

FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

270 124

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/02//
C 12 R 1:07

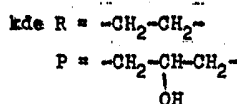
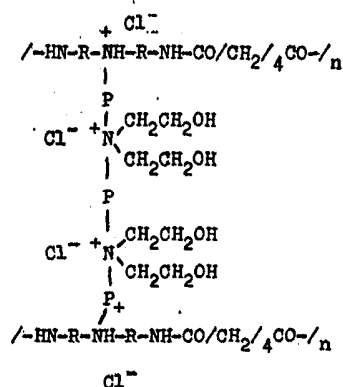
(21) PV 3511-87.X
(22) Prihlásené 15 05 87

(40) Zverejnené 13 10 89
(45) Vydané 27 02 91

(75) Autor vynálezu SITKEY VLADIMÍR ing.,
KUZMOVÁ ELENA ing.,
KRČMAR STANISLAV ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob separácie biomasy a balastných koloidných
častíc z fermentačnej pôdy

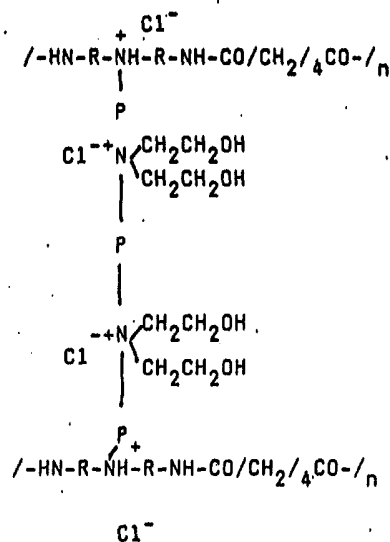
(57) Riešenie sa týka spôsobu separácie
tuhej fázy z vyfermentovanej pôdy s využí-
tím flokulačných vlastností kationaktívneho
polyaminoamidu (vzorec I), resp. jeho hete-
rokoagulačného účinku v spojení s minerálnymi
hydrokoloidmi typu bentonitu. Podstata
riešenia spočíva v prídavku kationaktívne-
ho flokulantu do vyfermentovanej pôdy za
intenzívneho miešania pri pH 6 až 10 a
teplote 10 až 40 °C v koncentrácii 0,02 až
3,0 g/l. Po 30 minútovej výdrži sa vytvo-
rené flokuly odseparujú odstredovaním, resp.
filtráciou. Pri modifikovanom postupe sa
separačná účinnosť zvýši použitím bentonitu
v koncentrácii 0,1 až 2,0 g/l vyfermentova-
nej pôdy. Uvedený spôsob čistenia vyfermen-
tovanej pôdy umožňuje zníženie izolačných
strát oproti použitiu anorganických solí
ako koagulačných prostriedkov o 10 až 15 %.



Vynález sa týka spôsobu separácie biomasy a balastných koloidných častíc z fermentačnej pôdy pri izolácii extracelulárnych bakteriálnych enzýmov, s využitím účinkov polymérneho syntetického kationaktívneho flokulantu.

Pri izolácii extracelulárnych produktov z fermentačnej pôdy je kľúčovým problémom oddelenie tuhej a kvapalnej fázy. Tuhú fázu tvoria bunky mikroorganizmov, neutilizované zložky média a koloidné častice. Tieto častice spôsobujú problémy pri filtrácii alebo odstreďovaní, pretože upchávajú póry filtrov, resp. pri odstreďovaní nedochádza k oddeleniu fáz. Aby sa dosiahlo vyčistenie filtrátu (fugátu), musí sa fermentačná pôda pred separáciou chemicky opracovať, aby vznikli z mikroskopických častíc väčšie, ľahko odstrániteľné agregáty. Najčastejšie sa pre tento účel využívajú koagulačné vlastnosti anorganických látok, napríklad CaCl_2 , $\text{Al}_2\text{SO}_4/3$, FeCl_3 , Ca(OH)_2 . Tieto postupy majú nedostatky, v tom, že pri opracovaní fermentačnej pôdy dochádza ku vzniku objemnej zrazeniny, ktorej separácii je obtiažna a je sprevádzaná stratami extracelulárnych produktov vo filtráte. V posledných rokoch sa pre účely čistenia začínajú používať syntetické organické polyelektrolyty ako sú kyselina polyakrylová a jej deriváty, polyetylénimín, polystyrénsulfonát a kvartérne amóniové soli. Pomocou týchto organických flokulantov možno z média odstrániť aj jemne dispergované častice, čo často nie je možné v prípade použitia anorganických látok. Flokulačné vlastnosti organických polyelektrolytov sa zatiaľ v prevažnej miere využívajú pri čistení odpadových vôd, teda v procese, pre ktorý boli pôvodne vyvinuté. Vo fermentačnom priemysle ich použitie nenadobudlo také široké uplatnenie.

Horeuvedené nevýhody odstraňuje spôsob podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa na vyčistenie fermentačnej pôdy pri izolácii extracelulárnych mikrobiálnych metabolitov využijú flokulačné a koagulačné vlastnosti kationaktívnej syntetickej organickej makrozlučiny typu polyaminoamidu dikarbónovej kyseliny sieťovanej epichlórhydrínom vzorca:



I.

Kde R = $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

P = $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$

Výhodou tohto postupu je, že po prídavku uvedeného flokulantu do fermentačnej pôdy komplexného zloženia (pšeničná a kukuričná múka, škrob, kazeín, kŕmne droždie, sójová múka, sójový šrot), vznikne kompaktný sediment biomasy, balastných látok a koloidných častíc, ktorý sa dá odstrániť odstredením, alebo filtráciou. Týmto postupom sa docieľuje, že sa znížia straty enzýmovej aktivity pri izolácii extracelulárnych enzýmov o 10 až 15 %, v porovnaní s použitím anorganických solí, zrýchli sa proces separácie a umožní sa prípadné využitie odseparovaných buniek mikroorganizmov (napr. ako zdroj živín vo fermentačnej pôde, alebo ako krmivo).

Príkladom použitia vynálezu je postup pri separácii biomasy a koloidných častíc pri izolácii bakteriálnej alkalickéj a neutrálnej proteínázy.

P r í k l a d 1

Kmeň *Bacillus subtilis* CCM 3701 sa kultivoval submerzným spôsobom na laboratórnej trepačke na pôde nasledujúceho zloženia: 4 % pšeničná kŕmna múka, 3 % sójová múka, 2 % zemiakový škrob, 2 % kazeín, 1 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 % KH_2PO_4 , 0,5 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 % Na_2CO_3 ; pH = 8,5 (Spôsob podľa CS AO 234 180).

Po ukončení fermentácie sa dosiahla proteolytická aktivita 12 000 j/ml (stanovenie podľa metódy SU 397 843). K 3000 ml vyfermentovanej pôdy o celkovej aktivite $3,6 \cdot 10^7$ jednotiek, upravenej roztokom NaOH na hodnotu pH = 8,0 sa za intenzívneho miešania pri teplote 20 °C pridával roztok kationaktívneho polyaminoamidu o celkovej koncentrácii 0,9 g/l vo vyfermentovanej pôde. Po fáze 10 minútového miešania (z toho 2 minúty intenzívneho) nasledovala perióda 30 minútovej výdrže. Potom sa médium separovalo na odstredivke Janetzki K 70 pri 2800 otáčkach/minúta, po dobu 10 minút. Po separácii a vypratí sedimentu vodou sa získal číry supernatant o objeme 3000 ml a proteolytickej aktivite 11 400 j/ml a celkovej aktivite $3,42 \cdot 10^7$ jednotiek, čo predstavuje výťažok alkalickéj proteínázy 95 %.

P r í k l a d 2

Postupom podľa príkladu 1 sa získalo pri submerznej kultivácii producenta alkalickéj proteínázy *Bacillus subtilis* CCM 3701 vo fermentore 450 litrov vyfermentovanej pôdy o proteolytickej aktivite 11 00 j/ml a celkovej aktivite $4,95 \cdot 10^9$ jednotiek. pH pôdy sa upravilo na hodnotu 7,0 a za intenzívneho miešania pri teplote 17 °C sa do pôdy pridával roztok kationaktívneho polyaminoamidu o celkovej koncentrácii 1,0 g/l v spracovávanej pôde. Po 15 minútach miešania (z toho 5 minút intenzívneho) nasledovala perióda 30 minútovej výdrže. Potom sa médium separovalo na rotačnom vákuovom filtri Tecniplant Mod.P1 Pilota s naplavenou kremelinou pri rozdieli tlakov $\Delta p = 53 \text{ kPa}$. Po separácii a premytí filtračného koláča vodou sa získalo 615 litrov číreho filtrátu o proteolytickej aktivite 7 100 j/ml a celkovej aktivite $4,37 \cdot 10^9$ jednotiek, čo predstavuje výťažok alkalickéj proteínázy 88 %.

P r í k l a d 3

Kmeň *Bacillus subtilis* CCM 3993, producent neutrálnej proteínázy, sa kultivoval na laboratórnej trepačke na produkčnom médiu nasledovného zloženia: 6,0% kukuričný škrob, 1,0 % sójový šrot, 0,5% kazeín, 0,5% $\text{NH}_4/2\text{HPO}_4$, 0,065% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,16% Na_2HPO_4 .

.7H₂O, 0,05% CaCl₂.2H₂O, 0,5% NaCl, 0,1% ZnSO₄.7H₂O; pH = 7,0. Po ukončení fermentácie bola fermentačná pôda podrobená flokulácii, pri využití heterokoagulačného účinku kationaktívneho polyaminoamidu a bentonitu. 900 ml vyfermentovanej pôdy o špecifickej proteolytickej aktivite 23 000 j/ml a celkovej proteolytickej aktivite 2,07.10⁷ jednotiek (stanovenie podľa Keay, L. a Wildi, S.: Biotechnol. Bioeng. 12, 179-212, 1970) sa upravilo roztokom NaOH na hodnotu pH = 7,5. Za intenzívneho miešania sa pri teplote 22 °C pridával do pôdy roztok bentonitu o celkovej koncentrácii 2,5 g/l v spracovanej pôde. Po 5 minútach miešania sa pridal do pôdy roztok kationaktívneho polyaminoamidu o celkovej koncentrácii 0,1 g/l v spracovanej pôde.

Po 10 minútach miešania (z toho prvé 2 minúty intenzívneho) nasledovala 30 minútová výdrž. Potom sa spracovaná pôda separovala na diskovej odstredivke De Laval Gyro Test pri 12 000 otáčkach za minútu. Po separácii a premytí kalov v bubne separátora vodou sa získalo 1016 ml číreho fagátu o špecifickej proteolytickej aktivite 17170 j/ml a celkovej aktivite 1,745.10⁷ proteolytických jednotiek, čím sa dosiahla výťažnosť neutrálnej proteínázy 84%.

Spôsob separácie biomasy a koloidných častíc z fermentačnej pôdy sa dá použiť pri izolácii extracelulárnych enzýmov, napr. alkalického a neutrálnej proteínázy, ako aj pri izolácii ďalších fermentačných produktov a pri získavaní biomasy cestou flokulácie mikrobiálnych buniek.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob separácie biomasy a balastných koloidných častíc z fermentačnej pôdy pri izolácii extracelulárnych bakteriálnych enzýmov vyznačujúci sa tým, že sa fermentačná pôda vyčistí pridaním syntetickej makromolekulárnej zlúčeniny typu kationaktívneho polyaminoamidu dikarbónovej kyseliny za základných reakčných podmienok pri koncentrácii flokulantu 0,02 až 3,0 g/l s výhodou 0,05 až 1,5 g/l, teplote 10 až 40 °C, s výhodou 15 až 30 °C, pH 6 až 10, s výhodou 7 až 9.
2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa pridá kationaktívny polyaminoamid dikarbónovej kyseliny s minerálnymi hydrokoloidmi typu bentonitu o koncentrácii bentonitu 0,1 až 2,0 g/l, s výhodou 0,2 až 1,0 g/l.