

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24.10.2006**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **09.07.2008**  
(Věstník č. 28/2008)

(21) Číslo dokumentu:

**2006-675**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| <i>C12N 11/04</i> | (2006.01) |
| <i>B01J 37/36</i> | (2006.01) |
| <i>C08L 29/04</i> | (2006.01) |
| <i>C08J 3/075</i> | (2006.01) |
| <i>C02F 3/34</i>  | (2006.01) |
| <i>C12P 1/04</i>  | (2006.01) |
| <i>C12P 7/06</i>  | (2006.01) |
| <i>C12P 7/56</i>  | (2006.01) |
| <i>C12N 9/34</i>  | (2006.01) |
| <i>C12N 9/26</i>  | (2006.01) |
| <i>C12N 9/38</i>  | (2006.01) |
| <i>C12N 9/00</i>  | (2006.01) |
| <i>C12M 1/40</i>  | (2006.01) |

(71) Přihlašovatel:

LentiKat's a.s., Praha 6, CZ

(72) Původce:

Stloukal Radek Ing. Ph. D., Česká Lípa, CZ  
Rosenberg Michal Doc. Ing. CSc., Bratislava, SK  
Rebroš Martin Ing. Ph.D., Čadca, SK

(74) Zástupce:

DADEJ, GHEORGHU, KENDEREŠKI Patentová a  
známková kancelář, Ing. Dušan Kendereški, Lidická 51,  
Brno, 60200

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob průmyslové výroby biokatalyzátorů s  
biologicky aktivním materiálem ve formě  
imobilizovaných enzymů nebo  
mikroorganismů, které jsou imobilizovány v  
polyvinylalkoholovém gelu a jejich použití a  
zařízení k jejich výrobě**

(57) Anotace:

Způsob průmyslové výroby biokatalyzátorů s biologicky aktivním materiálem ve formě imobilizovaných enzymů nebo mikroorganismů, které jsou imobilizovány v polyvinylalkoholovém gelu, spočívá v tom, že se použije aktivní biologický materiál tvořený směsí volného nativního, nebo předem upraveného agregovaného enzymového katalyzátoru, nebo produkčního mikroorganismu, anebo jejich částí a polyvinylalkoholového gelu, poté se tato směs želíruje a tvaruje se zřetelem k rozměru biokatalyzátoru při zachování poměru jeho objemu a plochy v proudě sušícího vzduchu v teplotním rozmezí 80 až 15 °C, a následně se takto vyrobené biokatalyzátory mohou kultivovat nebo skladovat. Poté se použijí v biotechnologických procesech za podmínek zaručujících danému biotechnologickému procesu vyšší produktivitu, vyšší produkční a enzymatickou stabilitu, dlouhodobé a opakované použití, či definovatelné řízení procesu s následnou snadnou separací biokatalyzátoru. Produkční průmyslové zařízení umožňuje optimalizaci objemu a plochy biologického nosiče v závislosti na rozměrech biologicky aktivního materiálu obsahuje licií mechanismus uspořádaný před sušícím kanálem (2), kterým prochází nekonečný nosný pás (1), a je opatřeno alespoň jednou licií hlavou (17) opatřenou dvěma řadami liciích jehel, která je

napojena na tlakový temperovaný zásobník (15) a kompresor (16), nosným pásem (1) a systémem sušení, jenž tvoří zdroj (4) sušícího vzduchu prostřednictvím ventilátoru dopravovaného do vzduchotechnického rozvodu (6) s vřazenými topnými tělesy (5) a ústícím do horního sušícího kanálu (2), dále dolním dosušovacím kanálem (3) a rebotovací vanou (7), mezi nimiž je uspořádáno stírací a sběrné zařízení (9) konstruované na principu mechanického stírání a vysokotlakého ostříku, jež je spojeno potrubím s vřazeným vysokotlakým čerpadlem (10) a nízkotlakým čerpadlem (11) a ústícím do sběrné vany (8) s chlazením a dále oplachový box (13) pro očišťování nosného nekonečného pásu (1) pomocí trysek napojených na nízkotlaké čerpadlo (14), jež je spojeno pomocí potrubí s oplachovou vanou (12).

Způsob průmyslové výroby biokatalyzátorů s biologicky aktivním materiálem ve formě imobilizovaných enzymů nebo mikroorganismů, které jsou imobilizovány v polyvinylalkoholovém gelu a jejich použití a zařízení k jejich výrobě

#### Oblast techniky

Vynález se týká způsobu průmyslové výroby biokatalyzátorů s biologicky aktivním materiálem ve formě imobilizovaných enzymů nebo mikroorganismů, které jsou imobilizovány v polyvinylalkoholovém gelu, jejich použití a dále produkčního průmyslového zařízení umožňujícího optimalizaci objemu a plochy biologického nosiče v závislosti na rozměrech biologicky aktivního materiálu obsahujícího lici mechanismus uspořádaný před sušícím kanálem, kterým prochází nekonečný nosný pás.

#### Dosavadní stav techniky

Je známo zapouzdření (enkapsulování) mikrobakterií za použití polyvinylalkoholového nosiče nebo polyuretanového nosiče. V CZ patentu 249 179 je popsán způsob výroby biokatalyzátoru s biologicky aktivním materiálem ve formě mikroorganismů, enzymů, spor a/nebo buněk, který je uložen v polyvinylalkoholovém gelu (v dalším textu uváděný ve zkráceně formě PVA - gelu). PVA-gel, jako gelový nosič pro biologický aktivní materiál se skvěle hodí pro výrobu chemických nebo biologických katalyzátorů. Gelové těleso zhotovené podle tohoto způsobu vykazuje oproti dříve známým gelovým tělesům vyšší mechanickou stabilitu, zejména pokud jde o odolnost vůči otěru a pevnost v tahu. Výše jmenované lepší mechanické vlastnosti umožňují zhotovení gelového tělesa v reakčně kineticky vhodné formě čočkovitého tvaru. Takto zhotovené gelové těleso je oproti dříve známým gelovým tělesům více než několik měsíců stabilní a odolné vůči otěru dokonce při vysokootáčkovém míchání. Čočkovitý tvar vyznačující se velkým průměrem a malou výškou způsobuje to, že je fyzikálně, chemicky nebo biologicky aktivní materiál vždy umístěn blízko povrchu, což má za důsledek jeho reakčně a kineticky výhodné uspořádání. Jsou známy biotechnologické procesy, které využívají PVA-gel jako nosiče biologicky aktivního materiálu.

Známá jsou použití výše jmenovaných nosičů v procesu odstraňování dusíku z odpadních vod. Takováto použití jsou popsána, např. v EP0758680 (porézní celulóзовé deriváty), WO09508513 (polyvinylalkohol, vermikulit, polyuretan) a CN1076488 (polyvinylalkohol). Uvedené nosiče jsou používány (většinou) jednak k imobilizaci aktivovaného kalu, který bývá často předtím různými postupy obohacován zejména nitrifikačními bakteriemi (viz např. procesy PEGASUS nebo PEGAZUR), ale také přímo k imobilizaci čistých nitrifikačních a denitrifikačních bakterií. V odborné literatuře se uvádí, že velmi důležitou charakteristikou nosiče je velikost jeho specifického povrchu vzhledem k objemu reaktoru, resp. objemu zpracovávaných odpadních vod. Tento parametr totiž přímo souvisí s velikostí reaktoru a dobou zdržení odpadních vod v reaktoru, neboť to lze ovlivnit zejména do reaktoru vloženým množstvím (resp. hmotností nebo objemem) nosiče s daným specifickým povrchem. Například proces odstraňování dusíkatého znečištění pomocí imobilizovaných bakterií do polyethylenglykolového (PEG) nosiče ve tvaru tablet s geometrickými rozměry  $S/V = 3$  a  $2$  umožňuje dosažení rychlosti odstraňování dusíku  $0,34$  až  $1,14 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{den}$  při obsahu  $2 \%$  w/v vlhké biomasy aktivovaného kalu v nosiči. (T. Sumino, H. Nakamura, N. Mori, Y. Kawaguchi: Immobilization of Nitrifying Bacteria by Polyethylene Glycol Prepolymer, Journal of Fermentation and Bioengineering, 73(1), 37-42, 1992.)

Zejména z ekonomických důvodů je však stejně důležitým parametrem velikost specifického (geometrického) povrchu nosiče vzhledem k jeho objemu, resp. jeho tvar a rozměry. Pro odstraňování dusíku z vod pomocí imobilizovaných buněk jsou dosud používány nosiče, jejichž tvar se blíží buď kouli a nebo válci, ve kterém průměr ( $d$ ) podstavy a výška ( $v$ ) mají řádově stejnou hodnotu. Nejmenší hodnoty rozměru nosiče pro odstraňování dusíku z vod jsou  $1 \text{ mm}$ . Obvykle používané nosiče mají rozměry cca  $3 \text{ mm}$ , tzn., že hodnota poměru povrchu a objemu nosiče ( $S/V$ ) nabývá hodnot cca  $2$  až  $6 \text{ mm}^{-1}$ . Použijeme-li nosič ve tvaru čočky nebo pásku, pak můžeme použít ve srovnání se stávajícími procesy využívajícími imobilizované buňky k odstraňování dusíkatých sloučenin z pitných, užitkových a odpadních vod méně biokatalyzátoru, a to při stejné nebo větší intenzitě procesu.

Dalším variantním použitím gelového nosiče v biotechnologických procesech je jeho použití při způsobu výroby kyseliny mléčné. Tato organická kyselina má široké uplatnění zejména v potravinářství, farmaceutickém a chemickém průmyslu a dalších

odvčtvích. Kyselinu mlččnou produkuje množství mikroorganismů, především však vláknité houby a bakterie. Z vláknitých hub patří mezi dobré producenty kyseliny mlččné *Rhizopus arrhizus*, resp. *oryzae*. Jejich nespornou výhodou oproti bakteriím je, že produkují jenom kyselinu L(+). Režim fermentace je však aerobní (vysoké nároky na přípravu sterilního vzduchu). Aerobní režim u vláknitých hub může být výhodou v případě přímé přípravy vápenatých solí kyseliny mlččné, kdy u bakterií může docházet k prodlužování fermentace a snižování výtěžků v důsledku neúčinné neutralizace (slabé míchaní) v případě uhličitanu vápenatého (Mattey M.: *Critical Reviews in Biotechnology* 12, 87-132, 1992).

Výhodou bakteriální fermentace je anaerobní režim fermentace, což se odráží v jednoduchosti kultivačních zařízení a nižších nárocích na sterilitu. Na průmyslovou produkci se používají především bakterie rodu *Lactobacillus*, které při teplotách 30-40°C konvertují sacharidický substrát (glukóza, sacharóza, laktóza) na kyselinu mlččnou s různým obsahem L(+)-, D(-)- a DL-formy kyseliny podle vlastností producenta

Imobilizace mikroorganismů uzavřením (enkapsulací) do gelových nosičů je jedna z metod, která umožňuje zkoncentrování biomasy v reaktoru bez toho, aby ve vykvašeném médiu došlo k nárůstu biomasy. Tato technika spočívá v uzavření buněk do kapsulí přírodních nebo syntetických gelů. Buňky musí být větší než póry nosiče, aby na jedné straně nedošlo k uvolňování buněk, ale zároveň aby byla zajištěná volná difúze substrátu a produktů k enkapsulovaným buňkám.

Dosud je známa imobilizace mlččných bakterií do různých nosičů. Z přírodních gelů jsou to hlavně karagenany, pektáty, algináty a pod. (Norton, S. a kol.: *Enzyme Microbial Technol* 16, 457-466, 1994; Richter, K. a kol.: *Acta Biotechnol.* 11, 229-341, 1991; Yan, J. a kol.: *Chem.Biochem.Eng. Q.* 15 (2), 59-63, 2001), ze syntetických nosičů je to polyakrylamid, (Tuli, A. a kol.: *Enzyme Microbial Technol.* 7, 164-168, 1985). Imobilizáty jsou produkované ve formě kuliček o průměru 3 až 5 mm, většinou kapáním příslušného gelu do vytvrzovacího roztoku. Nevýhodou těchto postupů je, že při kuličkovém tvaru imobilizátů dochází k difúzním limitacím uvnitř kuliček. Nedochozí k využití celého objemu gelu a mikroorganismus proto roste jen těsně pod povrchem kuličky.

Vhodným způsobem imobilizace je i uzavření mlččných bakterií do polyvinylalkoholového gelu. Ten má v porovnání s jinými nosiči vícere výhody. Je hlavně levný, pro mikroorganismus netoxický, biologicky minimálně odbouratelný, má

výborné fyzikálně-mechanické vlastnosti, nemá vedlejší účinky na mikroorganismus a vykazuje dlouhodobou stabilitu (Pat DE 198 27 552.8). Navíc, imobilizace buněk způsobem podle výše uvedeného vynálezu je šetrná k produkčnímu mikroorganismu (zabezpečuje vysokou viabilitu mikroorganismu po imobilizaci, vysoký počet imobilizací přežívajících mikroorganismů), protože síťování matrice se provádí v proudu sušícího vzduchu a nahrazuje tak doposud využívané postupy síťování vymrazováním (Pat.DE 43 27 923 ) nebo vytvrzováním v systému s kyselinou boritou (Pat U.S. 5 290 693). Navíc tvar imobilizátů zaručuje optimální využití celého objemu nosiče pro růst mikroorganismu a produkci kyseliny mléčné. Imobilizáty připravené tímto způsobem se mohou používat opakovaně ve vsádkovém, semikontinuálním a kontinuálním režimu fermentace.

Je všeobecně známo, že na produkci etanolu se tradičně používají kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, případně jiné kvasinkovité mikroorganismy, které dokáží konvertovat glukózu a jiné sacharidy na etanol v procesu fermentace. Tyto fermentace jsou základem produkce piva, vína, ale také produkce etanolu pro průmyslové, potravinářské a palivové účely. V posledním období můžeme pozorovat rostoucí zájem o technologie, které používají bakterie jako producenty etanolu. Mezi bakteriální producenty etanolu patří i *Zymomonas mobilis*. Jedná se o gram-negativní, fakultativně anaerobní mikroorganismus. V porovnání s kvasinkami má vícero výhod: rychlejší růst biomasy (ale celkově nižší produkci biomasy), vyšší specifickou rychlost utilizace substrátu a tvorby produktu, nepotřebuje kontrolovaný přívod kyslíku, produkuje méně vedlejších metabolitů. Glukózu a fruktózu metabolizuje Entner-Doudoroffovou dráhou, která je většinou přítomná u aerobních mikroorganismů. V této metabolické dráze je jeden mol glukózy konvertovaný na 2 moly etanolu, 2 moly CO<sub>2</sub> a jeden mol ATP. Tato metabolická dráha minimalizuje množství glukózy přeměněné na biomasu a zvyšuje tak etanolovou produkci. Reálný výtěžek (g etanolu/g glukózy) se u bakterií zvýšil na 0,49, u kvasinek je většinou 0,44).

Fermentace pomocí volných buněk *Zymomonas mobilis* může být uskutečněna ve vsádkovém, semikontinuálním i kontinuálním režimu (Rogers P.L., Tribe D.E.: Pat. U.S. 4403034; Rogers P.L., a kol., Pat. U.S. 4443543; Salzbrunn W., a kol, Pat. U.S. 4876196; Bu'lock J. D., Pat GB 2075053).

Dosud se pozornost ve výzkumu především soustředila na zvýšení produktivity mikroorganismu a na modifikaci uspořádání fermentačních zařízení s různými inovacemi jako např. recyklem buněk, použitím flokulujících mikroorganismů atd. (Arcuri E.J., a kol., Pat. U.S. 4413058; Rogers P.L., a kol., Pat. U.S. 4443544).

Produkt fermentace (etanol) se hromadí v tekutém médiu a izoluje se téměř výhradně destilací. Bez ohledu na uspořádání a použitou technologii je při izolaci produktu žádoucí, aby byl značně zredukován obsah biomasy sedimentací, centrifugací, filtrací a pod. Zvýšený obsah nerozpustného podílu zvyšuje energetické nároky na destilaci, způsobuje technologické problémy (zanášení destilačních aparatur, pění apod.), zvyšuje nároky na údržbu a může ovlivňovat i kvalitu produktu. Na druhé straně však produkce etanolu musí být maximálně efektivní. Rychlost produkce etanolu je přímo úměrná množství biomasy ve fermentoru. To znamená, že za konstantních podmínek má zvýšení obsahu biomasy za následek snížení času potřebného na produkci daného množství etanolu.

Imobilizace mikroorganismů uzavřením (enkapsulací) do gelových nosičů je jedna z metod, která umožňuje zkoncentrování biomasy v reaktoru bez toho, aby ve vykvašeném médiu došlo k nárůstu biomasy. Tato technika spočívá v uzavření buněk do kapsulí přírodních nebo syntetických gelů. Buňky musí být větší než póry nosiče, aby na jedné straně nedošlo k uvolňování buněk, ale zároveň aby byla zajištěná volná difúze substrátu a produktů k enkapsulovaným buňkám.

Dosud je známa imobilizace bakterií rodu *Zymomonas* do různých nosičů. Z přírodních gelů jsou to hlavně karagenany a algináty (Cheetham P.S.J., Pat. U.S. 4393136; Chibata I., Pat. U.S. 4350765; Kikuta M., Pat. U.S. 5990191; Yamada T., a kol., Pat. U.S. 4680263), ze syntetických nosičů je to polyakrylamid (Yamada T., a kol., Pat. U.S. 4680263; Cheetham P.S.J., Pat. U.S. 4393136). Imobilizáty jsou produkovány většinou ve formě kuliček o průměru 3 až 5 mm, většinou kapáním příslušného gelu do vytvrzovacího roztoku. Nevýhodou tohoto přístupu je, že při tomto tvaru imobilizátu dochází k difúzním limitacím uvnitř kuliček. Nedochozí k využití celého objemu nosiče a mikroorganismus proto roste jen těsně pod povrchem nosiče-kuličky a nevyužívá celý objem matrice.

Vhodný způsob imobilizace je uzavření bakterií *Zymomonas mobilis* do polyvinylalkoholového gelu. Ten má v porovnání s jinými nosiči vícero výhod. Je hlavně levný, pro mikroorganismus netoxický, biologicky obtížně odbouratelný, má výborné fyzikálně-mechanické vlastnosti, nemá vedlejší účinky na mikroorganismus

5.  $\frac{1}{2} \log 5$  (1.000)

a vykazuje dlouhodobou stabilitu (Pat. DE 198 27 552.8). Navíc, imobilizace buněk způsobem podle výše uvedeného vynálezu je šetrná k produkčnímu mikroorganismu (zabezpečuje vysokou viabilitu mikroorganismu po imobilizaci, vysoký počet přežívajících mikroorganismů), protože síťování matrice se provádí v proudu sušícího vzduchu a nahrazuje tak doposud využívané postupy síťování vymrazováním (Pat. DE 43 27 923 ) nebo vytvrzováním v systému s kyselinou boritou (Pat. U.S. 5 290 693). Navíc čočkovitý tvar imobilizátů zaručuje optimální využití celého objemu nosiče pro růst mikroorganismu a produkci etanolu. Imobilizáty připravené tímto způsobem se mohou používat opakovaně ve vsádkovém, semikontinuálním a kontinuálním režimu fermentace.

Při použití kulovitěho tvaru imobilizátu, produktivita etanolu pomocí *Zymomonas mobilis* imobilizovaného do karagenanu byla na 10% hmotnostních glukozovém médiu, v 500 ml vsádkovém reaktoru s plněním 20 ml imobilizátů s průměrem imobilizátu 4 mm a teplotě 30°C byla 77 mg<sub>etanol</sub>/ml<sub>gel</sub>/h (Chibata I., Pat. U.S. 4350765). Při imobilizaci producenta do alginátu sodného, přičemž vlhká váha buněk v imobilizátu tvořila 20 % ww/v (ww – vlhká váha buněk, odpovídá 1/5 váze suchých buněk), byla produktivita ve vsádkovém systému za stejných podmínek 0,49 g<sub>etanol</sub>/g<sub>ww</sub>/h, což po přepočtu odpovídá 98 mg<sub>etanol</sub>/ml<sub>gel</sub>/h a v kontinuálním režimu 0,47 g<sub>etanol</sub>/g<sub>ww</sub>/h, což po přepočtu odpovídá 94 mg<sub>etanol</sub>/ml<sub>gel</sub>/h (Cheetham P.S.J., Pat. U.S. 4393136).

Dalším variantním použitím gelového nosiče v biotechnologických procesech je jeho použití při způsobu výroby glukózy a fruktózy ze sacharózy pomocí imobilizovaného enzymu invertázy. Sacharóza je zásobní disacharid přítomný hlavně v cukrové řepě a cukrové třtině. Používá se v potravinářském průmyslu a také jako substrát ve fermentačních procesech. Je složena z monosacharidů glukózy a fruktózy. Sacharóza tyto monosacharidy poskytuje hydrolýzou, například pomocí enzymatické hydrolýzy pomocí enzymu invertáza. Jejím působením vzniká směs glukózy a fruktózy (invertní cukr), která má v porovnání s nehydrolyzovanou sacharózou vícero výhod: sníženou tvorbu krystalových zákalů, vyšší sladivost, využitelnost ve fermentačních procesech.

V průmyslové praxi se na hydrolýzu sacharózy používají enzymové preparáty invertázy, která není recyklovatelná. Proto se enzym stává jednou z největších ekonomických položek při výrobě glukózovo-fruktózových sirupů. Vhodná imobilizace

tohoto enzymu umožňuje jeho vícenásobné použití, navíc s možností celý proces výroby kontinualizovat a tím jej výrazně zefektivnit. Nejvíc používanou technikou je cross – linking (síťování). Jako síťovací činidlo se používá hlavně polyamid (Sou M. a kol. JP58086085, Rohrbach R.P. a kol. US 426842), glutaraldehyd (Lee D.M a kol. US 4749653), polymery s volnými karboxylovými skupinami (Mauz O. US 4767620), polymery s epoxidovými skupinami (Mauz O. US 4931476), imobilizace do foto-síťovacích živic (Kunihiro I. JP55023941) a ukotvení na různé matrice prostřednictvím síťujícího činidla jako je imobilizace na skleněné kuličky pomocí glutaraldehydu (Toshiyuki Y. a kol. JP58179494). Dalším způsobem je kovalentní uchycení invertázy na silikagelové částice pomocí glutaraldehydu (Thibault P.A. EP 0231668), kovalentní vazbou pomocí disulfidových můstků na organické a anorganické nosiče (Cormier R.A. a kol. US 4176006), kovalentním vázáním pomocí organosilanu (Ho G.H. a kol. US 4384045), kovalentním vázáním pomocí dialdehydu na celulóзовé a ligninové materiály (Monsan P. US 4405715) kovalentním vázáním na dialkylaminoalkyl celulózu (Lapins Ch. D. A kol. US 4933284). Invertáza byla imobilizovaná i adsorpcí např. na matici z živočišných kostí (Findlay Ch. J. US 5037749). Dalším způsobem je uzavření buňkových lyzátů s vysokou invertázovou aktivitou do alginátového gelu (Obana H. a kol. JP 57163484, Chang H. N. a kol. US 5766907) anebo do polyuretanových polymerů (Hartdegen F.J. a kol. US 4098645). Praktické využití mají též kombinované techniky, jako např. adsorpce enzymu na polyethyleniminem opračovanou bavlnu a následně síťování glutaraldehydem (Yamazaki H. a kol. CA1203187).

Velmi dobrou alternativou se jeví použití PVA (polyvinylalkoholového gelu). Invertáza byla úspěšně imobilizovaná do nosiče s tuhým jádrem obaleným do PVA gelu (Yamamoto H. a kol. JP2005042037). Foto-síťovací PVA smíchaný s polyetylenglykolem byl také použit na kovalentní vazbu, uzavření invertázy (Ichimura K. JP 58152483, Suehiro T. a kol. JP 1252285, Izumida H. a kol. JP 1071491). PVA matrice může být síťována i kyselinou boritou, přičemž invertáza je uzavřena uvnitř gelu (Guocheng Ch. a kol. CN 1076488) anebo vysušením (Ishimura F a kol. US 4727030). Taktéž byly použity i další postupy v kombinaci se síťováním (Tsutsumi S. a kol. JP 2046288), anebo s přidavkem vynilacetátu (Moriya T. a kol. JP 56113290), vinylaminu (Moriya T. a kol. JP 56113292), anebo aminoacetalizovaný PVA (Yamauchi A. a kol. US 4307151).

Dalším variantním použitím gelového nosiče v biotechnologických procesech je jeho použití při způsobu výroby glukózy ze škrobu pomocí imobilizovaného enzymu glukoamylázy.

Škrob, zásobní výživná látka rostlin, je jedním z hlavních zdrojů glukózy v potravinářském i fermentačním průmyslu. Škrob se skládá ze dvou typů molekul: amylázy a amylopektinu. Amyláza např. u obilí tvoří 10% celkového škrobu. Obsahuje do 1 000 glukózových jednotek, spojených  $\alpha$ -1,4-glykosidovými vazbami. Zbývajících 90% je tvořené amylopektinem, který kromě  $\alpha$ -1,4-glykosidových vazeb obsahuje i  $\alpha$ -1,6-glykosidové vazby. Počet glukózových jednotek v řetězci je do 10 000.

Proces před úpravy škrobové suroviny pro využití ve fermentacích, je složen ze dvou kroků. V prvním kroku dochází pomocí endoenzymu  $\alpha$ -amylázy, která náhodně štěpí  $\alpha$ -1,4-glykosidové vazby, při vysoké teplotě k ztekutění škrobu. Touto reakcí dochází ke vzniku dextrinů a nižších oligosacharidů s různými délkami řetězců.

V druhém kroku jsou dextriny a oligosacharidy štěpené z neredukujícího konce exoenzymem glukoamylázou na glukózové jednotky. Glukoamyláza štěpí, jak  $\alpha$ -1,4-, tak i  $\alpha$ -1,6-glykosidové vazby.  $\alpha$ -1,6-glykosidové vazby však jsou hydrolyzované daleko nižší rychlostí. Rychlost hydrolyzy závisí i na délce řetězce.

V průmyslové praxi se na 1 tunu škrobu používá 1 až 1,2 l enzymového preparátu glukoamylázy, která však není recyklovatelná. Vhodná imobilizace tohoto enzymu by umožnila jeho vícenásobné použití, s možností celý proces kontinualizovat.

Velký pokrok byl udělán při imobilizaci tohoto enzymu pomocí síťování s činidlem, jako je polyamin (Symon a kol. U.S. 4415663, Lantero a kol. U.S. 5472861, DeFilippi U.S. 4343901, Rohrbach a kol. U.S. 4268423), glutaraldehyd (Lee a kol. U.S. 4749653, Nishimura a kol. U.S. 4888285, Rorvah a kol. K.R. 8601229), činidla akrylového anebo alylového typu (Boross a kol. U.S. 4794083, Selemenev a kol. RU 2204600), prostřednictvím kterých se enzym ukotví na matici anorganického anebo organického původu. Výhodné se zdá být i využití adsorpčních metod (Abdullah a kol. U.S. 4226937, Kumakura a kol. JP 61060700, Motai a kol. J.P. 59232092, Selemenev a kol. R.U. 2181770, Kimura a kol. J.P. 63056297), jako i membránových reaktorů s imobilizovanou glukoamylázou (Thomas a kol. U.S. 5130237). Enkapsulace, která biologický materiál uzavírá do struktury gelu a je využívána

hlavně pro imobilizaci mikroorganismů, při imobilizaci glukoamylázy úplně absentuje. Enzym bez zesíťování do větších struktur se totiž z pórů matrice lehce vymývá.

Dalším variantním použitím gelového nosiče v biotechnologických procesech je jeho použití při způsobu hydrolýzy laktosových roztoků, výroby D-galaktosy, D-glukosy a galaktooligosacharidů z roztoků laktosy pomocí imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy.

Disacharid laktóza se syntetizuje v mléčných žlázách většiny savců. Komerčně se vyrábí z kravského mléka (s obsahem laktózy 4,5-5 % hmot.) extrakcí ze syrovátky (Baldrick a Bamford, 1997). Laktóza obsažená v mléku a v mléčných výrobcích představuje důležitou výživovou složku. Podporuje růst *Bifidobacterium* sp., je zdrojem galaktózy potřebné při tvorbě galaktolipidů a galaktooligosacharidů, napomáhá absorpci vápníku, atd. (Maldonado a kol., 1998). Má nízkou rozpustnost a při koncentraci nad 18 % hmot. krystalizuje. To představuje problém při výrobě mlékárenských produktů, jakými jsou kondenzované mléko a zmrzlina, krystalky laktózy způsobují nepříjemnou pískovitou texturu (Zadow, 1992). Hydrolýza laktózy je proto pro tyto výrobky velmi žádoucí. Hydrolýzou laktózy se také sníží hygroskopickost sušených mléčných výrobků, zvýší se sladivost a redukuje se průběh Maillardových reakcí (Čurda a kol., 2001, Zadow, 1992, Rosenberg a kol., 1995).

Význam  $\beta$ -galaktosidasy spočívá nejen při hydrolýze laktózy v mléku, ale také při zpracování syrovátky. Syrovátka, jako vedlejší produkt mlékárenského průmyslu při výrobě sýrů, tvarohu a kaseinů, je produkována v poměrně velkých množstvích. Při výrobě sýrů se ročně vyprodukuje na celém světě víc než 150 milionů tun syrovátky (na 1 kg sýru připadá průměrně 10 l syrovátky) a celosvětová produkce sýrů neustále stoupá. Doposud se extenzívně nezpracovává, což představuje ekonomický a ekologický problém (Novalin a kol., 2005). Navíc při práci s ní existují vícera omezení a není možné ji volně vypouštět do životního prostředí. Polovina z produkovaného množství tohoto odpadního produktu se používá při výrobě koncentrátů syrovátkových bílkovin (WPC), ale hlavně na zkrmování hospodářskými zvířaty (Rudolfová a Čurda, 2005). Syrovátka se může využít také jako surovina na výrobu etanolu. Vzhledem k tomu může být v budoucnosti atraktivním substrátem pro fermentační procesy (Coté a kol., 2004). Například při výrobě etanolu je možné použít kvasinky rodu *Kluyveromyces*, které využívají laktózu. Hydrolýza laktózy

umožňuje využít jako substrát zahuštěnou syrovátku s vyšší koncentrací C-zdroje, a tím výrazně zvýšit výtěžnost fermentace (Rosenberg a kol., 1995). Někdy je možné vést fermentační proces tak, aby produkční mikroorganismus fermentoval jen přítomnou glukózu, přičemž zůstávající galaktóza může být následně izolovaná, purifikovaná, resp. chemicky modifikovaná (Rosenberg, 2000).

Dalším významným uplatněním  $\beta$ -galaktosidasy v potravinářském průmyslu je tvorba galaktooligosacharidů (GOS). Tvoří se simultánně při hydrolýze laktózy díky transglykozylační aktivitě  $\beta$ -galaktosidasy. Transglykozylační aktivita  $\beta$ -galaktosidasy byla poprvé popsána už v padesátých letech 20. století (Aronson, 1952). První publikované práce se věnovaly sledování příznivých účinků GOS a hledání optimálních metod na jejich produkci (Mahoney, 1998).

GOS patří do skupiny tzv. prebiotik, nestravitelných složek potravy, které selektivně stimulují růst, resp. aktivitu probiotických kultur v trávicím traktu člověka. Díky  $\beta$ -konfiguraci jsou GOS odolné vůči hydrolýze enzymy slin a žaludečních šťáv, které selektivně hydrolyzují  $\beta$ -glykozidové vazby (Sako a kol., 1999). GOS se dostávají do hrubého střeva, kde se podílejí na řadě významných procesů. Bifidogení mikroflóra metabolizuje GOS na mastné kyseliny s krátkými řetězci (octovou, propionovou, mléčnou a máselnou) a na plyny (Johnson a kol., 1993). Vznikající kyseliny stimulují peristaltiku střev a snížením hodnoty pH napomáhají absorpci vápníku a železa. GOS jsou taktéž známy jako růstové faktory bifidobakterií, které jsou zase známy pro své zdravé prospěšné účinky. Mimo to bifidobakterie selektivně fermentují galaktooligosacharidy, čímž je potlačený růst nežádoucích mikroorganismů v trávicím traktu (Pennisin, 1997). GOS jsou prospěšné i pro zdraví ústní dutiny, pokud nejsou využívány ústní mikroflórou (*Streptococcus mutants*), čímž zamezují tvorbě zubních kazů (Szilagyi, 1999).

Jednotlivé  $\beta$ -galaktosidasy se liší celkovým množstvím a strukturou produkovaných GOS. Například, po izolování  $\beta$ -galaktosidas z různých kmenů rodu *Bifidobacterium* a jejich následném použití při syntéze GOS z 30 % laktózového roztoku, byl evidentní rozdíl v jejich produkovaném množství. V případě *Bifidobacterium angulatum* představovaly 43,8 % z celkových přítomných cukrů v roztoku, zatímco v případě *Bifidobacterium pseudolongum* jen 26,8 % (Rabiu a kol., 2001). Co se týká struktury, typ nově vytvořené glykozidové vazby dvou monosacharidových jednotek (galaktóza-galaktóza, galaktóza-glukóza) je v případě *Bifidobacterium bifidum*  $\beta(1-3)$  (Dumortier a kol., 1994), na rozdíl od  $\beta(1-4)$  u *Bacillus*

*circulans* (Mozaffar a kol., 1984) a  $\beta(1-6)$  u *Streptococcus thermophilus* (Matsumoto, 1990).

Enzym,  $\beta$ -galaktosidasa byla imobilizována následujícími způsoby: entrapment (Mammarella a Rubiolo, 2005, Rodriguez-Nogales a Delgadillo, 2005), síťování (cross-linking) (Sungur a Akbulut, 1994), adsorpce (Carpio a kol., 2000), kovalentní vázání (Hu a kol., 1993, Findlay, 1991, Di Serio a kol., 2003), uzavření do membrán (Novalin a kol., 2005), anebo kombinací těchto metod (blíže popsané v kap. 1.2.1).

Proces imobilizace  $\beta$ -galaktosidasy je spojený s určitými nevýhodami jako je například ztráta enzymové aktivity po imobilizaci. Pokles aktivity  $\beta$ -galaktosidasy po imobilizaci se pohybuje v intervalu 5 až 90 % a závisí na použité metodě imobilizace. Tato nevýhoda je kompenzovaná možností opakovaného použití imobilizátu. Pro aplikaci imobilizátu v průmyslovém měřítku jsou rozhodujícími parametry právě schopnost uchovat si enzymovou aktivitu a stabilita imobilizátu při opakovaném použití (Tanaka a Kawamoto, 1999).

Pro metodu entrapmentu se často používají polyakrylamidový a polyvinylalkoholový gel. PVA matrice byla použita také pro uzavření  $\beta$ -galaktosidasy izolované z vláknitých hub, čímž se zvýšila její teplotní stabilita. Enzym si po 24 hodinách při 50°C zachoval 70 % původní aktivity a při 60°C 5 % původní aktivity (Batsalova a kol., 1987). Khare a Gupta (1988) imobilizovali  $\beta$ -galaktosidasu z *E. coli* kombinací metody síťování a následného uzavření do polyakrylamidového gelu. Při stejném postupu s použitím dimetyladipimidátu jako síťovacího činidla a látek chránících enzym: hovězí sérový albumin, cystein a laktóza, naměřili aktivitu představující 190 % aktivity předešlého imobilizátu. Porovnání různých metod imobilizace  $\beta$ -galaktosidasy z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* ukázalo, že síťování a následný entrapment do agarozových zrn je výhodným postupem pro imobilizaci vysokých koncentrací enzymu se ziskem vysoké enzymové aktivity (Berger a kol., 1995). Proces imobilizace umožňuje zvýšení stability enzymu v různých reakčních podmínkách. Entrapment  $\beta$ -galaktosidasy z *A. oryzae* do pórovitého PVA kryogelu zvýšil odolnost enzymu vůči teplotě, hodnotě pH a iontové síle (Rossi a kol., 1999).

Adsorpce je technicky nenáročná metoda imobilizace. Jako nosič může sloužit například hydrofobní bavlněné vlákno, na kterém si enzym zachovává 50 % původní aktivity (Sharma a Yamazaki, 1984).  $\beta$ -galaktosidasu z *A. oryzae* adsorbováním na polyvinylchlorid a silikagel ve formě membrány použili Bakken a kol. (1990) při

hydrolýze laktózy v mléku v axiálním průtokovém reaktoru.  $\beta$ -galaktosidasa imobilizovaná adsorpcí na kostní prach si zachovala 83 % původní aktivity, avšak v průběhu trvání čtyřech vsádkových hydrolýz imobilizát postupně aktivitu ztrácel. Po ukončení čtvrté hydrolýzy aktivita imobilizátu představovala jen 24 % z původní (Carpio a kol., 2000). Tímto experimentem se projevila nevýhoda imobilizační metody, při které dochází k lehké desorpci. Tento jev se může eliminovat přidáním vhodného síťovacího činidla (Szczo drak, 2000).

Kovalentní vazbou imobilizovali Pietta a kol. (1989)  $\beta$ -galaktosidasu izolovanou z *A. oryzae* na dva různé nosiče. Prvním byl zeolit, který však nebyl vhodný, protože vázal jen malé množství enzymu. Na rozdíl od toho práškový nylon-6 kovalentně vázal větší množství enzymu a vytvořil stabilní komplex. Peters a Rehm (2006) imobilizovali  $\beta$ -galaktosidasu kovalentním vázáním na polyhydroxyalkanoátové granule. Získaný imobilizát byl v průběhu skladování v různých podmínkách dlouhodobě stabilní, což svědčí o pevné vazbě mezi nosičem a imobilizovaným enzymem.

Glutardialdehyd s dvěma reaktivními funkčními skupinami je nejčastěji používaným síťovacím činidlem při imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy (Guisán a kol., 1997, Szczo drak, 2000, Zhou a Chen 2, 2001). Avšak imobilizační metoda síťování se využívá zejména v kombinaci s jinou metodou (výše uvedené, Panesar a kol., in press), jakou je adsorpce anebo entrapment. Například  $\beta$ -galaktosidasa z *A. oryzae* imobilizovaná metodou entrapmentu do formy vláken skládajících se z alginátu a želatiny byla následně zesíťovaná pomocí glutardialdehydu, čímž se zabránilo vymývání enzymu (Tanriseven a Dogan, 2002). Tento typ síťování byl použitý také při imobilizování  $\beta$ -galaktosidasy do kobalt-alginátového gelu. Avšak uvolňování kobaltu v průběhu hydrolýzy laktózy znemožnilo použití imobilizátu v potravinářském průmyslu (Ates a Mehmetoglu, 1997).

Aktivita a stabilita imobilizovaného enzymu je ovlivněná hodnotou pH, teplotou a iontovou silou (Roy a Gupta, 2003). V porovnání s volným má imobilizovaný enzym širší pH a teplotní optimum ve většině publikovaných pracích. Vyšší stabilita imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy při nižší hodnotě pH a vyšší teplotě je výhodou při hydrolýze laktózy, navíc snížením pH hodnoty a zvýšením teploty se snižuje riziko kontaminace. Na druhé straně posun pH optima a zvýšení stability za těchto podmínek je výhodou při hydrolýze laktózy v sladké syrovátce, které pH je v intervalu 5,5 až 6,0 (Szczo drak, 2000).

$\beta$ -galaktosidasa z různých mikrobiálních zdrojů byla imobilizovaná také za účelem produkce galaktooligosacharidů v kontinuálním, ale také vsádkovém režimu (Chockchaisawasdee a kol. 2005). Imobilizovaný enzym tvořil v porovnání s volným enzymem nižší koncentrace GOS. Tento pokles byl způsobený limitací přístupu substrátu k enzymu v imobilizovaném systému (Mahoney, 1998). Koncentrace a struktura vznikajících GOS do značné míry závisela na počáteční koncentraci substrátu a na původu enzymu. Nárůst počáteční koncentrace laktózy ze 14 na 23 % zvýšil produkci GOS dvojnásobně (Foda a Lopez-Leiva, 2000, Chockchaisawasdee a kol., 2005).

Shin a kol. (1998) imobilizovali enzym izolovaný z *Bullera singularis* ATTC 24193 do chitozanových zrn. Takto imobilizovaný enzym použili při produkci GOS. Experiment trval 15 dní, v průběhu kterých zaznamenali 55 % hmot. GOS z celkových sacharidů (při počáteční koncentraci substrátu  $100 \text{ g.l}^{-1}$ ) a objemovou produktivitu  $4,4 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Jiný příklad využití imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy při produkci oligosacharidů byl popsán také v práci Albayrak a Yang (2002). Enzymem z *A. oryzae* imobilizovaným na bavlněné vlákno dosáhli maximální produkci 26 % hmot. z celkových sacharidů (při koncentraci substrátu  $400 \text{ g.l}^{-1}$ ) a objemovou produktivitu  $106 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Foda a Lopez-Leiva (2000) testovali membránový průtokový reaktor s imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou pro přípravu GOS. Nejvyšší produkci (31 % hmot.) dosáhli při použití ultrafiltrované syrovátky s počáteční koncentrací laktózy 20 % hmot. Natolik je syrovátka bohatým zdrojem laktózy, její využití pro produkci GOS se jeví jako velmi atraktivní.

Je známo licí zařízení, které se používá při výrobě imobilizátů, což je výrobek - biokatalyzátor na bázi polyvinylalkoholového nosiče, který se obvykle vyrábí v podobě čočky nebo pásku. Směs polyvinylalkoholového gelu a biomasy se nanáší na nekonečný nosný pás pomocí kapacího, licího mechanismu v přesných a předem definovaných dávkách, kde se fyzikálním procesem želírování pomocí sušení v průběhu procesu výroby změni v přilnavou hmotu. V současné době licí zařízení pro výrobu imobilizátů na bázi polyvinylalkoholového nosiče sestává z licího mechanismu uspořádaného před sušícím kanálem, uvnitř kterého prochází nekonečný pás, např. z polyetylénu. Licí mechanismus, tzv. licí hlava je opatřena jednou řadou licích jehel o průměru 0,1 až 2,00 mm, které pulzují pomocí elektromagnetů s různou frekvencí a délkou pulsů a nanášejí nebo lijí směs polyvinylalkoholového gelu a biomasy na nekonečný nosný pás. Licí zařízení dále

zahrnuje rebotnací část umístěnou v horní části sušícího kanálu, kterou tvoří systém ostřikovacích nízkotlakých trysek, jež navlhčují (rebotnají) vysušený výrobek. Dále je licí zařízení opatřeno sběrnou částí, jež tvoří přítlačná stěrka z nerezového plechu s oplachem, který je realizován pomocí ostřikovacích trysek umístěných nad nerezovou přítlačnou stěrku a umístěné na nosném rámu licího zařízení, nad válcem pohonu pásu. Jako zdroj sušícího média je použit okolní vzduch nebo vzduch zbavený vlhkosti-vody pomocí kontinuálního atmosférického odvlhčování nebo kontinuálního vymrazování, který je před vstupem do sušícího kanálu ohříván pomocí topných těles a který zajišťuje želírování pomocí sušení vyráběných imobilizátů na bázi polyvinylalkoholového nosiče. Licí zařízení v tomto uspořádání není schopno dlouhodobé ekonomické produkce, zvláště pro nesnadné snímání imobilizátů na bázi polyvinylalkoholového nosiče z nosného pásu. Ke stírání a následnému sběru je použito mechanické stěrky. Stěrka je pevně, tzn. na základě pružnosti, přitlačována k povrchu nosného pásu a následně je hmota stírána přes tuto stěrku a odpadá do sběrné vany. Toto mechanické odnímání výrobku z pásu je značně nedokonalé zejména z hlediska tvorby velkých shluků, aglomerátů polyvinylalkoholového nosiče, tudíž tvorby výrobku s nízkou nebo nulovou aktivitou. Nevýhodou je též značné mechanické opotřebení nekonečného nosného pásu licího zařízení. Dále bylo zjištěno, že při používání roztoků solí v rebotnací části licího zařízení dochází na povrchu nekonečného pásu k ulpívání solí z rebotnacího roztoku v rebotnací části licího zařízení a tím ke změně povrchového napětí nosného pásu licího zařízení a tudíž ke změně tvaru výrobku. Tato změna způsobuje, že snímání, odlepení imobilizátu z nekonečného pásu se neobejde ve většině případů bez jeho poškození a tvorby velkých shluků, aglomerátů.

### **Podstata vynálezu**

Výše uvedené nedostatky jsou odstraněny způsobem průmyslové výroby biokatalyzátorů s biologicky aktivním materiálem ve formě imobilizovaných enzymů nebo mikroorganismů, které jsou imobilizovány v polyvinylalkoholovém gelu, a jejich použitím, jehož podstata spočívá v tom, že pro jejich průmyslovou výrobu se použije aktivní biologický materiál tvořený směsí volného nativního, nebo předem upraveného agregovaného enzymového katalyzátoru, nebo produkčního mikroorganismu, anebo jejich částí a polyvinylalkoholového gelu, poté se tato směs tvaruje a želíruje v proudu sušícího vzduchu v teplotním rozmezí 80 až 15°C se

žretem k rozměru biologicky aktivního materiálu při zachování poměru geometrického povrchu k objemu biokatalyzátoru větším než  $7 \text{ mm}^{-1}$ , a následně se takto vyrobené biokatalyzátory mohou kultivovat nebo skladovat a poté se použijí v biotechnologických procesech za podmínek zaručujících danému biotechnologickému procesu vyšší produktivitu, vyšší produkční a enzymatickou stabilitu, dlouhodobé a opakované použití, či definovatelné řízení procesu s následnou snadnou separací biokatalyzátoru.

Jednou z hlavních výhod technologií s imobilizovanými buňkami je značná redukce provozních nákladů daného procesu spojená s možností opakovaného použití biokatalyzátoru a kontinualizací procesu, zachování vysoké koncentrace upoutané biomasy v systému a snížení nákladů na separaci biomasy a izolaci produktu. Při kontinualizaci procesu nedochází k vymývání biomasy z matrice nosiče, redukují se i neproduktivní růstové fáze, zvyšují se výtěžky a dosahují se vyšší reakční rychlosti. Výhodné je dále i to, že způsob vedení biotechnologického procesu podle tohoto vynálezu má za důsledek redukci potřebných reakčních objemů, reakčních časů, což se projevuje snížením jak provozních nákladů, tak snížením investičních nákladů.

Pro intenzifikaci stávajících procesů odstraňování sloučenin dusíku z pitných, užitkových a odpadních vod ve formě plynného dusíku pomocí imobilizovaných buněk je výhodné, použijeme-li nosič ve tvaru čočky, resp. válce, jehož výška je čtyřikrát až dvacetkrát menší než poloměr podstavy, nebo ve tvaru pásky, resp. kvádru, jehož jeden rozměr je čtyřikrát až dvacetkrát menší než ostatní dva tak, aby byly hodnoty poměru (geometrického) povrchu k objemu nosiče ( $S/V$ ) větší než  $7 \text{ mm}^{-1}$ .

Pro přípravu biokatalyzátoru určeného pro odstranění dusíkatého znečištění z pitných, užitkových a odpadních vod je výhodné, když se do polyvinylalkoholového gelu uzavřou nitrifikační nebo denitrifikační bakterie, načež se želírování a tvarování směsi polyvinylalkoholového nosiče a bakteriálních buněk provede sušením do tvaru čoček nebo pásků v teplotním rozmezí  $80 - 15^\circ\text{C}$  tak, že poměr plochy a objemu imobilizátů je minimálně  $7,0 \text{ mm}^{-1}$  a imobilizáty se následně vytvrzují ve vodném roztoku síranu sodného. Imobilizáty se následně kultivují ve vodném živném médiu s obsahem dusíkatého substrátu  $10 - 1000 \text{ mg/l N-NH}_4$  a  $10-1500 \text{ mg/l N-NO}_3$  při teplotě  $20 - 35^\circ\text{C}$  a hodnotě pH  $6,0 - 9,5$ .

Biokatalyzátor obsahující nitrifikační bakterie je připravován odděleně od biokatalyzátoru obsahujícího denitrifikační bakterie. Následná kultivace biomasy obou biokatalyzátorů může probíhat přímo v průmyslových zařízeních určených pro nitrifikaci a denitrifikaci.

Na přípravu imobilizátů, enkapsulací do PVA matrice, je používána čistá směsná kultura nitrifikačních bakterií (*Nitrosomonas europaeae* a *Nitrobacter winogradskiy*). Použité litotrofní bakterie (pomalu rostoucí organismy) získávají energii pro svoji existenci oxidací amoniakálního dusíku ( $\text{N-NH}_3$ ), v případě bakterií *Nitrosomonas europaeae* a oxidací dusitanů ( $\text{N-NO}_2$ ) v případě *Nitrobacter winogradskiy*.

Na přípravu imobilizátů, enkapsulací do PVA matrice, jsou používány denitrifikační bakterie (*Paraccoccus denitrificans*) využívající dusičnanový dusík ( $\text{N-NO}_3$ ) jako akceptor elektronu místo kyslíku. Denitrifikační bakterie jsou organotrofní bakterie, které pro svůj růst potřebují organický uhlík. Použité kultivační roztoky a některé reálné průmyslové odpadní vody neobsahují žádné organické látky, proto je nutné do systému dodávat organický uhlík – alkoholy, sacharidy a pod., nejlépe methanol, neboť je levný, ale produkuje relativně málo biomasy.

Výhodné je i to, že tvar imobilizátů zaručuje optimální využití celého objemu gelového nosiče pro růst mikroorganismů a tím produkčních, enzymatických vlastností všech imobilizovaných mikroorganismů a enzymů, což se projevuje zvýšením specifické produktivity biotechnologického procesu používajícího polyvinylalkoholových (PVA) imobilizátů. Biokatalyzátory připravené tímto způsobem se mohou používat opakovaně ve vsádkovém, semikontinuálním a kontinuálním režimu fermentace.

Pro přípravu biokatalyzátoru určeného pro proces výroby etanolu ze sacharidických substrátů, je výhodné když se do polyvinylalkoholového gelu uzavřou anaerobní bakterie *Zymomonas mobilis*, načež se želírování a tvarování směsi polyvinylalkoholového nosiče a bakteriálních buněk rodu *Zymomonas* provede sušením v teplotním rozmezí 80 až 15°C a následně se imobilizáty kultivují ve vodním živném médiu s obsahem 2 - 25% hmot. sacharidického substrátu při teplotě 20 až 40°C a hodnotě pH 3,5 až 7,0 v přítomnosti etanolu v rozmezí 1 až 15% hmot. Přitom je výhodné, když se imobilizované buňky po ukončení produkce oddělí od tekutého podílu a použijí opakovaně na produkci etanolu. Biokatalyzátory připravené

tímto způsobem se mohou používat opakovaně ve vsádkovém, semikontinuálním a kontinuálním režimu fermentace.

Pro přípravu biokatalyzátoru určeného pro proces výroby kyseliny mléčné ze sacharidických substrátů je výhodné, když se do polyvinylalkoholového gelu uzavře termofilní bakterie *Bacillus coagulans* a poté se želírování a tvarování směsi polyvinylalkoholového nosiče a buněk *Bacillus coagulans* provede sušením v teplotním rozmezí 80 – 15°C při poměru plochy povrchu a objemu imobilizátů větším než 7,0 mm<sup>-1</sup> a následně se imobilizované buňky kultivují ve vodním živném médiu s obsahem 2 až 14% hmot. sacharidického substrátu při teplotě 30 až 60°C a hodnotě pH 5,0 až 7,5 v přítomnosti kyseliny mléčné nebo jejích solí v rozmezí 1 až 12% hmot. Výhodou též je, že se imobilizované buňky po ukončení produkce oddělí od tekutého podílu a použijí opakovaně na produkci kyseliny mléčné. Biokatalyzátory připravené tímto způsobem se mohou používat opakovaně ve vsádkovém, semikontinuálním a kontinuálním režimu fermentace.

Pro zvýšení produktivity výroby kyseliny mléčné je výhodné použít kmen *Bacillus coagulans* CCM 4318. Tento kmen sám o sobě se vyznačuje vysokou produktivitou výroby kyseliny mléčné a se zřetelem k rozměru biokatalyzátoru při zachování poměru jeho objemu a plochy minimálně 7,0 mm<sup>-1</sup> se jeho produktivita výroby kyseliny mléčné ještě zvýší.

Pro přípravu biokatalyzátoru určeného na přípravu invertního cukru ze sacharózových roztoků je výhodné, když se do polyvinylalkoholového gelu uzavře enzym invertáza a poté se želírování a tvarování směsi polyvinylalkoholového nosiče a enzymu provede sušením v teplotním rozmezí 80 – 15°C, přičemž poměr plochy a objemu imobilizátů je minimálně 7,0 mm<sup>-1</sup> a takto imobilizovaný enzym se použije na hydrolýzu sacharózových roztoků s obsahem 2 až 50% hmot. sacharidického substrátu při teplotě od 20 do 50°C a hodnotě pH 3,5 až 7,0.

Výhodné je, když se imobilizovaná invertáza po ukončení hydrolýzy oddělí od tekutého podílu a použije se opakovaně na produkci invertního cukru, přičemž se hydrolýza sacharózy pomocí imobilizované invertázy provádí ve vsádkovém, semikontinuálním a kontinuálním režimu.

Prezentovaný způsob imobilizace invertázy do polyvinylalkoholového gelu (PVA), je založený na vysušování gelu v proudu sušícího vzduchu a v gradientu teploty 80 až 15°C, přičemž může docházet k interakci mezi funkčními skupinami gelu a invertázy. Tvar imobilizátu, když poměr plochy a objemu imobilizátů je

minimálně  $7,0 \text{ mm}^{-1}$ , zabezpečuje optimální využití celého objemu gelu a dosažení vysokých specifických aktivit invertázy. Enzym imobilizovaný tímto způsobem se z matrice nevyplavuje a může se použít ve vsádkovém, semikontinuálním a kontinuálním režimu.

Pro přípravu biokatalyzátoru určeného na přípravu D-glukózy z vyšších sacharidů připravených částečnou hydrolýzou škrobu je výhodné, když se do polyvinylalkoholového gelu uzavře enzym glukoamylázy a poté se želírování a tvarování směsi polyvinylalkoholového nosiče a enzymu provede sušením v teplotním rozmezí  $80 - 15^\circ\text{C}$ , přičemž poměr plochy a objemu imobilizátů je minimálně  $7,0 \text{ mm}^{-1}$  a takto imobilizovaný enzym se použije na hydrolýzu vyšších sacharidů připravených částečnou hydrolýzou škrobu s obsahem 2 až 40% hmot. sacharidického substrátu při teplotě 20 až  $45^\circ\text{C}$  a hodnotě pH 3,5 až 7.

Pro zamezení vymývání glukoamylázy je výhodné, když se imobilizace enzymu do polyvinylalkoholového gelu (PVA), děje za vysušování v proudu vzduchu a v gradientu teploty  $80 - 15^\circ\text{C}$ , kde může docházet k interakci mezi funkčními skupinami gelu a glukoamylázou. Enzym imobilizovaný tímto způsobem se z matrice nevyplavuje a může se používat ve vsádkovém, semikontinuálním a kontinuálním režimu. Takto připravený sacharidický substrát obsahující glukózu je možné využít ve fermentačním a potravinářském průmyslu.

Výhodné je i to, když se imobilizovaná glukoamyláza po ukončení hydrolýzy oddělí od tekutého podílu a použije se opakovaně pro produkci glukózy.

Výhodné je též i to, že se hydrolýzy pomocí imobilizované glukoamylázy provádí v batch, fed-batch a kontinuálním režimu.

Výhodou je, že imobilizovaná glukoamyláza se použije na sacharifikaci škrobnatého substrátu v procesu fermentační produkce etanolu.

Výhodou je, že se imobilizovaná glukoamyláza použije na sacharifikaci škrobnatého substrátu v procesu fermentační produkce kyseliny mléčné.

Pro přípravu biokatalyzátoru určeného na hydrolýzu laktózových roztoků, přípravu D-galaktosy, D-glukosy a galaktooligosaccharidů z laktózových roztoků je výhodné, když se do polyvinylalkoholového gelu uzavře enzym  $\beta$ -galaktosidasa a poté se želírování a tvarování směsi polyvinylalkoholového nosiče a enzymu provede sušením v teplotním rozmezí  $80 - 15^\circ\text{C}$ , přičemž poměr plochy a objemu imobilizátů je minimálně  $7,0 \text{ mm}^{-1}$  a takto imobilizovaný enzym se použije na hydrolýzu

laktózových roztoků s obsahem 2 až 50% hmot. sacharidického substrátu při teplotě od 20 do 60°C a hodnotě pH 3,0 až 7,0.

Výhodné je, když se imobilizovaná  $\beta$ -galaktosidasa po ukončení hydrolýzy oddělí od tekutého podílu a použije se opakovaně na produkci D-galaktosy, D-glukosy a galaktooligosacharidů, přičemž se hydrolýza laktózy pomocí imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy provádí ve vsádkovém, fed-batch a kontinuálním režimu.

Zařízení k výrobě imobilizovaných biokatalyzátorů tvoří produkční průmyslové zařízení umožňující optimalizaci objemu a plochy biologického nosiče v závislosti na rozměrech biologicky aktivního materiálu obsahující kapací, licí mechanismus uspořádaný před sušícím kanálem, kterým prochází nekonečný pás, jehož podstata spočívá v tom, že je opatřeno alespoň jednou licí hlavou opatřenou dvěma řadami licích jehel, která je napojena na tlakový temperovaný zásobník a kompresor, nosným pásem a systémem sušení, jenž tvoří zdroj sušícího vzduchu prostřednictvím ventilátoru dopravovaného do vzduchotechnického rozvodu s vřazenými topnými tělesy a ústícím do horního sušícího kanálu, dále dolním dosušovacím kanálem a rebotnací vanou, mezi nimiž je uspořádáno stírací a sběrné zařízení konstruované na principu mechanického stírání a vysokotlakého ostříku, jenž je spojeno potrubím s vřazeným vysokotlakým čerpadlem a nízkotlakým čerpadlem a ústícím do sběrné vany s chlazením a dále oplachový box pro očišťování nosného nekonečného pásu pomocí trysek napojených na nízkotlaké čerpadlo, jenž je spojeno pomocí potrubí s oplachovou vanou, ve které je demineralizovaná voda.

Zařízení podle tohoto vynálezu vytváří zcela novou sestavu průmyslového licího zařízení, které sestává z jedné nebo dvou licích hlav se dvěma řadami licích jehel o průměru 0,1 až 2,00 mm, které pulzují pomocí elektromagnetů s různou frekvencí a délkou pulsu, nosného pásu s řízeným pohonem, sušícího kanálu s protiproudím sušením, z rebotnací vany, sběrného, samostatného nízkotlakého oplachového systému a dolního sušícího kanálu s protiproudým sušením v dolní části licího zařízení. Výhodou je i to, že součástí zařízení je samostatný systém vysokotlakého ostříku pomocí vodného roztoku solí ve sběrné vaně, zahrnující vysokotlaké čerpadlo pro dodávku tlakové vody pro vysokotlaké trysky. Tímto je dosaženo posílení účinnosti mechanického stírání hmoty z pásu.

Zanedbatelné není ani to, že zařízení v tomto uspořádání a speciálně s tímto typem sběrného a oplachového zařízení je schopno zajistit nepřetržitou a ekonomickou průmyslovou výrobu imobilizátů na bázi polyvinylalkoholového nosiče.

Pro bezchybnou funkci stíracího, sběrného zařízení, které je součástí licího zařízení, je výhodné, když je tvořeno bočním rámem, v němž je uspořádána mechanická polymerní stěrka umístěná na nerezovém přitlačném mechanismu s pružinovým přitlačným mechanismem a ostřikem pomocí systému vysokotlakých trysek upevněných na nosném nerezovém trubkovém rozvodu uchyceném v rámu a umožňující ostřík pod úhlem  $45^\circ$  až  $80^\circ$ , přičemž pro čištění vnitřní i vnější strany nosného pásu jsou za mechanickou polymerní stěrkou s pružinovým mechanismem napevno umístěny dolní a horní stěrka s polymerními kartáči a pro dočišťování nosného pásu od výrobku v místě jeho výstupu z rámu je tento opatřen ještě dále dolní a horní polymerní stěrkou. Výhodou je i to, že navržený mechanismus stíracího, sběrného zařízení očišťuje i druhou stranu nekonečného nosného pásu a to i tehdy je-li jeho vnitřní povrch nerovný, vlnitý nebo drsný.

Rovněž lze zařízení podle tohoto vynálezu použít na stírání ostatních přilnavých látek k nosnému pásu při výrobách jiných ulpívacích hmot.

#### Přehled obrázků na výkresech

Vynález bude blíže osvětlen pomocí výkresů, kde obr.1 znázorňuje schéma licího stroje, obr.2 schéma rebotnací nádrže, obr. 3 částečný řez sběrným zařízením a obr.4 schéma oplachového boxu.

#### Příklady provedení vynálezu

Způsob výroby a použití výše jmenovaných nosičů v procesu odstraňování dusíku z odpadních vod pomocí imobilizovaných nitrifikačních a denitrifikačních buněk v polyvinylalkoholovém gelu bude objasněno v následujících příkladech.

#### **Příklad 1**

Imobilizát - biokatalyzátor pro nitrifikaci byl připraven enkapsulací čisté směsné kultury nitrifikačních bakterií (*Nitrosomonas europaeae* a *Nitrobacter winogradskyi*) do PVA-hydrogelu.

Imobilizát - biokatalyzátor pro denitrifikaci byl připraven enkapsulací denitrifikačních bakterií (*Paraccoccus denitrificans*).

Imobilizace byla provedena tak, že byl připraven roztok PVA, který obsahoval 100 g PVA (polyvinylalkohol), 60 g PEG (polyetylglykol), 790g destilované vody. Do takto připraveného roztoku bylo přidáno 50 ml homogenní suspenze biomasy tak, aby výsledná koncentrace buněk byla 0,60 g buněk na 1 dm<sup>3</sup> gelu. Takto připravená směs buněk v PVA roztoku odkapávala na tvrdý podklad a následně je tato směs síťována a tvarována v proudu suchého vzduchu při gradientu teploty: při 80 až 15°C. Poté byly imobilizáty, u kterých byl poměr plochy a objemu imobilizátu minimálně 7 mm<sup>-1</sup>, přeneseny do roztoku síranu sodného (0,1 mol/l) a chloridu amonného (0,01 mol/l) na dobu 60 minut. Po odfiltrování byly imobilizáty kultivovány nebo uskladněny ve skladovacím mediu při 4°C.

Batch kultivace probíhala ve vodném živném mediu s postupně se zvyšujícím obsahem dusíkatého substrátu 50 – 500 mg/l N-NH<sub>4</sub> v případě nitrifikantů, při které proběhla kultivace bakterií při pH 7,0 a koncentraci rozpuštěného kyslíku větší než 1,5 mg/l.

V případě denitrifikačních mikroorganismů probíhala batch kultivace ve vodném kultivačním mediu s obsahem dusíkatého substrátu 200 mg/l N-NO<sub>3</sub> a dalších nutrietů při teplotě 20 až 35°C a pH 7,8 v přítomnosti methanolu jako C-substrátu.

Po kultivacích obsah biomasy v obou biokatalyzátorech činil cca 60 až 80 mg sušiny biomasy na 1000 ml PVA.

Takto připravené imobilizáty byly podrobeny opakovaným batch fermentacím. V reaktoru s efektivním objemem 17 litrů, s obsahem 15 litrů syntetické odpadní vody (OV) s obsahem cca 800 mg/l N-NH<sub>4</sub> a 2000g biokatalyzátoru s enkapsulovanými nitrifikačními bakteriemi byla nitrifikace (odstraňování amoniakálního dusíku) dokončena po 4 hodinách, což představuje rychlost nitrifikace cca 1500 mg N-NH<sub>4</sub> /hod.kg biokatalyzátoru, resp. cca 4,8 kg N-NH<sub>4</sub> /m<sup>3</sup> OV.d a 36 kg N-NH<sub>4</sub> /m<sup>3</sup> biokatalyzátoru.d.

V reaktoru s efektivním objemem 15,8 litrů, s obsahem 15 litrů syntetické odpadní vody o koncentraci 800 mg/l N-NO<sub>3</sub> a 800g biokatalyzátoru s enkapsulovanými nitrifikačními bakteriemi byla denitrifikace (odstraňování dusičnanového dusíku) dokončena po 3 hod v přítomnosti methanolu jako C-substrátu, což představuje rychlost denitrifikace cca 2000 mg N-NO<sub>3</sub>/hod.kg biokatalyzátoru, resp. cca 6 kg N-NO<sub>3</sub>/m<sup>3</sup> OV.d a 45 kg N-NO<sub>3</sub>/m<sup>3</sup> biokatalyzátoru.d.

**Příklad 2**

Imobilizáty připravené a kultivované jako v příkladu 1 byly použity pro odstraňování dusíkatého znečištění z reálné odpadní vody s vysokým obsahem dusíkatého znečištění 200 – 1000 mg/l N-NH<sub>4</sub> a prakticky nulovou CHSK v kontinuálním uspořádání nitrifikace a denitrifikace.

K testování současně probíhající nitrifikace a denitrifikace byla použita kontinuální modelová jednotka, kde efektivní objem míchaného nitrifikačního reaktoru činil 17 litrů a efektivní objem v míchaném denitrifikačním reaktoru 3,8 litru. Průtok reálné průmyslové odpadní vody byl 35 l/den s obsahem cca 1600 mg/l N-NH<sub>4</sub>.

Do nitrifikačního reaktoru bylo přidáno 2000g biokatalyzátoru s enkapsulovanými nitrifikačními bakteriemi. Do denitrifikačního reaktoru bylo přidáno 800g biokatalyzátoru s enkapsulovanými denitrifikačními bakteriemi.

Během několikátýdenního pokusu byla dosahována průměrná rychlost nitrifikace cca 1000 mg N-NH<sub>4</sub> /hod.kg biokatalyzátoru při 95% účinnosti nitrifikace a průměrná rychlost denitrifikace v přítomnosti methanolu jako C-substrátu cca 1600 mg N-NO<sub>3</sub> /hod.kg biokatalyzátoru. Rychlost odstraňování dusíkatého znečištění činila tedy cca 1,5 kg/m<sup>3</sup> OV.d.

**Příklad 3**

Imobilizáty připravené a kultivované jako v příkladu 1 byly použity pro odstraňování dusíkatého znečištění z reálné odpadní vody s vysokým obsahem dusíkatého znečištění 200 – 1000 mg/l N-NH<sub>4</sub> a vysokou CHSK (> 1000 mg/l) v kontinuálním uspořádání nitrifikace a denitrifikace.

Takto připravené imobilizáty byly podrobeny batch fermentacím. V reaktoru s efektivním objemem 17 litrů, s obsahem 15 litrů syntetické odpadní vody (OV) s obsahem cca 800 mg/l N-NH<sub>4</sub> a 2000g biokatalyzátoru s enkapsulovanými nitrifikačními bakteriemi byla nitrifikace (odstraňování amoniakálního dusíku) dokončena po 12 hodinách, což představuje rychlost nitrifikace cca 500 mg N-NH<sub>4</sub> /hod.kg biokatalyzátoru, resp. cca 1,6 kg N-NH<sub>4</sub> /m<sup>3</sup> OV.d a 12 kg N-NH<sub>4</sub> /m<sup>3</sup> biokatalyzátoru.d.

V reaktoru s efektivním objemem 15,8 litrů, s obsahem 15 litrů syntetické odpadní vody o koncentraci 800 mg/l N-NO<sub>3</sub> a 800g biokatalyzátoru s enkapsulovanými nitrifikačními bakteriemi byla denitrifikace (odstraňování

dusičnanového dusíku) dokončena po 6 hodinách v přítomnosti methanolu jako C-substrátu, což představuje rychlost denitrifikace cca 1000 mg N-NO<sub>3</sub>/hod.kg biokatalyzátoru, resp. cca 3 kg N-NO<sub>3</sub>/m<sup>3</sup> OV.d a 22,5 kg N-NO<sub>3</sub>/m<sup>3</sup> biokatalyzátoru.d.

Způsob výroby a použití výše jmenovaných nosičů v procesu výroby kyseliny mléčné ze sacharidických substrátů pomocí imobilizovaných buněk *Bacillus coagulans* v polyvinylalkoholovém gelu bude objasněno v následujících příkladech.

#### Příklad 4

Připraví se spórová suspenze *Bacillus coagulans* CCM 4318 tak, že ze zásobní kultury se očkuje 0,2 cm<sup>3</sup> na povrch MRS agaru s přídavkem sterilního CaCO<sub>3</sub> (3 h, 160°C) v P. miskách (Ø 9 cm). Inkubace probíhá 72 h při 50°C v laboratorním termostatu. Potom se vysporulovaná kultura převrství 5 cm<sup>3</sup> sterilní destilované vody a přenesou do Erlenmayerové baňky. Takto získaná suspenze se inkubuje 25 min při 70°C a následně se použije na imobilizaci do polyvinylalkoholového (PVA) gelu.

Připraví se roztok PVA, který obsahuje 100 g PVA (polyvinylalkohol), 60 g PEG (polyetylglykol), 790g destilované vody. Do takto připraveného roztoku se přidá 50 ml homogenní suspenze biomasy tak, aby výsledná koncentrace buněk byla 0,67 g buněk (sušina) na 1 dm<sup>3</sup> gelu. Takto připravená směs buněk v PVA roztoku se kape na tvrdý podklad a následně je tato směs síťována a tvarována v proudu suchého vzduchu při gradientu teploty: při 80 až 15°C. Poté se imobilizáty, u kterých je poměr plochy a objemu imobilizátu minimálně 7 mm<sup>-1</sup>, přenesou do roztoku síranu sodného (0,1 mol/l) na 60 minut. Po odfiltrování se imobilizáty použijí v batch fermentacích nebo se uskladňují v sterilní vodovodní vodě při 4°C.

Propagace biomasy se provádí v opakovaných batch fermentacích v 5 l laboratorním fermentoru s 2,6 l produkčního média. Produkční médium obsahuje v 1 litru destilované vody 60g sacharózy, 10 g kvasničného extraktu, 1g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,05g MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,01g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Produkční médium se krátce povaří, ochladí na 60°C a poté se přidá 400 g vlhkých imobilizátů. Teplota se v průběhu 1 hodiny postupně sníží na 45°C, pH se nechá spontánně poklesnout z 6,9 na hodnotu 5,0 a následně se udržuje v dalším průběhu fermentace na hodnotě 5,8 přídavkem 26% vodným roztokem amoniaku. Fermentace probíhá vsádkovým způsobem, za stálého míchání (200 ot./min.). Po vyčerpání sacharidického substrátu

se imobilizáty odseparují z fermentačního média a použijí do nové fermentace. Následně se uskuteční série 9 batch fermentací podobným způsobem v následujících podmínkách: druhá až pátá konverze probíhá při teplotě 50°C a pH 6,0 a šestá až desátá při teplotě 52°C a pH hodnotě 6,3. V průběhu opakovaných fermentací se zkrátí celková doba fermentace z 48 hodin (první konverze) na 12 hodin (10 konverze) při výtěžnosti kyseliny mléčné 91-93%. Koncentrace biomasy v PVA gelu se po 10. konverzi zvýší na 0,065g<sub>buněk</sub>/g<sub>imobilizátu</sub>.

### Příklad 5

Složení médií, příprava imobilizátů i batch fermentace jsou analogické jako v příkladě 4, jenom místo sacharózy použijeme v produkčním médiu glukózu (60 g/l). V 10. konverzi se po 14 hodinách fermentace nacházelo v médiu 55,2 g/l kyseliny mléčné a 1,2 g/l glukózy.

### Příklad 6

350 g vlhkých imobilizátů připravených postupem uvedeným v příkladu 4 se přenesou do 6 l fermentoru a přidá se 2 dm<sup>3</sup> produkčního média, které obsahuje v 1 litru destilované vody 60g sacharózy, 5,0g kvasničného extraktu, 0,8g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,05g MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,01g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Fermentace probíhá vsádkovým způsobem, za stálého míchaní (200 ot./min.) při teplotě 52°C, pH je udržováno přidávkou roztoku amoniaku (26%) na hodnotě 6,3. Po poklesu koncentrace sacharózy na hodnotu 20 g.dm<sup>-3</sup> se začnou postupně dávkovat 2 litry produkčního média stejného složení s obsahem sacharózy 140 g/l takovou rychlostí, aby koncentrace zbytkové sacharózy ve fermentoru se udržovala v rozmezí 15 až 30 g/l. Za 15 hodin je obsah kyseliny mléčné v médiu 93,5 g.dm<sup>-3</sup>, zbytková sacharóza je 2,6 g/l.

### Příklad 7

Složení médií a postup přípravy imobilizátů je identický jako v příkladu 5. 350 g imobilizátů se po 10. konverzi přenesou do 6 l fermentoru a přidá se 2,5 dm<sup>3</sup> produkčního média, které obsahuje v 1 litru destilované vody 60g glukózy, 5,0g kvasničného extraktu, 0,8g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,05g MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,01g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Fermentace probíhá za stálého míchaní (200 ot./min.) při teplotě 52°C, pH je udržováno přidávkou roztoku amoniaku (26%) na hodnotě 6,3. Po

poklesu koncentrace glukózy na hodnotu  $20 \text{ g.dm}^{-3}$  se začne postupně dávkovat produkční médium a odebírat vyfermentované médium stejného složení takovou rychlostí, aby koncentrace zbytkové sacharózy v reaktoru se udržovala v rozmezí 15 až  $30 \text{ g/l}$ , aby koncentrace zbytkové glukózy byla v rozmezí 10 až  $15 \text{ g.dm}^{-3}$  a aktuální koncentrace kyseliny mléčné v rozmezí 40 až  $48 \text{ g.dm}^{-3}$ . Fermentace se provádí nepřetržitě 40 dní, přičemž průměrná objemová produktivita zařízení se pohybuje v rozmezí 13,5 až  $17,0 \text{ (g}_{\text{K.mléčné}}.\text{dm}^{-3}.\text{h}^{-1})$ .

Způsob výroby a použití výše jmenovaných nosičů v procesu výroby etanolu ze sacharidických substrátů pomocí imobilizovaných buněk *Zymomonas mobilis* v polyvinylalkoholovém gelu bude objasněno v následujících příkladech.

### Příklad 8

Připraví se 100 ml kultivačního média v 250 ml kultivační baňce (sterilizace 20 min. při  $121^\circ\text{C}$ ). Kultivační médium obsahuje v 1 litru destilované vody 5g kvasničného extraktu,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g, glukosa 100g (pH 5 až 5,5). Takto připravené médium se naočkuje kulturou *Zymomonas mobilis* CCM 2770, narostlou na tuhém kultivačním médiu a kultivuje se 24 až 48 hodin staticky při teplotě  $30^\circ\text{C}$ . Takto připravená biomasa se použije jako inokulum (10% obj.) do 100 ml kultivačního média předešlého složení v 250 ml kultivačních baňkách. Po 12 hodinách statické kultivace při  $30^\circ\text{C}$  se mikroorganismus opět přenesse do kultivačního média (5% obj.). Kultivace se provádí při teplotě  $30^\circ\text{C}$  do hodnoty sušiny biomasy  $1,2 \text{ g.dm}^{-3}$ , v průběhu kultivace je výhodné médium mírně promíchat. Po skončení kultivace se biomasa oddělí centrifugací (5500 ot./min., 25 min) a použije na imobilizaci.

Připraví se roztok PVA, který obsahuje 100 g PVA (polyvinylalkohol), 60 g PEG (polyetylenglykol), 790 g destilované vody. Do takto připraveného roztoku se přidá 50 ml homogenní suspenze biomasy tak, aby výsledná koncentrace buněk byla 0,56 g buněk na  $1 \text{ dm}^3$  gelu. Takto připravená směs buněk v PVA roztoku se kape na tvrdý podklad a následně se tato směs síťuje a tvaruje v proudu suchého vzduchu v gradientu teploty:  $80^\circ\text{C}$  až  $15^\circ\text{C}$ . Poté se imobilizáty, u kterých je poměr plochy a objemu imobilizátu minimálně  $7 \text{ mm}^{-1}$ , přenesou do roztoku síranu sodného (0,1 mol/l) na 30 až 60 minut.

Biomasa bakterií v imobilizátech se propaguje v 6 dm<sup>3</sup> laboratorním fermentoru vždy s 3 dm<sup>3</sup> sterilního kultivačního média v procesu fermentace následovně: 23 % obj. imobilizátu v kultivačním médiu se za stálého míchaní (80 ot./min.) vsádkovým způsobem kultivuje tak, že pH kultivačního média se upraví na 6,5 a spontánně se nechá poklesnout na pH=4,0 při teplotě 25°C. Tekutá fáze se odstraní a k imobilizátům se přidá čerstvé médium a proces se 1 krát zopakuje. Poté se tekutá fáze odstraní a k imobilizátům se přidá čerstvé médium a hodnota pH se upraví na 6,5 (1M roztokem NaOH). Poté se spontánní fermentací za stálého míchaní (80 ot./min.) nechá hodnota pH poklesnout na pH=5 a fermentace se následně provádí do vyčerpání glukózy. Tekutá fáze se odstraní, k imobilizovaným buňkám se přidá čerstvé médium a proces se zopakuje 6-krát. V takto připravených imobilizátech se zvýší sušina buněk na 65,8 g buněk/dm<sup>3</sup> gelu.

K takto připraveným imobilizovaným buňkám (450 g vlhkého biokatalyzátoru) se přidá 2,2 dm<sup>3</sup> sterilního produkčního média s obsahem glukózy 150 g.dm<sup>-3</sup> a pH=5,5. Fermentace probíhá v 5 l bioreaktoru za stálého míchaní (80 ot./min.), pH je udržováno přidávkem roztoku NaOH (2 mol/dm<sup>3</sup>) na hodnotě 5,0 při teplotě 30°C. Za 11 hodin fermentace obsahuje medium 73,8 g.dm<sup>-3</sup> etanolu, přičemž zbytková koncentrace glukózy je 1,8 g.dm<sup>-3</sup>. Specifická produktivita etanolu *Zymomonas mobilis* imobilizovaného do PVA nosiče přitom dosahuje 202 mg<sub>etanol</sub>/ml<sub>gel</sub>/h.

### Příklad 9

450 g vlhkých imobilizátů, připravených postupem uvedeným v příkladu 8, se přidá do 2,2 dm<sup>3</sup> produkčního média s obsahem glukózy 200 g.dm<sup>-3</sup> (pH=5,0). Fermentace probíhá vsádkovým způsobem, za stálého míchaní (80 ot./min.), pH je udržováno přidávkem roztoku NaOH (2 mol.dm<sup>-3</sup>) na hodnotě 5,0 při teplotě 30°C. Tímto postupem se provede 6 fermentací. Za 13 hodin je obsah etanolu v médiu po každé z konverzí min. 94,0 – 98,0 g.dm<sup>-3</sup> a zbytková glukóza je 3 až 8 g.dm<sup>-3</sup> (tj. 94 až 98 % teoretické výtěžnosti).

### Příklad 10

Použijí se imobilizáty připravené a propagované postupem uvedeným v příkladu 9. Ke 450 g imobilizátů se přidá 1050 ml produkčního média s koncentrací glukózy 150 g.dm<sup>-3</sup> (imobilizáty tvoří 30 % objemu fermentačního média). Fermentace probíhá vsádkovým způsobem, za stálého míchaní (80 ot./min.), pH je udržováno

přídavkem roztoku NaOH (2 mol/dm<sup>3</sup>) na hodnotě 5,0 při teplotě 30°C. Po poklesu koncentrace glukózy na hodnotu 20 g.dm<sup>-3</sup> se začne postupně dávkovat 1500 ml kultivačního média s koncentrací glukózy 320 g.dm<sup>-3</sup> takovou rychlostí, aby koncentrace zbytkové glukózy ve fermentoru se udržovala v rozmezí 15 až 30 g.dm<sup>-3</sup>. Za 20 hodin je obsah etanolu v médiu 113,5 g.dm<sup>-3</sup>, tj. 91 % teoretického výtěžku, zbytková glukóza je 4,6 g.dm<sup>-3</sup>.

#### Příklad 11

Použijí se imobilizáty *Z.mobilis* CCM 2770 připravené a propagované postupem uvedeným v příkladu 8. 450 g vlhkých imobilizátů se přenesou do 2,2 dm<sup>3</sup> kultivačního média s 150 g.dm<sup>-3</sup> glukózy, pH upraveným na hodnotu 5,0. Fermentace se provádí při pH =5,0 a teplotě 30°C. Po poklesu obsahu glukózy ve fermentoru na 10 až 20 g.dm<sup>-3</sup> se do fermentoru začne kontinuálně dávkovat kultivační médium s obsahem 150 g.dm<sup>-3</sup> glukózy a odebírat vyfermentované médium takovou zředovací rychlostí, aby koncentrace zbytkové glukózy ve fermentoru byla v rozmezí 17 až 30 g.dm<sup>-3</sup> a aktuální koncentrace etanolu v rozmezí 58 až 65 g.dm<sup>-3</sup>. Fermentace se provádí nepřetržitě 50 dní, přičemž objemová produktivita zařízení byla 30 g<sub>etanolu</sub>.dm<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>, což odpovídá specifické produkci etanolu 140 mg<sub>etanol</sub>/ml<sub>gel</sub>/h.

#### Příklad 12

Postup je analogický, jako v příkladě 8, jako produkční mikroorganismus se použije *Zymomonas mobilis* subsp. *pomacii* CCM 2771. Za 15 hodin fermentace obsahuje médium 68,3 g.dm<sup>-3</sup> etanolu, přičemž zbytková koncentrace glukózy je 6,8 g.dm<sup>-3</sup>.

Způsob výroby a použití výše jmenovaných nosičů pro přípravu invertního cukru ze sacharózových roztoků pomocí enkapsulované invertázy v polyvinylalkoholovém gelu bude objasněno v následujících příkladech.

#### Příklad 13

Připraví se roztok PVA, který obsahuje 100 g PVA (polyvinylalkohol), 60 g PEG (polyetylen glykol), 790 g destilované vody. Do takto připraveného roztoku se přidá 50 ml enzymového preparátu Invertase (Sigma) (koncentrace enzymu 100 g/l). Takto připravená směs enzymu v PVA roztoku se kape na tvrdý podklad a následně se tato

směs síťuje a tvaruje v proudu suchého vzduchu v gradientu teploty: 80 – 15°C. Potom se imobilizáty u kterých je poměr plochy a objemu imobilizátu minimálně 7 mm<sup>-1</sup>, přenesou do roztoku síranu sodného (0,1 mol/l) na 10 až 120 minut. Připravené imobilizáty se mohou uskladnit v 10 mM acetátovém pufrůvacím roztoku (pH = 4,5) při teplotě 4°C.

Takto připravený imobilizovaný enzym se může použít na proces hydrolýzy sacharózy rozpuštěné v 10 mM acetátovém pufru s pH = 4,5. K 1000 ml sacharózového roztoku (100 g/l) se přidá 120 g imobilizované invertázy. Hydrolýza probíhá za stálého míchání (80 ot./min.) vsádkovým způsobem při teplotě 30°C. Za 50 min hydrolýzy je sacharóza kompletně hydrolyzovaná na glukózu a fruktózu.

#### **Příklad 14**

120 g vlhkých imobilizátů, připravených postupem uvedeným v příkladu 13, se přidá do 1000 ml sacharózového roztoku o koncentraci 450 g/l (pH=4,5, acetátový pufr 10 mM) při teplotě 30°C. Hydrolýza probíhá vsádkovým způsobem, za stálého míchání. Tímto způsobem za 360 minut je zbytková koncentrace sacharózy 10,1 g/l.

#### **Příklad 15**

120 g vlhkých imobilizátů, připravených postupem uvedeným v příkladu 13, se přidá do 1000 ml sacharózového roztoku o koncentraci 280 g/l (pH=4,5, acetátový pufr 10 mM) při teplotě 30°C. Hydrolýza probíhá vsádkovým způsobem, za stálého míchání. Tímto způsobem za 240 minut je zbytková koncentrace sacharózy 1,8 g/l. Tekutá fáze se po hydrolýze odstraní, a imobilizovaná invertáza se použije na opakované vsádkové hydrolýzy výše popsaným postupem. Po 6 konverzích je zbytková koncentrace sacharózy po 240 min hydrolýzy 3 g/l.

#### **Příklad 16**

Použijí se imobilizáty připravené postupem uvedeným v příkladu 13. 25 g vlhkých imobilizátů se přenesou do 0,5 l melasy s koncentrací sacharózy 120 g/l, pH 4,5 (upravené H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Hydrolýza probíhá při pH = 4,5, teplotě 30°C a míchání 200 ot/min. Po poklesu sacharózy ve fermentoru na 30 až 40 g/l se do fermentoru začne kontinuálně dávkovat melasa s koncentrací 120 g/l a odebírat hydrolyzované médium takovou rychlostí, aby byla koncentrace sacharózy 30 až 40 g/l (66 až 75 %

konverze). Při takovémto režimu hydrolýzy je specifická aktivita imobilizátu 0,35 g/g.h (g rozštěpené sacharózy na g imobilizátu za h).

### Příklad 17

Použijí se imobilizáty připravené postupem uvedeným v příkladu 13. 25 g vlhkých imobilizátů se přenesou do 0,5 l melasy s koncentrací sacharózy 120 g/l, pH 4,5. Hydrolýza probíhá při pH = 4,5, teplotě 45°C a míchání 200 ot/min. Po poklesu sacharózy v fermentoru na 30 až 40 g/l se do fermentoru začne kontinuálně dávkovat melasa s koncentrací 120 g/l a odebírat hydrolyzované médium takovou rychlostí, aby byla koncentrace sacharózy 30 až 40 g/l (66 až 75 % konverze). Při tomto režimu hydrolýzy, která se provádí nepřetržitě 500 h je specifická aktivita imobilizátu 0,55 až 0,60 g/g.h (g rozštěpené sacharózy na g imobilizátu za h).

Způsob výroby a použití výše jmenovaných nosičů v procesu výroby glukózy ze škrobových hydrolyzátů pomocí enkapsulované glukoamylasy v polyvinylalkoholovém gelu bude objasněno v následujících příkladech.

### Příklad 18

Připraví se roztok PVA, který obsahuje 100 g PVA (polyvinylalkohol), 60 g PEG (polyetylglykol), 790 g destilované vody. Do takto připraveného roztoku se přidá 50 ml enzymového preparátu SUN Ultra L (Novozymes). Takto připravená směs enzymu v PVA roztoku se kape na tvrdý podklad a následně se tato směs želíruje a tvaruje v proudu suchého vzduchu při gradientu teploty: 80 - 15°C. Potom se imobilizáty u kterých je poměr plochy a objemu imobilizátu minimálně 7 mm<sup>-1</sup>, přenesou do roztoku síranu sodného (0,1 mol/l) na 10-120 minut. Připravené imobilizáty se mohou uskladnit v 30 % hmot. glukóze, rozpuštěné v 10 mM acetátovém pufrovací roztoku (pH = 4,5) při teplotě 4°C.

Tímto způsobem připravený imobilizovaný enzym se použije na hydrolýzu škrobového hydrolyzátu, např. maltóзовého sirupu (složení: vyšší sacharidy 33%, maltotrióza 20 %, maltóza 53 %, glukóza 4 %), rozpuštěného do 10 mM acetátového pufrovacího roztoku s pH = 4,5. K 1000 ml takto připraveného roztoku s koncentrací sacharidů 100 g/l se přidá 120 g imobilizované glukoamylázy. Hydrolýza probíhala za

stálého míchání (200 ot./min.) vsádkovým způsobem při teplotě 30°C. Po 60 minutách hydrolýzy médium obsahuje 70 až 80 g/l glukózy.

#### **Příklad 19**

K 200 g vlhkých imobilizátů, připravených postupem uvedeným v příkladu 18 se přidá 5000 ml maltózového média o koncentraci 250 g sacharidů/l (pH=4,5) při teplotě 40°C. Hydrolýza probíhá vsádkovým způsobem, za stálého míchání. Tímto způsobem za 6 hodin vznikne 180 g/l glukózy. Tekutá fáze se po hydrolýze odstraní, a imobilizovaná glucoamyláza se použije na opakované vsádkové hydrolýzy výše uvedeným postupem. Po 6. konverzi je koncentrace vyprodukované glukózy po 6 hodinách hydrolýzy 178 g/l.

#### **Příklad 20**

Použijí se imobilizáty připravené postupem uvedeným v příkladu 18. 25 g vlhkých imobilizátů se přenesou do 0,5 l maltózového sirupu o koncentraci sacharidů 100 g/l, pH 4,5. Hydrolýza probíhá při pH = 4,5, teplotě 30°C a míchání 200 ot/min. Po nárůstu koncentrace glukózy ve fermentoru na 55 až 65 g/l se do fermentoru začne kontinuálně dávkovat maltózový sirup s koncentrací sacharidů 100 g/l a odebírat hydrolyzované médium takovou rychlostí, aby byla koncentrace glukózy 50 až 60 g/l (50 až 60%-ní konverze). V tomto režimu hydrolýzy která se provádí nepřetržitě 900 h je specifická aktivita imobilizátu 0,3 až 0,4 g/g.h (g vyprodukované glukózy na g imobilizátu za h).

#### **Příklad 21**

Použijí se imobilizáty připravené postupem uvedeným v příkladu 18. 25 g vlhkých imobilizátů se přenesou do 0,5 l maltózového sirupu o koncentraci sacharidů 100 g/l, pH 4,5. Hydrolýza probíhá při pH = 4,5, teplotě 45°C a míchání 200 ot/min. Po nárůstu koncentrace glukózy ve fermentoru na 55 až 65 g/l se do fermentoru začne kontinuálně dávkovat maltózový sirup s koncentrací 100 g/l a odebírat hydrolyzované médium takovou rychlostí, aby byla koncentrace glukózy 60 až 70 g/l (60 až 70 %-ní konverze). V tomto režimu hydrolýzy která se provádí nepřetržitě 1500 h je specifická aktivita imobilizátu 0,55 až 0,6 g/g.h (g vyprodukované glukózy na g imobilizátu za h).

**Příklad 22**

Použijí se imobilizáty připravené postupem uvedeným v příkladu 18. Na konverze se použije médium o složení: Maltózový sirup s koncentrací sacharidů 195 g/l, kvasničný extrakt 5 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/l rozpuštěné v destilované vodě, pH = 4,5. K 1 l takto připravenému sterilnímu médiu se přidá 50 g imobilizátu s imobilizovanou glukoamylázou. Suspenze je očkovaná s 10 % vol. inokula *Zymomonas mobilis* v exponenciální fázi růstu mikroorganismu. V procesu hydrolýzy dochází k simultánní utilizaci vznikající glukózy a k produkci etanolu pomocí mikroorganismu. Tímto způsobem se za 13,5 h vyprodukuje 70 g/l etanolu.

**Příklad 23**

Použijí se imobilizáty připravené postupem uvedeným v příkladu 18. Na konverze se použije médium o složení: Maltózový sirup s obsahem sacharidů 80 g, 10 g kvasničný extrakt, 1g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05g  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,01g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  rozpuštěné v 1 l destilované vody, pH = 6,0. K 1 l takto připravenému sterilnímu médiu se přidá 50 g imobilizátu s imobilizovanou glukoamylázou. Suspenze je očkovaná s 5 % vol. spórové suspenze *Bacillus coagulans*. V procesu hydrolýzy dochází k simultánní utilizaci vznikající glukózy a k produkci kyseliny mléčné pomocí mikroorganismu. Po 24 hodinách fermentace je v médiu 55,2 g/l kyseliny mléčné a 1,2 g/l glukózy.

Způsob výroby a použití výše jmenovaných nosičů v procesu hydrolýzy laktosových roztoků, přípravě D-galaktosy, D-glukosy a galaktooligosacharidů pomocí enkapsulované  $\beta$ -galaktosidasy v polyvinylalkoholovém gelu bude objasněno v následujících příkladech.

**Příklad 24**

Připraví se roztok PVA, který obsahuje 100 g PVA (polyvinylalkohol), 60 g PEG (polyetylglykol), 790 g destilované vody. Do takto připraveného roztoku se přidá 50 ml enzymového preparátu Lactozyme (Novozymes). Takto připravená směs enzymu v PVA roztoku se kape na tvrdý podklad a následně želíruje a tvaruje v proudu suchého vzduchu při gradientu teploty: 80 - 15°C. Potom se imobilizáty u kterých je poměr plochy a objemu imobilizátu minimálně 7 mm<sup>-1</sup>, přenesou do roztoku

fosfátového pufru draselném (pH=6,5) na 10-120 minut. Připravené imobilizáty se mohou uskladnit v roztoku fosfátového pufru (pH=6,5) s přídavkem etanolu 5-10 % při teplotě 4°C.

Tímto způsobem připravený imobilizovaný enzym má počáteční aktivitu  $900 \pm 100 \text{ U.cm}^{-3}$ .

### Příklad 25

Použijí se imobilizáty připravené postupem uvedeným v příkladu 24. Na hydrolýzu se použije roztok laktózy v 0,1 M fosfátovém pufru s pH = 6,5 a přídavkem 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . K 1000 ml takto připraveného roztoku s koncentrací laktózy 100 g/l se přidá 130 g imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy. Hydrolýza probíhá za stálého míchání (200 ot./min.) vsádkovým způsobem při teplotě 30°C. Tekutá fáze se po hydrolýze odstraní a imobilizovaná  $\beta$ -galaktosidasa se použije na opakované vsádkové hydrolýzy výše uvedeným postupem. Po 210 minutách hydrolýzy médium obsahuje 13 až 2 g/l laktózy.

### Příklad 26

Použijí se imobilizáty připravené postupem uvedeným v příkladu 24. Na hydrolýzu se použije roztok laktózy v 0,1 M fosfátovém pufru s pH = 6,5 a přídavkem 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . K 1000 ml takto připraveného roztoku s koncentrací laktózy 100 g/l se přidá 130 g imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy s počáteční aktivitou  $786 \text{ U.cm}^{-3}$ . Hydrolýza probíhá za stálého míchání (200 ot./min.) vsádkovým způsobem při teplotě 30°C. Délka konverze byla konstantní. Po 25 batch hydrolýzách, které trvaly celkově 160 hodin, byl pozorován pokles aktivity imobilizátu o 5 -10%.

Uspořádání licího zařízení pro výrobu imobilizátů na bázi polyvinylalkoholového nosiče uváděných na příkladech výše bude vysvětleno níže. Je zřejmé, že uvedený popis je ilustrativním vyjádřením aplikace principů tohoto vynálezu.

Popisované konstrukční provedení licího zařízení pro výrobu imobilizátů na bázi polyvinylalkoholového nosiče v provedení pro průmyslovou, kontinuální výrobu je zobrazeno na obr. 1. Konstrukční provedení zahrnuje kapací, licí mechanismus, uspořádaný před horním sušícím kanálem 2, jenž tvoří kapací, licí hlava nebo

hlavy 17, které jsou dvouřadé se dvěma řadami licích jehel a jsou napojeny na tlakový temperovaný zásobník 15 a kompresor nebo zásobník tlakového vzduchu 16. Horní sušící kanál 2, jímž prochází nekonečný pásový dopravník 1 s řízeným pohonem, je opatřen systémem sušení, který tvoří zdroj 4 sušícího vzduchu, ze kterého přes pomocný první ventilátor 19 je odvlhčený vzduch dopravován do vzduchotechnického rozvodu 6 se vřazenými topnými tělesy 5 a ústícím na několika místech do horního sušícího kanálu 2. Po výstupu z horního sušícího kanálu nekonečný pás 1 prochází rebotnací vanou 7 a dosušovacím kanálem 3 umístěným na opačné, dolní straně licího zařízení, do něhož je na straně jedné zaústěno potrubí s druhým pomocným ventilátorem 20 pro dopravu sušícího vzduchu z horního sušícího kanálu, používaného na dosušení pásu po výstupu z oplachového boxu 13 a na straně druhé vyústěn výstup 18 odpadního vlhkého vzduchu. Mezi rebotnací vanou 7 s roztokem rebotnacích solí 24 a dosušovacím kanálem 3 je jednak uspořádáno stírací, sběrné zařízení 9 konstruované na principu mechanického stírání a vysokotlakého ostřiku, jenž je spojeno potrubím s vřazeným vysokotlakým čerpadlem 10 a nízkotlakým čerpadlem 11 a ústícím do sběrné vany 8 s roztokem rebotnacích, sběrných solí 24 opatřené chlazením a jednak oplachový box 13 pro očišťování nosného nekonečného pásu 1 pomocí trysek napojených na nízkotlaké čerpadlo 14, jenž je spojeno pomocí potrubí s oplachovou vanou 12 obsahující demineralizovanou vodu.

Funkce zařízení pro výrobu imobilizátů na bázi polyvinylalkoholového nosiče je následující: Na nekonečně dlouhý nosný pás 1 s řízeným pohonem, který prochází horním sušícím kanálem 2 se z kapacího, licího mechanismu, tvořeného dvěma licími hlavami 17 opatřenými dvěma řadami licích trysek o průměru 0,1 až 2,00 mm, jež pulzují pomocí elektromagnetů různou frekvencí a délkou pulsů nanáší nebo lije směs polyvinylalkoholového gelu a biologického materiálu. Směs na kapání, lití se dávákuje do tlakového temperovaném zásobníku 15, který je napojen na kompresor nebo zásobník tlakového vzduchu 16. Sušení směsi na nosném pásu 1 zajišťuje vzduch zbavený vlhkosti-vody, získaný z kontinuálního atmosférického odvlhčovače 4, který prochází přes první pomocný ventilátor 19 a topná tělesa 5 uspořádaná v rozvodném vzduchotechnickém potrubí 6, které slouží na řízení gradientu teploty v horním sušícím kanále, jenž je vyvedeno do jednotlivých segmentů horního sušícího kanálu 2. Vysušená směs přilnulá, nalepená na nekonečném nosném pásu 1 dále prochází rebotnací vanou 7 s roztokem rebotnacích solí za níž jsou výrobky, tj.

imobilizáty na bázi polyvinylalkoholového nosiče oddělovány ve sběracím, stíracím zařízení 9. Pro účinnější oddělování je toto zařízení opatřeno systémem pro dodávku vysokotlaké vody, jenž tvoří s vysokotlaké čerpadlo 10 a trysky a tento systém je napojen na samostatný okruh. Oddělování výrobků od nosného pásu 1 se děje pomocí polymerní stírací lišty a trysek vodným roztokem solí dodávaných vysokotlakým čerpadlem 10. Po odpadnutí výrobku do sběrné vany 8 s chlazením je nosný pás 1 dočišťován pomocí trysek uspořádaných v oplachovém boxu 13 nízkotlakým čerpadlem 14 a oplachová demineralizovaná voda je jímána v oplachové vaně 12, kam stéká z oplachového boxu 13. Systém dodávky nízkotlaké vody pro oplach nosného pásu 1 je napojen na samostatný okruh. Vlhký nosný pás 1 je poté dosušován v dolním sušicím kanálu 3 do něhož je vháněn sušící vzduch z horního sušícího kanálu potrubím v němž je zabudován druhý pomocný ventilátor 20, přičemž vlhký odpadní vzduch je z dolního sušícího kanálu 3 odváděn přes výstup 18 odpadního vlhkého vzduchu.

Konstrukce rebotnací vany je znázorněna na obr.2. Rebotnací vana 7 v tomto provedení zahrnuje vanu 21 se šikmým dnem, v jehož nejnižším bodě je uspořádán výpustný kohout 22 na vypouštění produktu a roztoku rebotnacích solí. Vanou 21 prochází nosný pás 1 vedený dvojicí vodících válců 23, jenž současně vymezují ponor nosného pásu 1 do rebotnacího vodného roztoku solí 24, kterým je vana 21 naplněna.

Konstrukce stíracího, sběrného zařízení 9 je znázorněna na obr.3. Stírací, sběrné zařízení 9 v tomto provedení tvoří boční rám 25, v němž je uspořádána mechanická polymerní stěrka umístěná na nerezovém přitlačném mechanismu 27 s pružinovým přitlačným mechanismem 28. Tento pružinový přitlačný mechanismus 28 tvoří šroub 34 regulace přitlaku s podložkami, na němž je souose uložena pružina 35. Stírací, sběrné zařízení 9 dále tvoří vysokotlaké trysky 26 upevněné na nosném nerezovém trubkovém rozvodu uchyceném v rámu 25 a umožňující ostřík pod úhlem 45° až 80°. Nerezový trubkový rozvod 30, je opatřen výškovou regulací, kterou zajišťují regulační šrouby 31. Pro čištění vnitřní strany nosného pásu 1 je na jeho vnitřní i vnější straně za mechanickou stěrkou 27 napevno uspořádána dolní a horní stěrka 29 s polymerními kartáči 32, která je upevněna v horním rámu 33, přičemž nosný pás 1 je veden mezi těmito stěrkami. Pro dočišťování vnitřní i vnější strany

nosného pásu 1 v místě jeho výstupu z rámu 25 je tento opatřen dolní i horní polymerní stěrkou 29.

Funkce stíracího, sběrného zařízení 9 se osazuje na výrobní linku za rebotnací vanu 7, kterou nosný pás 1 opouští již v dolní části zařízení, tedy protisměru. Je nasnadě, že výrobek, který byl v horní části zařízení na nosný pás 1 nanesen je nyní v obrácené vertikální poloze. Způsob jeho odstranění z nosného pásu 1 spočívá v tom, že mechanická stěrka 27 i vysokotlaké trysky 26 v součinnosti působí na výrobek přilnutý na vnější straně nosného pásu 1. Výrobek na nosném pásu 1 je veden nejprve na vysokotlaký ostřík, kde pomocí tlakového rozvodu vodného roztoku solí jež dodávají tlakové trysky 26, které působí pod úhlem 40° až 80° proti mechanické stěrce 27 s pružinovým přitlačným mechanismem 28, jejíž sklon vůči nosnému pásu 1 je v rozmezí 5° až 15° také regulovatelný. Za odpruženou mechanickou polymerní stěrkou 27 na nerezovém přitlačném mechanismu 28 je uspořádána dolní i horní napevno umístěná stěrka 29 s polymerními kartáči, která zároveň dočišťuje nosný pás 1 z jeho vnitřní i vnější strany. Nosný pás 1 opouští rám 25 přes dolní a horní polymerní stěrku 29, kterou je tento dočišťován z obou stran.

Konstrukce oplachového boxu 13 je znázorněna na obr.4. Oplachový box 13 v tomto provedení tvoří vzájemně spojený horní díl 36 s víkem 43 a spodní díl 37 s odtokem 38 mezi nimiž prochází nosný pás 1, přičemž tyto díly jsou připojeny k rámu 39 licího stroje. Dále je v horním dílu 36 uspořádána horní oplachová tryska 40 napojená na přívodní trubku 41 oplachové vody a stejně tak je ve spodním dílu 37 uspořádána spodní oplachová tryska 42 napojení na přívodní trubku 41. Pro stírání vody z nosného pásu 1 jsou na obou bocích horního dílu 36 upevněny stavitelné polymerní stěrky 44 a stejně tak jsou na obou bocích spodního dílu 37 upevněny stěrky 45. Oplachovací box 13 je k rámu 39 licího stroje prostřednictvím horního a spodního montážního segmentu 46 a 47.

### Průmyslová využitelnost

Vynález je využitelný při výrobě imobilizátů, jenž jsou určeny pro aplikace v potravinářství, farmacii a na čištění odpadních vod, zejména při biologickém odstraňování sloučenin dusíku z pitných, užitkových vod a odpadních vod (splaškových, zemědělských, municipálních, průmyslových odpadních vod), ve kterých jsou různé přítomné dusíkaté sloučeniny konvertovány na plynný dusík fyziologickým působením nitrifikačních a denitrifikačních bakterií, dále při procesu výroby kyseliny mléčné, výroby ethanolu, výroby glukósových a glukoso-fruktosových sirupů, hydrolýze laktosy na D-galaktosu a výrobu galaktooligosacharidů,. Tyto jsou vyráběny na zařízení umožňujícím nepřetržitou průmyslovou výrobu s kapacitou 1 až 10 kg imobilizátů obchodní značky LentiKats za hodinu.

Zařízení na výrobu imobilizátů, jenž jsou určeny pro aplikace v potravinářství, farmacii a na čištění odpadních vod, je využitelné při nepřetržité výrobě.

25.10.08

## PATENTOVÉ NÁROKY

2006 645

1. Způsob průmyslové výroby biokatalyzátorů s biologicky aktivním materiálem ve formě imobilizovaných enzymů nebo mikroorganismů, které jsou imobilizovány v polyvinylalkoholovém gelu a jejich použití, **vyznačující se tím**, že pro jejich průmyslovou výrobu se použije aktivní biologický materiál tvořený směsí volného nativního, nebo předem upraveného agregovaného enzymového katalyzátoru, nebo produkčního mikroorganismu, anebo jejich částí a polyvinylalkoholového gelu, poté se tato směs želíruje a tvaruje v proudu sušícího vzduchu v teplotním rozmezí 80 až 15°C se zřetelem k rozměru biologicky aktivního materiálu při zachování poměru geometrického povrchu k objemu biokatalyzátoru větším než  $7 \text{ mm}^{-1}$ , a následně se takto vyrobené biokatalyzátory mohou kultivovat nebo skladovat a poté se použijí v biotechnologických procesech za podmínek zaručujících danému biotechnologickému procesu vyšší produktivitu, vyšší produkční a enzymatickou stabilitu, dlouhodobé a opakované použití, či definovatelné řízení procesu s následnou snadnou separací biokatalyzátoru.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že průmyslově vyrobený biokatalyzátor se opakovaně použije při opakovaných batch (vsádkových) fermentacích nebo opakovaných fed-batch (přítokovaných vsádkových) nebo v kontinuálních fermentacích.

3. Způsob podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že pro přípravu biokatalyzátoru určeného pro proces odstraňování dusíkatého znečištění z odpadních vod se do polyvinylalkoholového gelu uzavřou nitrifikační mikroorganismy a biokatalyzátor se vytvaruje do tvaru čoček nebo pásků a následně se imobilizáty kultivují ve vodném živném médiu s obsahem dusíkatého substrátu 50 – 500 mg/l  $\text{N-NH}_4$ , při pH 7,0, při teplotě 20 až 35°C a koncentraci rozpuštěného kyslíku větší než 1,5 mg/l.

4. Způsob podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že pro přípravu biokatalyzátoru určeného pro proces odstraňování dusíkatého znečištění z odpadních vod se do polyvinylalkoholového gelu uzavřou denitrifikační

mikroorganismy a biokatalyzátor se vytvaruje do tvaru čoček nebo pásků a následně se imobilizáty kultivují ve vodném živném médiu s obsahem dusíkatého substrátu 50-500 mg/l  $\text{N-NO}_3$ , pH 7,8, při teplotě 20 až 35°C a v přítomnosti methanolu jako C-substrátu v případě denitrifikačních mikroorganismů.

5. Způsob podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že pro přípravu biokatalyzátoru určeného pro proces výroby etanolu ze sacharidických substrátů se do polyvinylakoholového gelu uzavřou anaerobní bakterie *Zymomonas mobilis* a biokatalyzátor se vytvaruje do tvaru čoček nebo pásků a následně se imobilizáty kultivují ve vodném živném médiu s obsahem 2 až 25% hmot. sacharidického substrátu při teplotě 20 až 40°C a hodnotě pH 3,5 až 7,0 v přítomnosti etanolu v rozmezí 1 až 15% hmot.

6. Způsob podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že pro přípravu biokatalyzátoru určeného pro proces výroby kyseliny mléčné ze sacharidických substrátů se do polyvinylakoholového gelu uzavře termofilní bakterie *Bacillus coagulans* a biokatalyzátor se vytvaruje do tvaru čoček nebo pásků a následně se imobilizáty kultivují ve vodném živném médiu s obsahem 2 až 14% hmot. sacharidického substrátu při teplotě 30 až 60°C a hodnotě pH 5,0 až 7,5 v přítomnosti kyseliny mléčné nebo jejích solí v rozmezí 1 až 12% hmot.

7. Způsob výroby podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se na produkci výhodně použije kmen *Bacillus coagulans* CCM 4318.

8. Způsob podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že pro přípravu biokatalyzátoru určeného pro proces hydrolýzy škrobnatých a celulosových substrátů se do polyvinylakoholového gelu uzavře enzym *glukoamyláza* a biokatalyzátor se vytvaruje do tvaru čoček nebo pásků.

9. Způsob podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že pro přípravu biokatalyzátoru určeného pro proces hydrolýzy sacharózových substrátů se do polyvinylakoholového gelu uzavře enzym *invertáza* a biokatalyzátor se vytvaruje do tvaru čoček nebo pásků.

10. Způsob podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že pro přípravu biokatalyzátoru určeného pro proces hydrolýzy laktosy a přípravu D-galaktosy, D-glukosy a galaktooligosacharidů se do polyvinylalkoholového gelu uzavře enzym  $\beta$ -galaktosidasa a biokatalyzátor se vytvaruje do tvaru čoček nebo pásků.

11. Způsob podle nároků 1 nebo 2 nebo 9, **vyznačující se tím**, že se takto imobilizovaný enzym se použije na hydrolýzu sacharózových roztoků s obsahem 2 až 50% hmot. sacharidického substrátu při teplotě od 20 do 50°C a hodnotě pH 3,5 až 7,0.

12. Způsob použití enkapsulované glukoamylázy v polyvinylalkoholovém gelu při přípravě D-glukózy podle 1 nebo 2 nebo 8, **vyznačující se tím**, že se takto imobilizovaný enzym použije na hydrolýzu vyšších sacharidů připravených částečnou hydrolýzou škrobu s obsahem 2 až 40% hmot. sacharidického substrátu při teplotě 20 až 45°C a hodnotě pH 3,5 až 7.

13. Způsob použití podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že se imobilizovaná glukoamyláza použije na sacharifikaci škrobnatého substrátu v procesu fermentační produkce etanolu.

14. Způsob použití podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že se imobilizovaná glukoamyláza použije na sacharifikaci škrobnatého substrátu v procesu fermentační produkce kyseliny mléčné.

15. Způsob použití enkapsulované  $\beta$ -galaktosidasy v polyvinylalkoholovém gelu na přípravu D-galaktosy, D-glukosy a galaktooligosacharidů podle nároků 1 nebo 2 nebo 10, **vyznačující se tím**, že se takto imobilizovaný enzym použije na hydrolýzu roztoků laktosy s obsahem 2 až 40% hmot. sacharidického substrátu při teplotě 20 až 60°C a hodnotě pH 3,5 až 7.

16. Produkční průmyslové zařízení umožňující optimalizaci objemu a plochy biologického nosiče v závislosti na rozměrech biologicky aktivního materiálu obsahující lici mechanismus (17) uspořádaný před sušícím kanálem (2), kterým prochází nekonečný nosný pás (1) podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že je

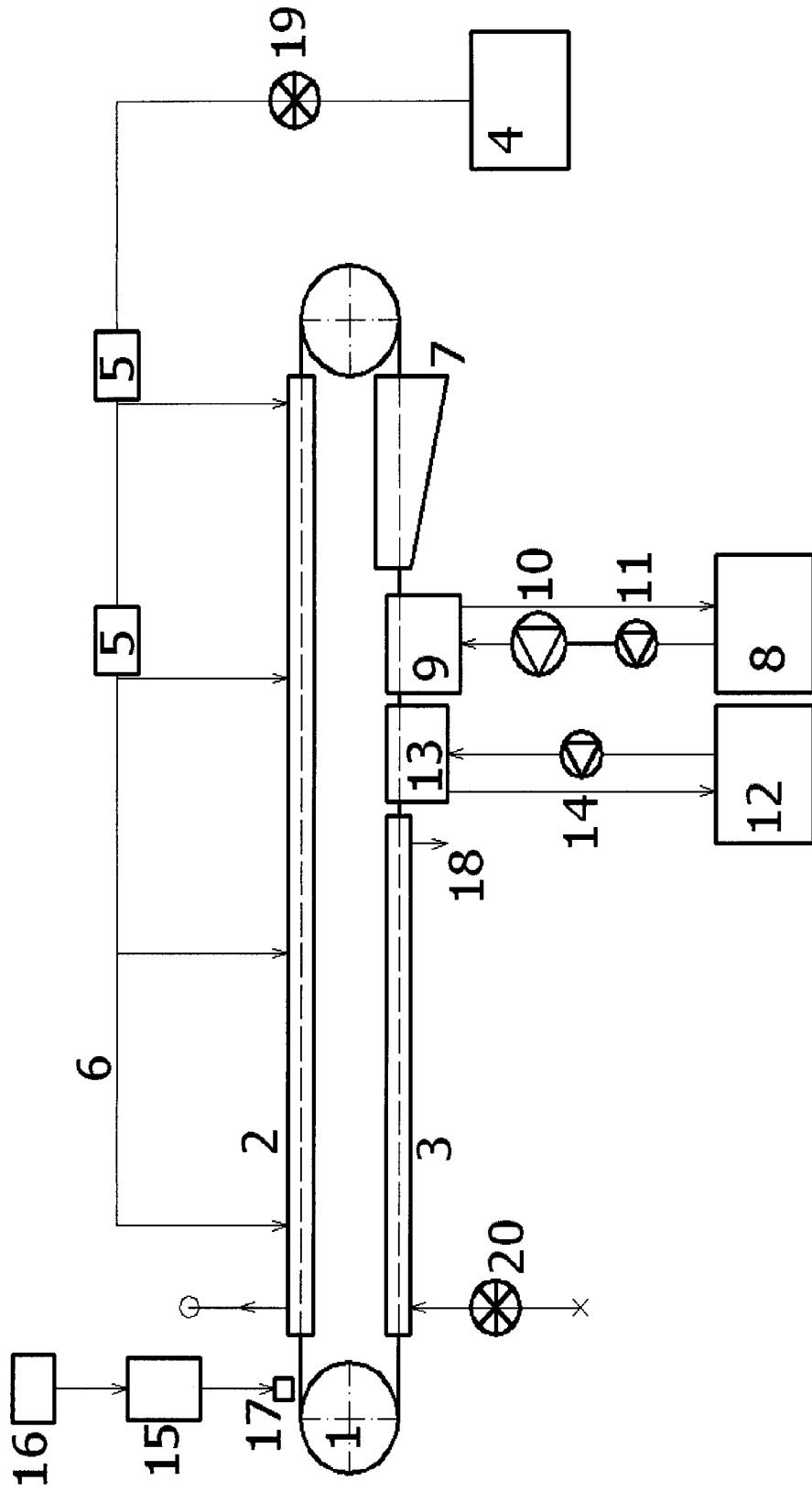
opatřeno alespoň jednou licí hlavou (17) opatřenou dvěma řadami licích jehel, která je napojena na tlakový temperovaný zásobník (15) a kompresor (16), nosným pásem (1) a systémem sušení, jenž tvoří zdroj (4) sušícího vzduchu prostřednictvím ventilátoru dopravovaného do vzduchotechnického rozvodu (6) s vřazenými topnými tělesy (5) a ústícím do horního sušícího kanálu (2), dále dolním dosušovacím kanálem (3) a rebotovací vanou (7), mezi nimiž je uspořádáno stírací a sběrné zařízení (9) konstruované na principu mechanického stírání a vysokotlakého ostříku, jenž je spojeno potrubím s vřazeným vysokotlakým čerpadlem (10) a nízkotlakým čerpadlem (11) a ústícím do sběrné vany (8) s chlazením a dále oplachový box (13) pro očišťování nosného nekonečného pásu (1) pomocí trysek napojených na nízkotlaké čerpadlo (14), jenž je spojeno pomocí potrubí s oplachovou vanou (12).

17. Produkční průmyslové zařízení podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že jeho sběrné zařízení (9) tvoří rám (25), v němž je uspořádána mechanická stěrka (27) s pružinovým přitlačným mechanismem (28) a vysokotlaké trysky (26) upevněné v rámu (25) pod úhlem 45° až 80°, přičemž pro čištění vnitřní strany nosného pásu (1) je na jeho na vnitřní straně a proti mechanické stěrce (27) napevno uspořádána horní stěrka (29) s kartáčem a pro dočišťování nosného pásu (1) v místě jeho výstupu z rámu (25) je tento opatřen dolní stěrkou (29).

25.10.08

2006-645

1/4



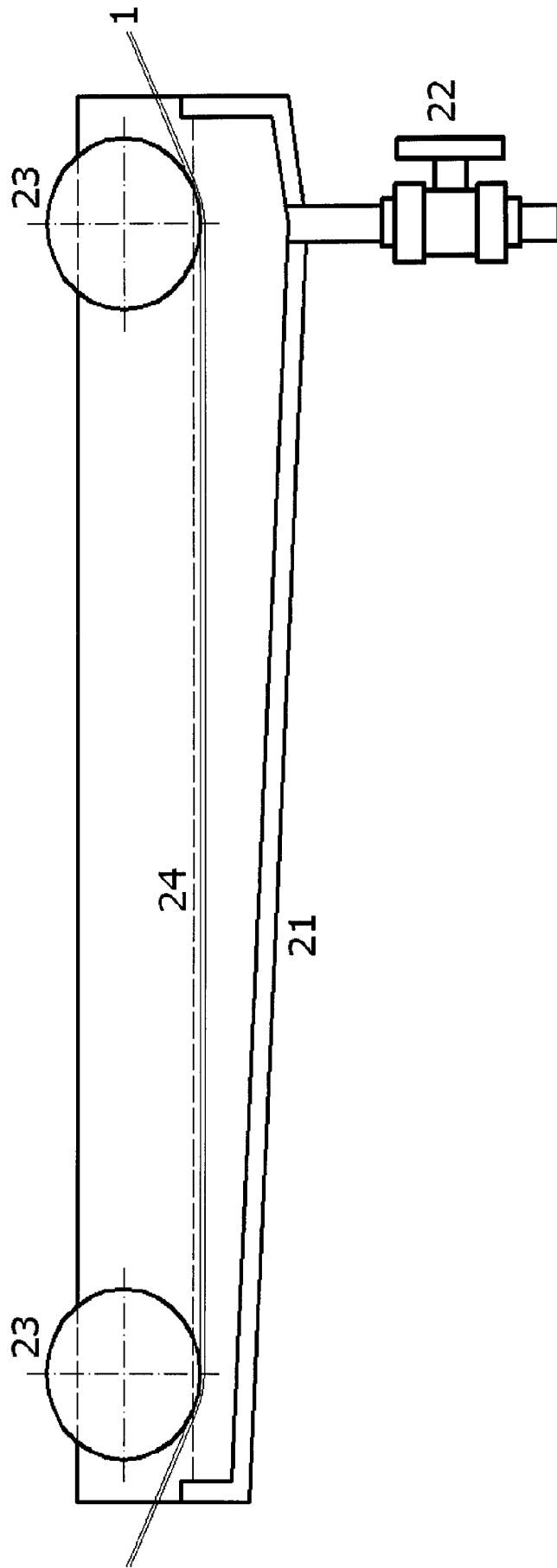
Obr. 1

~~25~~

25.10.08

2006-645

2/4



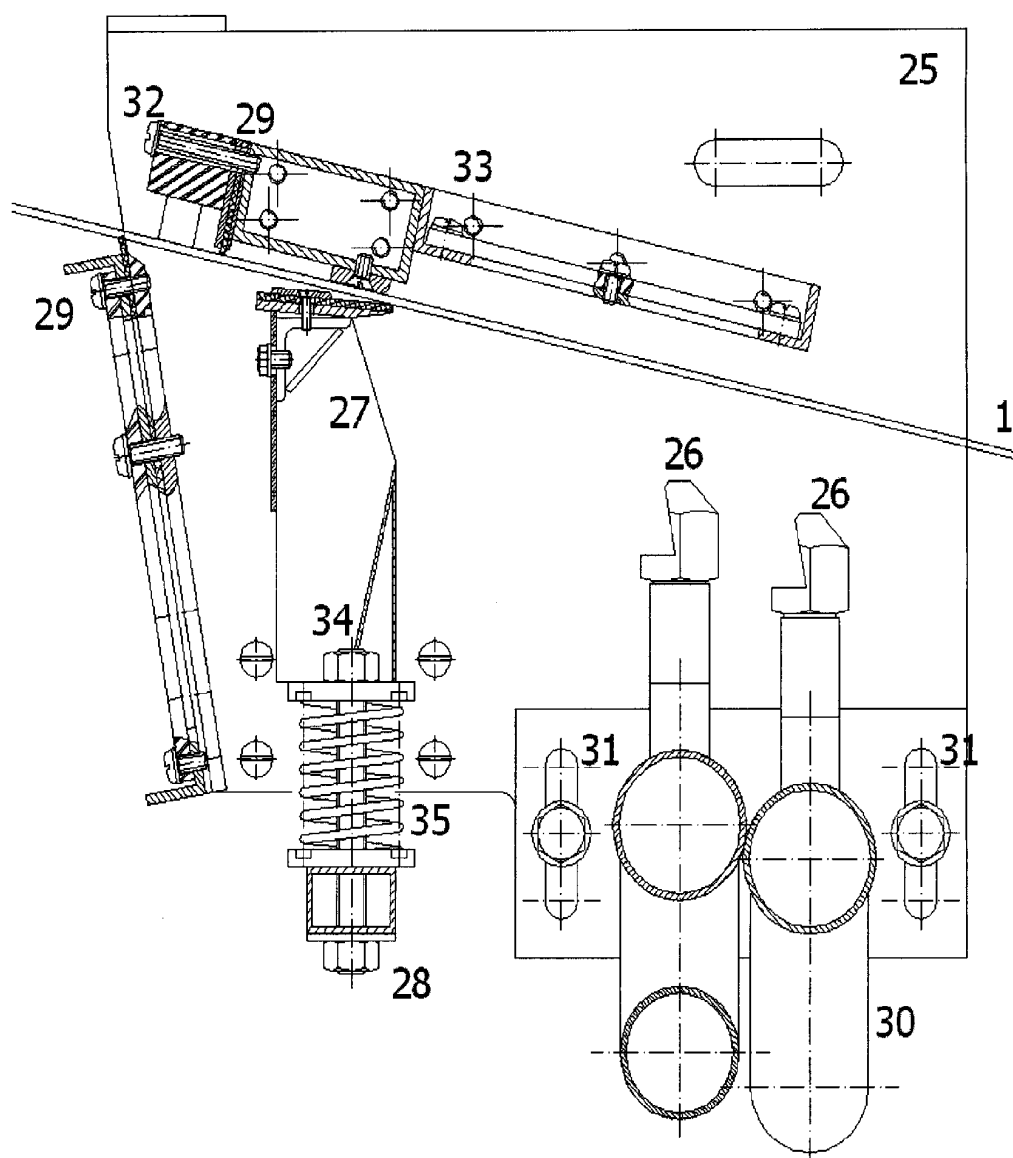
Obr.2

~~4x~~

3/4

25.10.06

2006-645

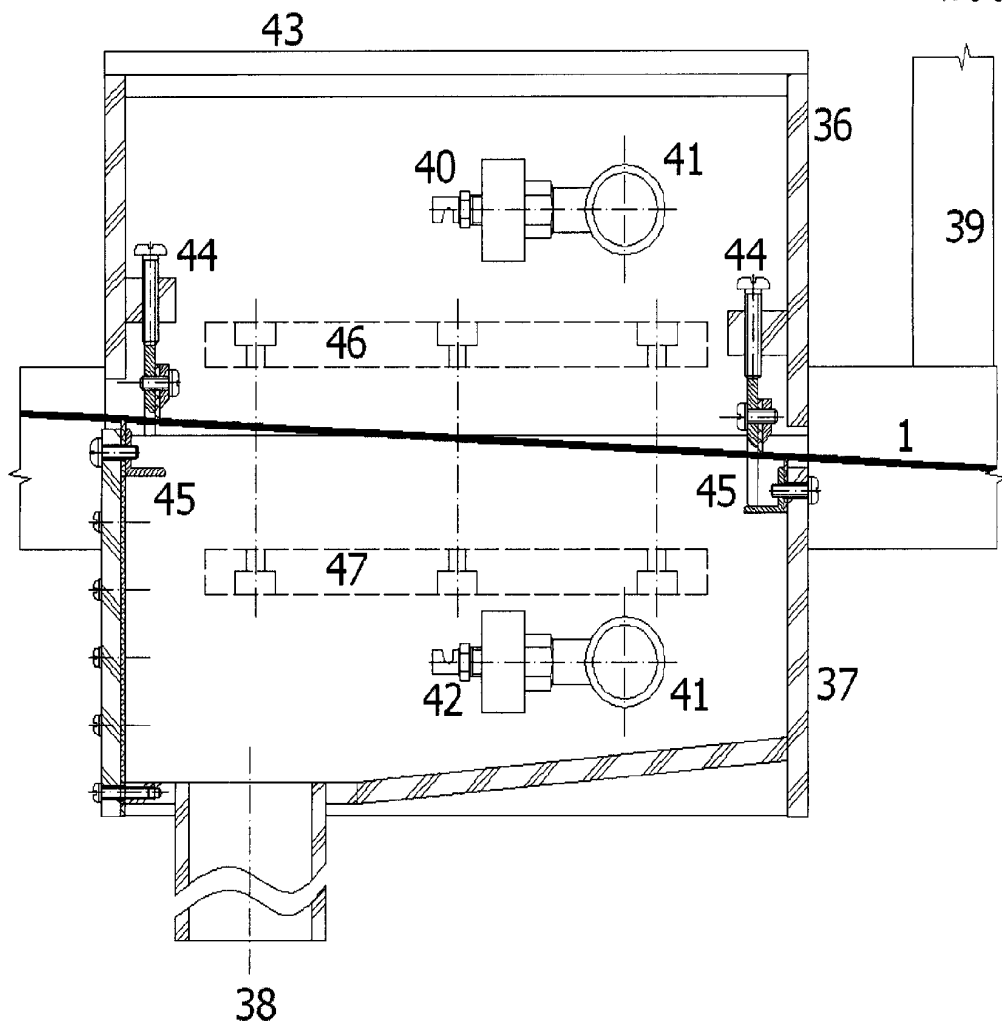


Obr. 3

4/6

25.10.06

2006-645



Obr. 4