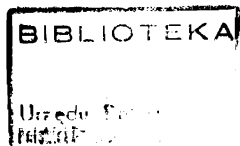


Warszawa, 25 kwietnia 1933 r. ²
C 42c 11/00

URZĄD PATENTOWY



RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 17982.

Kl. 6 b 16.

Deutsche Hydrierwerke Aktiengesellschaft
(Berlin-Charlottenburg, Niemcy).

Sposób prowadzenia procesów biochemicznych.

Zgłoszono 12 grudnia 1928 r.

Udzielono 17 lutego 1933 r.

Technika współczesna stosuje rozmaite procesy biochemiczne, a zwłaszcza procesy fermentacyjne, np. fermentację węglowodanów pod wpływem drożdży i bakterij, w celu wytwarzania etanolu, izopropanolu, butanolu, acetonu, kwasu mlekowego, masłowego i t. d. Fermentacje te prowadzi się zapomocą czystych hodowli poszczególnych gatunków, albo zapomocą ich mieszanin symbiotycznych.

Do uzyskiwania czynników wzbudzających te znane procesy służą powszechnie znane metody bakterjologiczne (metoda rozcieńczania Koch'a, metoda płytkowa, sposób tuszowy według Burri'ego, kultura kroplowa i t. d.). W ten sposób wyosobniono bakterje typu *Bacillus butylicus* Fitz do

jednoczesnego wytwarzania acetonu i wyższych alkoholi. Sposób ten nie jest technicznie doskonały, ponieważ bakterje te są nadzwyczaj wrażliwe na infekcje, przy małym stężeniu materiału fermentującego dają bardzo złe wydajności, mogą pracować wyłącznie bez dostępu powietrza (anaerobioza), nie trawia białek z materiału fermentującego, wymagają przeto kosztownego dodatku białka drożdży rozłożonego zapomocą *Tyrothrix tenuis*. Wady podobne wykazuje wiele innych bakterij (Zentralblatt für Bakteriologie, część II, tom XXIII, str. 385 — 568); wymagają one przede wszystkim uprzedniego rozkładu białka całego materiału fermentacyjnego zapomocą *Aspergillus oryzae* w

ciągu 3 — 4 dni, w celu uzyskania średniej wydajności przy małym stężeniu. Ponadto do wytwarzania butanolu i acetonu proponowano stosowanie bakterij odpornych na działanie gorąca (pat. niem. Nr 445982) prócz tego wcześniej nieco Schardinger wyosobnił bakterje typu *Saccharobutyricus mobilis non liquefaciens*, wytwarzające butanol (Zentralbl. f. Bakt., część II, tom XVIII, str. 748—767). Sposób ten nie jest doskonały, ponieważ utrudnia dobór najsprawniej działających bakterij. Jeśli np. 100 probówek, zawierających pożywkę 5% -go zacieru z mąki kukurydżowej, w temperaturze 90—100°C zaszczyć niewyjałowioną mąką kukurydzaną, to zostają zabite lub osłabione gatunki wrażliwe na działanie gorąca, pomiędzy którymi znajdują się gatunki technicznie najcenniejsze. Jeśli rurki te pozostawić przez kilka dni w warunkach odpowiednich do rozwoju bakterij, a następnie ogrzewać je, to właśnie hodowle, które wytworzyły największą ilość produktów fermentacji, a zatem zawierające bakterje o największej sprawności fermentacyjnej, zostają najprędzej osłabione lub zabite, ponieważ butanol w temperaturze wrzenia działa jako silny środek antyseptyczny; ogrzewanie mogą przetrwać tylko hodowle, zawierające mało bakterij sprawnie działających, które zatem wytworzyły tak mało produktów fermentacji (butanolu), że ich antyseptyczne działanie w temperaturze wrzenia nie wystarcza do zabicia bakterij. W rzeczywistości regresywna ta metoda selekcyjna prowadzi do otrzymywania bakterij bardzo wrażliwych na zakażenie i mogących przefermentowywać jedynie zacier o słabym stężeniu (np. 5—8% kukurydzy; Industrial and Engineering Chemistry, październik 1927, str. 1147) z wydajnością około $\frac{1}{3}$ zawartości skrobi w materiale fermentacyjnym. Dlatego też i te sposoby są kosztowne i wadliwe.

Obecnie wykryto, że do otrzymywania

szczególnie sprawnych hodowli wywołujących fermentację, odpornych na działanie produktów fermentacji, nadaje się opisana poniżej metoda selekcyjna, ponieważ umożliwia ona otrzymywanie bakterij mało wrażliwych na zakażenie, które przy wysokim stężeniu materiału fermentacyjnego dają znacznie większe wydajności, niż według dotychczas znanych sposobów, oraz mogą przefermentowywać surowce dowolnego pochodzenia, t. j. posiadają wszelkie zalety drożdży gorzelnianych. Sposób według wynalazku polega na tem, że do próbki zacieru, przeznaczonej do selekcji, dodaje się produkt, jaki zamierza się otrzymać przez fermentację. Ten dodatek selekcyjny zapobiega rozwojowi bakterij, wrażliwych na jego działanie, natomiast sprzyja rozwojowi gatunków, mogących wytwarzać żądany produkt. Przez odpowiednie stężenie dodatku selekcyjnego można zapobiec rozwojowi mniej sprawnych gatunków odpornych tylko na słabsze stężenia tego produktu, oraz przyspieszyć rozwój odmian odpornych na wyższe stężenia produktu fermentacji, a przytem zdolnych do wytwarzania tego produktu w wysokich stężeniach, bez szkody dla dalszego przebiegu procesu fermentacji. Ponieważ sposób ten nie wymaga stosowania wysokiej temperatury, zapewnia on przeto otrzymywanie szczególnie sprawnych, wrażliwych na gorąco odmian. Samoczynnie przebiegający dobór uzupełnia się jeszcze przez systematyczny wybór i przeszczepianie bakterij szczególnie sprawnych, przy jednoczesnym wyłączaniu odmian nieodpowiednich znanimi metodami bakterjologicznymi.

Ponadto w przeciwieństwie do stosowania czystych hodowli oraz ich mieszanin symbiotycznych korzystne jest stosowanie takich kultur mieszanych, których drobnoustroje żyją w pseudosymbiozie i w metabiozie, t. j. obok siebie, jednakże nie zawsze muszą sobie towarzyszyć (pseudosymbioza) i mogą nawzajem przerabiać dalej swe

produkty rozkładu oraz przemiany materji (metabioza). Korzystne jest również całkowite stosowanie hodowli lub większej ich części nie w stanie zawieszonym lub związanym z materiałami niestrawnymi, lecz wiązanie ich ze stałymi, biochemicznie strawnymi nośnikami (np. cząstkami roślin), które zresztą mogą się swobodnie poruszać, wskutek czego powstaje t. zw. mikropłankton. W roztworach bakterje posiadają się tylko materiałami rozpuszczonymi, natomiast w mikropłanktonie mają również materiały nierozpuszczone, zwłaszcza substancje białkowe, umożliwiające wyzyskanie wszystkich fermentów bakterieryjnych, a dzięki temu zapewniające większy efekt fermentacji.

Według sposobu stanowiącego przedmiot niniejszego wynalazku stosuje się wyłącznie bakterje lub mieszane hodowle pseudosymbiotyczne, odporne w wysokim stopniu na produkty fermentacji, a otrzymywane zapomocą metody selekcyjnej, która polega na tem, że bakterjami, znajdującymi się na nośnikach naturalnych (ziemia, nawóz, ziarna zbożowe) zasiewa się wraz z naturalnymi ich nośnikami próbki zacieru, zmieszane z produktem fermentacji w charakterze dodatku selekcyjnego, następnie zaszczepione na zacierze bakterje hoduje się, poczem wybiera takie próbki, które fermentują najsilniej i zawierają bakterje o normalnym wyglądzie i posiadają nieziarnistą protoplazmę. Najwłaściwiej stosować jest takie próbki, które wykazują zaczątki powstawania planktonu, przy czem w razie potrzeby przeszczepia się wybrane najsilniej fermentujące próbki zacierowe na świeże także próbki, zmieszane z tym samym dodatkiem selekcyjnym, powtarza hodowanie zaszczepionych bakterij i prowadzi w ciągu dalszym w tych samych warunkach ich selekcję oraz przeszczepianie, aż do uzyskania jednakowych technicznie wydajnych hodowli, odpornych na produkty fermentacji.

Jeśli przy otrzymywaniu czynników, wzbudzających fermentację, postępować zgodnie z wyłożonymi zasadami (unikanie ogrzewania, stosowanie produktu fermentacji — jako dodatku selekcyjnego, pseudosymbioza, metabioza, mikropłankton) to, jak się okazało w porównaniu z dotychczasowymi sposobami, osiąga się następujące zalety przy prowadzeniu procesów fermentacyjnych oraz innych procesów biochemicznych.

1. Otrzymane hodowle są bardzo odporne na wpływy zewnętrzne. Np. zarazki zostają natychmiast zaatakowane, a ich działanie infekcyjne odrazu na początku stłumione.

2. Zmieniając odpowiednio ilość dodatku selekcyjnego, można otrzymać pobudzające fermentację czynniki o różnej zdolności fermentacyjnej, reprezentujące obszerną skalę naturalnych procesów rozszczepiania i utleniania, i mogące pod względem ilościowym oraz jakościowym w dużym stopniu wpływać na przebieg procesów biochemicznych. Dzięki temu umożliwiające jest również racjonalne prowadzenie tych procesów w celu otrzymywania zupełnie określonych produktów oraz zwiększone wytwarzanie tychże kosztem innych niepożądanych produktów.

3. Dzięki metabiotycznym właściwościom wywołujących fermentację hodowli, otrzymywanych metodą Bakony'iego, nieużyteczne produkty fermentacji usuwa się albo przekształca w pożyteczne.

4. Dzięki bez porównania większej sprawności tych wzbudzających fermentację hodowli czas trwania fermentacji jest bardzo krótki.

5. Odporność przeciwko produktom fermentacji, nabyta dzięki tej metodzie selekcyjnej, jak również związane z metabiozą usuwanie szkodliwych produktów przemiany materji zapewniają utrzymywanie znacznie wyższych stężeń, niż przy dotychczasowych sposobach, ponieważ, jak wia-

domo, te szkodliwe produkty przemiany materji powodują częstokroć przedwczesne zakończenie procesów biochemicznych.

Przy prowadzeniu innych (niż procesy fermentacyjne) procesów biochemicznych zastosowanie wyżej opisanych zasad zapewnia te same korzyści.

Przykład I. Naturalne nośniki bakteryj (części roślin, humus, wydzieliny zwierząt roślinożernych i t. d.) zalewa się wodą z wodociągu lub wyjałowionym zacierem, po czem dodaje się niewielką ilość, np. 1 do 2% środka chemicznego, najlepiej produktu fermentacji, który zamierza się otrzymać w drodze fermentacji, a więc np. butanolu. (Jeśli zapomocą fermentacji ma się otrzymać kilka produktów, to można dodawać mieszaninę tych produktów, zamiast produktu pojedynczego). Dodatek ten zapobiega rozwojowi wszystkich bakteryj nieodpornych na działanie butanolu. Próbkę materiału posiadanego hoduje się w ciągu mniej więcej 24 godzin. Można przytem stosować temperatury do 70°C, najodpowiedniejsze są jednak temperatury od 28° — do 38°C. Po 24 godzinach wszystkie przefermentowane próby stanowią mieszaninę rozmaitych odpornych na działanie butanolu bakteryj, które w dalszym ciągu opisu nazywać się będą „florą butanolową” użytego naturalnego nośnika bakteryj. Wszystkie te próbki bada się następnie pod mikroskopem i wyłącza wszystkie te, w których drobnoustroje stanowią w większej ilości mocno zdegenerowane (ziarniste lub zniekształcone) indywidua. Do dalszego użytku stosuje się tylko takie „próbki flory”, których bakterje posiadają jednorodną protoplazmę i kształty normalne — dwie cechy świadczące o tem, że rozmaite gatunki mogą przynajmniej istnieć obok siebie. Przy powtórnem badaniu mikroskopowem wybiera się próbki flory, w których bakterje wykazują dążność do tworzenia zespołów planktonowych.

Temi próbkami flory zaszczenia się wy-

jałowione próbki zacieru, zawierające również 1 — 2% stosowanego dodatku selekcyjnego. Uprzedniego ogrzewania tych prób, stosowanego przy pewnych dotychczasowych sposobach hodowania (np. pat. niem. Nr 445982) należy starannie unikać, ponieważ, jak się okazało, prowadzi ono do osłabiania, a nawet zabicia bardzo ważnych gatunków wrażliwych na gorąco, oraz do całkowitego zniszczenia załączków planktonu. Zaszczepione na zacierz bakterje hoduje się ponownie przez 24 godziny, po czem powtarza się wyżej opisany mikroskopowy wybór według normalnego wyglądu oraz intensywności i częstości tworzenia planktonu. Wybrany materiał szczepi się dalej w taki sam sposób na próbkach wyjałowionego zacieru z dodatkiem selekcyjnym, i przefermentowane próby wybiera się znowu pod mikroskopem. Zabiegi te powtarza się aż do otrzymania hodowli, wyglądających zupełnie normalnie i wykazujących silną dążność do tworzenia planktonu.

Przy pomocy tych hodowli uskutecznia się doświadczenia fermentacyjne, przy czem do zacieru dodaje się uprzednio również około 1 — 2% dodatku selekcyjnego. Następnie z pośród prób zacierowych wybiera się te, które przefermentowały najszybciej i w odpowiedni sposób określa się np. zapomocą destylacji jednej z tych próbek, pobranej aseptycznie, najwyższą zawartość w nich żądanych produktów fermentacji, w tym przypadku butanolu. Te próby fermentacji stosuje się do dalszych prób fermentowania, i doświadczenia te powtarza się aż do osiągnięcia największej wydajności w najkrótszym czasie fermentowania.

Następnie stopniowo obniża się stężenie dodatku selekcyjnego, aż wyżej wspomniany cel da się osiągnąć zupełnie bez dodatku selekcyjnego.

Wreszcie stężenie zacieru przeznaczonego do fermentacji, zwiększa się, dopóki

to jest możliwe, bez obniżenia wydajności i bez przedłużenia czasu trwania fermentacji.

Ostateczny wynik selekcji można oczywiście jeszcze spotęgować przez dalsze wydzielanie hodowli mniej odpornych na zakażenie.

Przykład II. Drogę selekcyjną, podaną w przykładzie I, można skrócić w sposób następujący.

Otrzymaną florę, np. powyższą florę butanolową, przerabia się dalej zapomocą jakiegokolwiek metody bakterjologicznej, np. metodą płytkową, t. j. poszczególne kolonie, znajdujące się na płytkach bada się w obecności środka selekcyjnego, stosowanego do przygotowania danej flory, na ich sprawność w wyjałowionych próbach zacierui tylko bardzo wydajne hodowle poddaje się w razie potrzeby dalszym zabiegom selekcyjnym.

Przykład III. Prowadzenie fermentacji rozszczepiającej w celu otrzymywania etanolu, propanolu, izopropanolu, butanolu, izobutanolu, acetonu i t. d. lub ich mieszanin zapomocą hodowli, otrzymanych według przykładów I i II odbywa się w następujący sposób:

Rozdrobnione materiały, zawierające skrobię lub cukier, zawiesza się w wodzie, przyczem można zachować zwykłe stężenie stosowane w gorzelniach. Skrobię żelatynuje się przez gotowanie i ochładza do temperatury odpowiedniej do selekcji hodowli fermentacyjnej. Następnie dodaje się hodowlę fermentacyjną, wywołującą silną fermentację, która kończy się najpóźniej po 40 godzinach. Otrzymywanie produktów uskutecznia się w drodze destylacji. Przy stężeniu np. 12 — 15% kukurydzy (z 60% skrobi) wydajność alkoholi i ketonów wynosi 40 — 45% użytej skrobi.

Roztwory cukrowe (np. melasę) zadaje się papką roślinną, aby umożliwić tworzenie się planktonu.

Przykład IV. Aby wywołać fermentację utleniającą, należy zmienić opisaną metodę selekcyjną, dodając wolny kwas organiczny (mlekowy, masłowy, octowy), zależnie od rodzaju żadanego produktu. Prócz tego powstający kwas zobojętnia się kredą, wodą, amonjakiem i t. d. skoro stężenie tego kwasu przekroczy 2%.

Wolny kwas, dzięki temu zawsze obecny, działa jako swoisty dodatek selekcyjny i prowadzi do otrzymywania hodowli wysokoodpornych na działanie kwasów. Przy prowadzeniu procesu otrzymywania kwasów organicznych dodaje się taką utleniającą hodowlę do zacieru i zobojętnia stale wytwarzający się kwas, skoro stężenie jego przekroczy 2%. Praca aseptyczna jest tu zbyteczna, ponieważ hodowle otrzymane opisaną metodą selekcyjną są bezwzględnie odporne na zakażenie. Wytworzone kwasy uwalnia się i uzyskuje w stanie czystym w sposób zwykły.

Zastrzeżenia patentowe.

1. Sposób prowadzenia procesów biochemicznych, a zwłaszcza procesów fermentacyjnych, zapomocą bakterij wytwarzających alkohole, względnie kwasy, lub zapomocą hodowli mieszanych tychże bakterij, znamienny tem, że stosuje się wyłącznie bakterje lub hodowle mieszane pseudosymbiotyczne, o wysokiej odporności względem produktów fermentacji, które otrzymuje się zapomocą metody selekcyjnej, polegającej na tem, że próby zacierowe, zawierające produkt fermentacji w charakterze dodatku selekcyjnego, zasiewa się bakterjami wraz z naturalnymi nośnikami tych bakterij i następnie hoduje zaszczerpione próby zacierowe, fermentujące najsilniej i zawierające wyglądające normalnie bakterje o nieziarnistej protoplazmie oraz wykazujące dążność do tworzenia planktonu.

2. Sposób według zastrz. 1, znamien-

ny tem, że wybrane fermentujące najsilniej próby zacierowe przeszczepia się na świeże próby zacierowe, zmieszane z tym samym dodatkiem selekcyjnym, ponownie je hoduje i uskutecznia dalej selekcję oraz ponowne przeszczepianie w tych samych warunkach aż do uzyskania jednakowych

technicznie wydajnych hodowli o wysokiej odporności na produkty fermentacji.

Deutsche Hydrierwerke
Aktiengesellschaft.
Zastępca: M. Skrzypkowski,
rzecznik patentowy.