolisi a 25 °C (Fig. 6).

Membrana: Modulo amicon a fibre cave tipo H1P10-20		
Carica enzimatica: β -galattosidasi, 1g		
Pressione di esercizio: 0,3 kg/cm ²		
Portata di substrato: 2,4 ml/min		
Tempo di permanenza: = 10,4 min		
Concentrazione di substrato:	lattosio 2,5%	lattosio 5,0%
Produttività massima	40 mg/min	70 mg/min
Produttività media	32 mg/min	60 mg/min
Resa media	18,7%	20,0%

Bibliografia

Adami, A., C. Fabiani, M. Leonardi and M. Pizzichini. 1986. Membranes and membrane processes, (Ed.) E. Drioli and M. Nakagaki. In: Plenum Publishing Corporation: 241-253.

E.F.B. Working Party on Immobilized Biocatalysts, Enzyme Microb. Technol. 1983, 5: 304-307.

Fabiani, C., G. Giubileo, M. Pizzichini and V. Violante. 1987. Biotechnol. Bioeng., 30: 456.

Gecas, V.C. 1983. Enzyme Microb. Technol., 8: 450.

Goldsmith, R.L. 1981. Dairy Field, 163, 8: 88.

Guibault, G. 1984. Analytical Uses of Immobilized Enzymes, Marcel Dekker, (Ed.), New York.

Handbook of enzyme Biotechnology, A. Wiseman Ed. (1985).

Kohlway, D.E. and M. Cheryan. 1981. Enzyme, Microb. Technol., 3: 64-68.

Pastore, M., M. Marisi and D. Zaccardelli. 1974. Immobilized Enzyme (Ed.) M. Salmona, C. Saronio e S. Garattini, Raven Press: 214-216.

Pizzichini, M., C. Fabiani, A. Adami e V. Cavazzoni. Biotechnol. Bioeng. in corso di pubblicazione, serie n. BB-87-249.

Scott, T.C., C.G. Hill and C.M. Amudson. 1984. Biotechnology and Bioeng. Symp. N. 14.

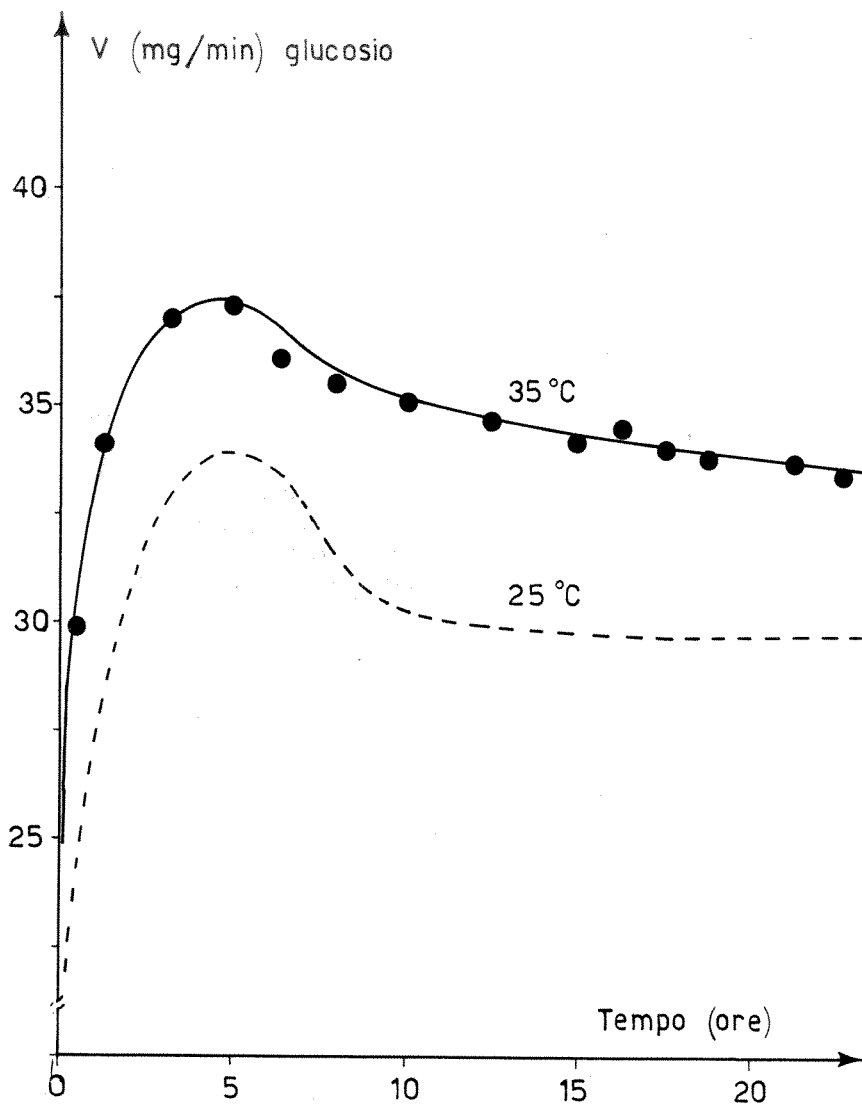


Fig. 8 - Confronto fra la velocità di produzione del glucosio e 35 °C, e a 25 °C in funzione del tempo di idrolisi in continuo del lattosio 5%.

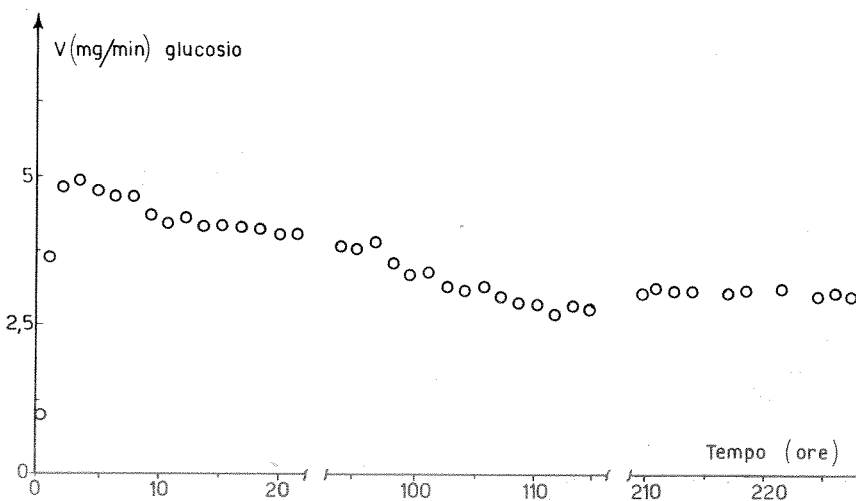


Fig. 9 - Velocità di produzione del glucosio (V) verso il tempo di lavoro in continuo del bioreattore. T = 35 °C, substrato 5%.