

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 536

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 1/02

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02.08.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **14.08.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/9919187**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.05.2002**
(Věstník č. 5/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP00/07466**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/12778**

(71) Přihlašovatel:

**CIBA SPECIALTY CHEMICALS WATER
TREATMENTS LIMITED, Bradford, GB;**

(72) Původce:

Hughes Jonathan, Rastrick, GB;
Weir Steven, Bradley, GB;
Moran Paul, Waddington, GB;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob vyvločkování mikrobiálního buněčného
materiálu ze suspendujícího prostředí**

(57) Anotace:

Způsob vyvločkování mikrobiálního materiálu ze suspendujícího prostředí, které obsahuje buněčný materiál, jehož podstata spočívá v tom, že se k suspendujícímu prostředí přidá první polymerní materiál, který je kationtovým materiálem a který má vnitřní viskozitu nejvýše rovnou 2 dl/g, a že se následně nebo současně přidá k suspendujícímu prostředí druhý polymerní materiál, který je kationtovým nebo v podstatě neionogenním materiálem a který má vnitřní viskozitu alespoň rovnou 4 dl/g, načež se buněčný materiál ponechá vyvločkovat.

12.02.02

1

PV 2002 - 586

180298/KB

~~11892~~

Způsob vyvločkování mikrobiálního buněčného materiálu ze suspendujícího prostředí

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu vyvločkování buněčného materiálu ze suspendujícího prostředí.

Dosavadní stav techniky

Je mnohdy žádoucí oddělit buněčný materiál (jako například buňky nebo/a fragmenty buněk) z kapalného suspendujícího prostředí obsahujícího uvedený buněčný materiál. Jeden ze způsobu, jak toho dosáhnout, je vyvločkovat buněčný materiál tak, aby vytvořené vločky mohly být odděleny z kapalného suspendujícího prostředí. Po oddělení buněčného materiálu může být tento materiál dále použit. Alternativně může být odpadem buněčný materiál, zatímco suspendující prostředí se svým obsahem může být dále použito.

Ukázalo se však obtížným najít vločkovací systémy, mající odpovídající vyvločkovací účinnost v suspendujícím prostředí, ze kterého má být buněčný materiál odstraněn. Zejména je často zapotřebí oddělit buněčný materiál z komplexního prostředí, jakým je růstové (kultivační) prostředí. Bylo zjištěno, že vyvločkování v těchto prostředích je za použití standardních vločkovacích činidel problematické.

Sitkey a kol. popisují v Biotechnology Techniques,

sv.6, č.1,49-52 (1992) odstranění buněk, pevného podílu a koloidního podílu z fermentační živné půdy. Cílem této separace je izolovat extracelulární enzymy přítomné v suspendujícím prostředí. Ve funkci vložkovacího činidla je zde popsáno šestnáct polymerních materiálů. Jednotlivé typy použitých vložkovacích činidel mají slabě kationtový, středně kationtový, silně kationtový, slabě aniontový, středně aniontový a neionogenní charakter. Nicméně podle údajů samotných autorů bylo účinného vyčerení dosaženo pouze za použití dvou polymerů. Těmito polymery byly středně aniontové polymery Sedipur T1 a Sedipur TF5, které jsou komerčně dostupné u společnosti BASF. Je zde popsán přídavek různých kationtových a neionogenních polymerů. Každý z těchto polymerů je přidán v jediné dávce jako jediné vložkovací činidlo, přičemž žádné z těchto činidel nebylo účinné, pokud jde o vyčerení fermentační živné půdy.

Mukhopadhyay a kol. rovněž popisují v Biotechnology Techniques, sv.4, č.2, 121-126 (1990) oddělení suspendovaného pevného podílu z fermentační živné půdy za účelem zpětného získání extracelulárních enzymů rozpuštěných v suspendujícím prostředí. Autoři zde používají různé systémy s cílem dosáhnout zlepšení koagulace nebo vyvločkování. Použitými vyvločkovacími činidly byly ledová kyselina octová, chlorid vápenatý, síran hlinitý a kationtový polyakrylamid. Rovněž byly použity systémy těchto činidel, ve kterých byly k suspendujícímu prostředí přidána dvě nebo více těchto činidel. Autoři zejména popisují systémy, ve kterých se jako dvě vložkovací činidla použijí síran hlinitý a kationtový polyakrylamid. Množství kationtového polyakrylamidu použitá v příkladových systémech byla 0,1, 0,3 a 0,5 g/l (100, 300 a 500 ppm). Množství použitého síranu hlinitého činilo ve všech případech 5,0 g/l (5000 ppm). I když bylo za použití tohoto systému dosaženo vyčerení fermentační živné půdy, autoři konstatují, že za

vysokého smykového namáhání byly vytvořené vločky desintegrovány na menší částice. Tato skutečnost brání sedimentaci vloček. Tento systém je tedy schopen vyčistit fermentační živnou půdu, avšak neposkytuje příliš robustní vločky. Z tohoto důvodu jsou způsoby, které mohou být následně použity pro oddělení vloček od supernatantu výrazně limitovány. Zejména autoři varují před použitím i středně intenzivního odstřeďování.

Publikace EP-A-448 926 popisuje systém pro vyvločkování enzymů. Buněčný materiál, jakým jsou například buňky a buněčné fragmenty se odstraní ze suspendujícího prostředí, jakým je například fermentační živná půda, mechanickými prostředky, mezi které patří například odstředění, načež se enzym, který zůstal v supernatantu, vyvločkuje za použití specifického vločkovacího činidla. Flokulační činidlo je směs Mannichová akrylamidového polymeru a diallyldimethylamoniumhalogenidového polymeru. V tomto popsaném systému je nezbytné nejdříve odstranit buněčný materiál z fermentační živné půdy mechanickými prostředky tak, aby tento buněčný materiál později neznečistoval chemicky vysrážené produkty.

Weir a kol. popisují v Biotechnology Techniques, sv.7, č.3 (březen 1993), str.199-204 vyvločkování buněk z fermentační živné půdy za použití chitosanu, což je kationtový polyelektrolyt, o kterém se uvádí, že je neutrální při pH vyšším než 7,9. Stejní autoři rovněž v Biotechnology Techniques, sv.8, č.2 (únor 1994), str.129-132 popisují použití různých aniontových polymerů v rámci předběžného zpracování, které se provádí před vlastním použitím chitosanu jako vločkovacího činidla.

Je známo, že vyvločkování mikrobiálních buněk v kapalném kultivačním prostředí kationtovými polyelektrolyty podporuje separaci buněk z uvedeného prostředí. Když

uvedené prostředí obsahuje vysoké koncentrace aniontových polyelektrolytů jako složky prostředí nebo/a jako složky produkované buňkami, potom přidavek vysokomolekulárních kationtových vločkovacích činidel produkuje vločky. Tyto vločky budou kontaminovány směsí koncentrovaného vločkovacího činidla a polyelektrolytového komplexu vytvořeného z aniontového a kationtového polymeru (polysůl) nebo/a sraženiny aniontového a kationtového polymetu, což způsobí, že vločky se lepí na zpracovatelské zařízení. Alternativní způsob přidání nízkomolekulárních kationtových polymerních vločkovacích činidel k bakteriální kultuře obsahující vysoké koncentrace aniontových polyelektrolytů vyžaduje vysoké dávky polymeru, pokud má být dosaženo náležitého vyvločkování, v důsledku tvorby komplexního aniontového a kationtového polymeru nebo/a sraženin. Kromě toho bylo zjištěno, že vločky produkované za použití nízkomolekulárních kationtových polymerních vločkovacích činidel jsou výrazně méně stálé ve srovnání s vločkami produkovanými za použití vysokomolekulárních polymerů. Při smykovém namáhání se potom buňky uvolňují z vloček produkovaných za použití nízkomolekulárních kationtových polymerních vločkovacích činidel, což má za následek snížení účinnosti separace.

Bylo by proto žádoucí poskytnout účinný systém separace buněčného materiálu ze suspendujícího prostředí, jakým je například fermentační živná půda. Bylo by rovněž žádoucí, aby mohly být po vyvločkování použity pro oddělení vytvořených vloček různé separační metody a aby vytvořené vločky byly dostatečně robustní k tomu, aby odolaly bez desintegrace separačním metodám a případnému následnému použití.

Podstata vynálezu

V souladu s vynálezem je poskytnut způsob vyvločkování buněčného materiálu ze suspendujícího prostředí, které tento buněčný materiál obsahuje, jehož podstata spočívá v tom, že se k suspendujícímu prostředí přidá první polymerní materiál, který je kationtový a který má vnitřní viskozitu nejvýše rovnou 2 dl/g, načež se následně nebo současně k suspendujícímu prostředí přidá druhý kationtový polymerní materiál, který je kationtový nebo v podstatě neionogenní a který má vnitřní viskozitu alespoň rovnou 4 dl/g, a buněčný materiál se ponechá vyvločkovat.

Bylo zjištěno, že použití definovaného prvního a druhého polymerního materiálu za účelem vyvločkování buněčného materiálu má za následek produkci robustních vloček vhodných pro separaci za vysokého smykového namáhání a to bez použití nadměrných polymerních dávek. Zejména bylo zjištěno, že předběžné zpracování mikrobiální živné půdy, která obsahuje vysoké koncentrace aniontového polyelektrolytu, kationtovým polymerem s vnitřní viskozitou nejvýše rovnou 2 dl/g a následně polymerním vločkovacím činidlem, které má vnitřní viskozitu alespoň rovnou 4 dl/g, poskytuje robustní vločky obsahující nelepivý koncentrovaný polymer. Celková polymerní dávka je vyšší než u známého způsobu používajícího samotný polymer mající vnitřní viskozitu alespoň rovnou 4 dl/g, avšak nižší než u známého způsobu používajícího samotný polymer mající vnitřní viskozitu nejvýše rovnou 2 dl/g.

S překvapením bylo rovněž zjištěno, že celková polymerní dávka dvoupolymerového systému podle vynálezu může být snížena až o 30 % v případě, kdy jsou oba polymery přidány v podstatě současně nebo ve formě směsi. Rovněž překvapující je zjištění, že přidání polymeru s vnitřní viskozitou alespoň rovnou 4 dl/g současně nebo ve formě

směsi s polymerem majícím vnitřní viskozitu nejvýše rovnou 2 dl/g neprodukuje lepidivé vločky.

V důsledku toho je vynález flexibilní, pokud jde použití různých typů separačních postupů, aniž by při tom docházelo k desintegraci vloček.

V rámci vynálezu je buněčný materiál vyvločkován se suspendujícím prostředím. Buněčným materiálem se zde rozumí buňky, spory buněčných fragmentů nebo/a biologické částicové podíly, zejména buňky nebo/a buněčné fragmenty. Nespadá sem pouze vyvločkování buněčných produktů, mezi které patří například enzym nebo polymer.

Vynález může být použit pro vyvločkování buněčného materiálu pocházejícího z různých mikroorganismů. Takto je vynález použitelný pro vyvločkování mikrobiálního buněčného materiálu v suspendujícím prostředí. Tyto mikrobiální buněčné materiály zahrnují bakterie, mezi které patří například *Bacillus subtilis*, v suspendujícím prostředí.

Koncentrace buněčného materiálu v suspendujícím prostředí obvykle činí alespoň 0,5 g (sušina)/l, často alespoň 2 nebo 3 g/l, přičemž tato koncentrace může činit až 100 nebo 150 g/l.

Suspendujícím prostředím je často růstové medium, takže buněčný materiál je vyvločkován z fermentační živné půdy. Tato živná půda je komplexním prostředím, které obsahuje standardní složky růstového prostředí, mezi které patří zejména škrob (například bramborový škrob), kukuřičná moučka, kukuřičný rmut, kukuřičný gluten, kvasniční extrakt, melasové destiláty, rybí moučka, pepton a jiné komerčně dostupné lyzáty. Hodnota pH suspendujícího prostředí není kritická, i když se tato hodnota pH pohybuje od 3 do 10, mnohdy od 4 do 9, například od 6 do 8. Růstové prostředí má tendenci obsahovat vysoké koncentrace

aniontového materiálu, jakým jsou například aniontové polyelektrolyty, které jsou zde obsaženy buď jako část složek růstového prostředí nebo jako produkty kultivovaných buněk. Vynález je obzvláště použitelný v těchto uvedených prostředí, neboť bylo v minulosti prokázáno, že vyvločkování buněčného materiálu právě z těchto prostředí je obzvláště obtížné.

Při způsobu podle vynálezu se k suspendujícímu prostředí obsahujícímu buněčný materiál přidají první a druhý polymerní materiál. Oba tyto polymerní materiály mohou být přidány k suspendujícímu prostředí postupně, což znamená, že nejdříve se přidá první kationtový polymerní materiál a teprve potom se přidá druhý kationtový polymerní materiál. V případě, že se použije toto postupné přidání, potom se uvedený první polymerní materiál výhodně přimísí do suspendujícího prostředí ještě před přidáním druhého kationtového polymerního materiálu.

Je výhodné, když se první a druhý kationtový polymerní materiál přidají k suspendujícímu prostředí v podstatě současně. Tyto materiály mohou být přidány odděleně ve stejnou dobu, přičemž interval mezi dobami přidání obou materiálů by neměly přesahovat 30 sekund. Před přidáním druhého materiálu se neprovádí žádné míchání prvního materiálu v suspendujícím prostředí.

Výhodně se oba uvedené materiály přidají ve formě předsměsi. Bylo zjištěno, že současné přidání obou materiálů, zejména přidání obou materiálů ve formě předsměsi je obzvláště výhodné ve srovnání s postupným (t.j. nesoučasným) přidáním obou materiálů. Ve skutečnosti mohou být dávky obou materiálů při současném přidání sníženy ve srovnání s dávkami při postupném přidání a to při zachování účinnosti vyvločkovacího procesu.

Uvedené polymerní materiály mohou být přidány do suspendujícího prostředí v libovolné vhodné formě. Takové vhodné formy zahrnují prášek, i když výhodnou formou je vodný roztok. Tak například, jestliže jsou první a druhý kationtový polymerní materiál přidány odděleně, potom je každý z těchto materiálů výhodně přidán ve formě vodného roztoku o koncentraci alespoň 0,05 % hmotn./obj. a často o koncentraci nepřesahující 1,0 % hmotn./obj.. Vhodná koncentrace takového vodného roztoku je asi 0,1 % hmotn./obj., i když mohou být použity i mnohem vyšší koncentrace, například koncentrace vyšší než 8,0 % hmotn./obj. a v některých případech i koncentrace až 50,0 % hmotn./obj..

Množství účinného prvního kationtového polymerního materiálu přidané k suspendujícímu prostředí může být nejvýše rovné 1000 ppm, výhodně nejvýše rovné 500 ppm, vztaženo na celkovou hmotnost suspendujícího prostředí (včetně buněčného materiálu a přidaného polymeru). Často je toto množství nejvýše rovné 300 nebo 200 ppm. Dobrých výsledků může být dosaženo za použití množství tak malých, jakými jsou množství 150 ppm a nižší, přičemž optimální výsledky mohou být dokonce dosaženy za použití tak malého množství, jakým je množství 120 ppm. Obecně je toto množství alespoň rovné 50 ppm, často alespoň rovné 100 ppm. Nicméně v případech, kdy mají být vyvločkovány vysoké koncentrace biomasy, mohou být žádoucí mnohem vyšší množství prvního polymerního materiálu, jako například množství 4000 ppm. Stejně tak v případě polymerů, které mají vnitřní viskozitu alespoň rovnou 4 dl/g, mohou být žádoucí množství prvního polymerního materiálu, která jsou vyšší než množství, která byla příkladmo uvedena výše.

Množství účinného druhého polymerního materiálu přidané k suspendujícímu prostředí je obecně nejvýše rovné 500 ppm, výhodně nejvýše rovné 250 ppm. Toto množství je mnohdy

nižší než 100 nebo 80 ppm a optimální výsledky mohou být dokonce dosaženy při použití množství 50 ppm nebo množství ještě nižšího. Obecně je toto množství rovno alespoň 25 ppm.

Tato množství prvního a druhého polymerního materiálu jsou vhodná pro separátní (sekvenční nebo simultánní) podání a pro použití dvou polymerních materiálů ve formě předsměsi. Nicméně simultánní přidání, zejména ve formě předsměsi, umožňuje použití nižších množství ve srovnání se sekvenčním podáním.

V předsměsi je poměr prvního ke druhému polymernímu materiálu (účinný polymer, hmotnostně) roven 40:60 až 95:5. Výhodněji je tento poměr roven 50:50 až 90:10 a nejvýhodněji je tento poměr roven 60:40 až 80:20. Obzvláště dobrých výsledků bylo dosaženo za použití směsí, ve kterých je poměr prvního ke druhému polymernímu materiálu roven 65:35 až 75:25 a zejména roven 70:30.

Celkové množství účinné polymerní směsi přidané k suspendujícímu prostředí je obecně nižší než 1000 ppm, mnohdy nižší než 500 ppm. Toto množství může být nižší než 300 nebo 250 ppm, přičemž dobrých výsledků bylo dosaženo za použití množství nižšího než 200 ppm. Optimální výsledky mohou být dokonce dosaženy za použití tak nízkého množství, jakým je množství 170 ppm. Celkové množství účinného polymeru přidaného k suspendujícímu prostředí je obecně alespoň rovné 50 ppm, výhodně alespoň rovné 100 ppm.

V případě, že jsou první a druhý polymerní materiál přidány ve formě směsi, potom může být tato směs v libovolné vhodné formě, například ve formě prášku nebo výhodně ve formě vodného roztoku. Celková koncentrace polymeru ve vodném roztoku je obecně alespoň rovna 0,05 % hmotn./obj. a normálně je nejvýše rovna 1 % hmotn./obj..

Přihlašovatel rovněž vyvinul způsob stanovení dávek každého z polymerních typů, které poskytnou pro každou specifickou kombinaci suspendujícího prostředí a buněčného materiálu optimální výsledky. Tento způsob stanovení je následující.

- 1) Odebere se vzorek suspendujícího prostředí; buněčný materiál se oddělí od vzorku suspendujícího prostředí mechanickými prostředky, například odstředěním vzorku, k získání odděleného buněčného materiálu a použitého suspendujícího prostředí.
- 2) K použitému suspendujícímu prostředí se přidá první polymerní materiál, načež se změří zvýšení absorbance velmi dobře promíseného vzorku při 600 nm; množství prvního polymerního materiálu, které poskytne maximální zvýšení absorbance, se zaznamená jako Dávka 1.
- 3) Oddělený buněčný materiál se suspenduje v solném roztoku majícím stejný objem, stejnou iontovou sílu a stejnou hodnotu pH jako použité suspendující prostředí.
- 4) K opětovně suspendovanému buněčnému materiálu se potom postupně přidá druhý polymerní materiál, přičemž se měří snížení zákalu jako absorbance vzorku měřená při 600 nm; dávka druhého polymerního materiálu, která poskytne maximální snížení zákalu, se zaznamená jako Dávka 2.
- 5) První a druhý polymerní materiál se potom použijí v poměru Dávka 1/Dávka 2 za účelem vyvločkování buněčného materiálu z kompletního suspendujícího prostředí.

Výše uvedený způsob poskytuje přibližný odhad optimálního poměru prvního a druhého polymerního materiálu. V praxi však bude absolutní dávka polymeru ve směsi nižší. Kromě toho se uvedený optimální poměr směsi může v malé míře lišit od poměru stanoveného uvedeným testovacím způsobem v tom smyslu, že v případě nízkomolekulární frakce může být vyšší.

První polymerní materiál má vnitřní viskozitu nejvýše rovnou 2 dl/g. V rámci vynálezu se vnitřní viskozita (IV) měří v závěsném libelovoém viskozimetru při teplotě 25 °C v 1N roztoku chloridu sodného pufrovaném na hodnotu pH 7. Výhodně je tato vnitřní viskozita nejvýše rovna 1,5 dl/g. Výhodně je tato viskozita alespoň rovna 0,5 dl/g. Může být rovna až 1 dl/g nebo nižší.

Polymerní materiál má kationtový charakter. Je jím výhodně syntetický polymerní materiál, který je obecně vyroben polymerací ethylenicky nenasyceného monomeru nebo monomerní směsi.

Výhodně má první kationtový polymerní materiál relativně vysokou hustotu náboje. Tento materiál má zejména teoretickou hustotu kationtového náboje alespoň rovnou 4 mekv/g, obvykle alespoň 5 mekv/g. Normálně je teoretická hustota kationtového náboje nejvýše rovna asi 25 mekv/g. V rámci vynálezu je teoretická hustota kationtového náboje hustotou náboje získanou výpočtem z monomerní kompozice, která má být použita pro vytvoření polymeru.

Výhodně se polymer vytvoří z monomerů, z nichž alespoň 60 % hmotnosti, výhodně alespoň 70 % hmotnosti má kationtový charakter. Obsah kationtového monomeru je výhodně alespoň roven 90 % hmotnosti a může být dokonce roven 100 % hmotnosti.

Vhodné kationtové monomery zahrnují diallyldialkylamoniumhalogenidy, například diallylamoniumchlorid (DADMAC). Mohou být použity kopolymery tohoto monomeru s minoritním množstvím (obvykle nižším než 30 % hmotnosti a výhodně nižším než 10 % hmotnosti) (meth)akrylamidu, i když výhodné jsou homopolymery. Rovněž mohou být použity homopolymery jako dialkylaminoalkyl(meth)akrylátová kvartérní sůl nebo adiční sůl s kyselinou a homopolymery

dialkylaminoalkyl(meth)akrylamidu, případně ve formě kvartérní soli nebo adiční soli s kyselinou, a kopolymery těchto látek s malými množstvími (obecně nižšími než 30 % hmotnosti) a výhodně nižšími než 10 % hmotnosti) (meth)akrylamidu. Další vhodné první kationtové polymerní materiály zahrnují polyethyleniminy, polyaminy, epichlorhydrindiaminové kondenzační produkty, dikyandiamidové polymery a další konvenční nízkomolekulární kationtové koagulační polymery. Výhodným polymerem je polyDADMAC.

Druhý polymerní materiál má vnitřní viskozitu alespoň rovnou 6 dl/g. Výhodně je tato vnitřní viskozita rovna 8 až 15 dl/g nebo 8 až 20 dl/g anebo ještě vyšší.

Tento materiál může být kationtovým nebo v podstatě neionogenním materiálem. Výhodně je tento materiál kationtovým materiálem. V případě, že je kationtovým materiálem, potom je druhý polymerní materiál obecně materiálem s relativně nízkou hustotou kationtového náboje. Výhodně je jeho teoretická hustota kationtového náboje rovna asi 4 mekv/g, mnohdy rovna asi 3 nebo 2 mekv/g, avšak může být rovna i asi 0,1 mekv/g nebo dokonce rovna asi 0,5 mekv/g.

Druhým polymerním materiálem je výhodně syntetický polymer, zejména polymer získaný polymerací ethylenicky nenasyceného monomeru nebo monomerní směsi. V případě, že je druhý polymerní materiál kationtovým materiálem, potom množství kationtového monomeru ve směsi obvykle činí alespoň 2 nebo 3 % hmotnosti. Toto množství může činit až 50 % hmotnosti, avšak obecně je nejvýše rovné 20 % hmotnosti.

Výhodnými kationtovými monomery jsou dialkylaminoalkyl(meth)akryláty ve formě adiční soli s

kyselinou nebo výhodně ve formě kvartérních solí. Mohou být použity dialkylaminoalkyl(meth)akrylamidy, výhodně ve formě adiční soli s kyselinou nebo kvartérní soli, avšak výhodně polymerem není Mannichův akrylamidový polymer. Každá alkylová skupina může obsahovat 1 až 4 uhlíkové atomy a aminoalkylová skupina může obsahovat 1 až 8 uhlíkových atomů. Obzvláště výhodné jsou dialkylaminoethyl(meth)akryláty.

Tyto monomery jsou obvykle kopolymerovány s neionogenním monomerem, jakým je methakrylamid nebo výhodně akrylamid. Druhým kationtovým polymerním materiálem může být amfoterní polymer pocházející z inkluze menšího množství aniontového monomeru, jakým je kyselina akrylová nebo jiný ethylenicky nenasycený karboxylový monomer.

Alternativně může být druhým polymerním materiálem v podstatě neionogenní polymerní materiál, který může mít obsah iontového monomeru nižší než 3 % hmotnosti (vztaženo na hmotnost monomerní směsi). Tento polymerní materiál může být například vytvořen ze 100 % akrylamidu, případně podrobeného do určité malé míry hydrolýze k vytvoření méně než 3 % hmotnosti, obvykle méně než 1 nebo 2 % hmotnosti kyseliny akrylové. Další neionogenní monomery zahrnují methakrylamid.

Druhý polymerní materiál, zejména v případě, že má kationtový charakter, může být zcela ve vodě rozpustným materiálem nebo může být ve formě polymerů které jsou zesítované. Tento polymer může být získán za použití malého množství zesítovacího činidla, jak je to například popsáno v patentovém dokumentu EP-A-202,780. Výhodné polymery tohoto typu mají iontový podíl rovný 20 až 80 % (definice iontového podílu je definována v patentovém dokumentu EP-A-202,780). Výhodně je takovým polymerem lineární polymer.

V rámci způsobu podle vynálezu se k suspendujícímu prostředí přidají první a druhý polymerní materiál, načež se buněčný materiál ponechá vyvločkovat. Výhodně se vyvločkování provádí za míchání. Často je toto míchání kontinuální.

Když byly oba polymerní materiály přidány, suspenze se potom obecně ponechá usadit po dobu asi 5 až 30 minut, normálně po dobu 10 až 20 minut. Rychlost usazování se měří pozorováním rozhraní pevného podílu vytvořeného vločkami buněčného materiálu a měřením času, který toto rozhraní potřebuje k tomu, aby se posunulo o dráhu 1 centimetru ve standardní 12 ml zkumavce mající průměr 12 mm. Při výhodném průběhu usazování je uvedená rychlost usazování rovna alespoň 3 cm/min, výhodně alespoň 8 cm/min a při obzvláště výhodném průběhu usazování je rychlost usazování rovna alespoň 10 cm/min.

Účinnost vyvločkování je vyjádřena jako procentické snížení zákalu (%RT). Toto procentické snížení zákalu se vypočte jako snížení absorpance (při 600 nm) suspendujícího prostředí po vyvločkování ve srovnání s absorpancí před vyvločkováním. Uvedené procentické snížení zákalu %RT lze tedy vyjádřit následujícím vztahem:

$$\%RT = ((A_1 - A_2) \times 100) / A_1$$

kde

A_1 = absorpance při 600 nm suspendujícího prostředí před vyvločkováním a

A_2 = absorpance při 600 nm suspendujícího prostředí po přidání prvního a druhého polymerního materiálu a po usazování po dobu 15 minut.

Při procesu podle vynálezu může být hodnota %RT velmi vysoká, přičemž může být rovna například alespoň 90 nebo 95 % a může být dokonce rovna alespoň 98 % nebo v podstatě rovna 100 %.

V rámci vynálezu se vyhodnocuje minimální účinná dávka (MED) účinného polymeru. Tato minimální účinná dávka MED je nejnižší účinná dávka polymeru (celkové množství prvního a druhého polymerního materiálu, podané separátně nebo ve směsi), která poskytuje %RT rovnou 90 %. V rámci vynálezu může být hodnota MED rovna 200 ppm nebo může být nižší, přičemž může být dokonce rovna 170 ppm nebo může být ještě nižší.

Výhodnost způsobu podle vynálezu spočívá v robustnosti vytvořených vloček. V rámci vynálezu se měří pevnost vloček, která je vyjádřena jako index pevnosti vloček (FSI). Tato hodnota představuje pevnost vloček vystavených smykovému namáhání. Vločky vytvořené po 15 minutách se vystaví smykovému namáhání. Toto smykové namáhání je definováno jako smykové namáhání působící na 5 ml suspenze ve standardní 12 ml zkumavce v průběhu 30 sekund vířivého míchání produkovaného po maximální sedimentaci v miximatickém mixéru Jencons. Vločky podrobené smykovému namáhání se potom nechají usadit po dobu 15 minut a změří se hodnota %RT usazené suspenze. Takto lze index pevnosti vloček vyjádřit vztahem:

$$\text{Index pevnosti vloček} = 100 - (\%RT_A - \%RT_B),$$

ve kterém

$\%RT_A$ = %RT po vyvločkování a

$\%RT_B$ = %RT po vystavení smykovému namáhání.

%RT je vždy vypočteno vzhledem k zákalu nevývločkovatého suspendujícího prostředí.

Výhodně hodnota FSI je alespoň rovna 90 %, výhodně rovna alespoň 95 % a může být dokonce rovna alespoň 98 %.

Jiný způsob vyhodnocení pevnosti vloček spočívá v měření rychlosti usazování po provedení uvedeného smykového testu. Výhodně je rychlost usazování po vystavení smykovému namáhání rovna alespoň 2 cm/min, výhodně rovna alespoň 3 cm/min a mnohdy je rovna alespoň 5 cm/min.

Vývločkováný buněčný materiál se potom oddělí od vyčrešeného suspendujícího prostředí. Vhodné separační metody pro tento účel zahrnují odstředování v šaržích, polokontinuální odstředování a kontinuální odstředování, filtraci, například vakuovou filtraci, a libovolnou jinou známou separační metodu.

Vyhoda způsobu podle vynálezu takto hlavně spočívá ve zlepšené pevnosti vytvořených vloček, která umožňuje použití různých separačních metod pro oddělení těchto vloček od suspendujícího prostředí a to včetně separačních metod, při kterých jsou uvedené vločky vystaveny mechanickému míchání nebo/a smykovému namáhání, což by jinak mělo za následek rozbití vytvořených vloček na vločky menší velikosti.

Po oddělení mohou být výtločkované buněčné materiály použity v rámci různých způsobů, například jako katalyzátory. Obsah supernatantu může být rovněž použit při různých procesech. Je-li to žádoucí, může být enzym přítomný v supernatantu z tohoto supernatantu výtločkován.

V následující části popisu bude vynález blíže objasněn pomocí příkladů jeho konkrétního provedení, přičemž tyto

příklady mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen definicí patentových nároků a obsahem popisné části.

Příklady provedení vynálezu

V těchto příkladech je účinnost vyvločkování vyjádřena jako %RT, kterážto charakteristika je měřena výše popsáním způsobem. Rovněž minimální účinná dávka je měřena výše uvedeným způsobem. Stejně tak index pevnosti vloček a rychlost usazování jsou měřeny výše uvedeným způsobem. V příkladech jsou použity následující polymery:

polymer 1: polyDADMAC, IV přibližně rovna 1 dl/g a

polymer 2: kopolymer 67 % hmotn. akrylamidu a 33 % hmotn.kationtového monomeru (dimethylaminoethylmethakrylát kvarternizovaný methylchloridem), IV přibližně rovna 11 dl/g.

V rámci příkladů se vyvločkování provádí následujícím způsobem, pokud není výslovně uvedeno jinak. Použije se suspenze *Bacillus subtilis* s koncentrací biomasy 2,7 g (sušina)/l. Alikvoty prostředí (4 ml) se zavedou do 12 ml zkumavek, načež se každý z vločkovacích polymerů nebo jejich směs přidají v průběhu intenzivního míchání ve vířivém mixéru po dobu asi 5 sekund k zajištění dokonalého promíchání složek suspenze.

Každý z polymerů nebo jejich směs se k suspendujícímu prostředí přidají ve formě 0,1% (hmotn./obj.) roztoku ve vodě, pokud není výslovně uvedeno jinak.

Příklad 1

V rámci tohoto příkladu se testují různé směsi polymeru 1 a polymeru 2 s cílem nalézt optimální poměr těchto dvou polymerů pro výše popsanou suspenzi *B.subtilis*. Testované směsi mají poměry polymer 1/polymer 2 rovné 40:60, 50:50, 60:40, 65:35 a 70:30 a jsou testovány výše popsaným způsobem. Poměr 70:30 poskytuje nejlepší sraženinu, která má zcela částicový charakter. Poměr 65:35 rovněž poskytuje adekvátní sraženinu mající částečně částicový a částečně vláknitý charakter. Při použití uvedených poměrů v poměrech 40:60, 50:50 a 60:40 nebylo dosaženo optimálních výsledků, neboť bylo v těchto případech dosaženo spíše "vláknitých" sraženin.

Příklad 2

Směs s poměrem 70:30, která byla v příkladu 1 shledána jako optimální, se dále testuje. Byly nalezeny hodnoty MED pro samotný polymer 1, samotný polymer 2 a pro směs polymeru 1 a polymeru 2 v poměru 70:30.

Byl pozorován charakter sraženiny a určena rychlost usazování po přidání uvedené směsi.

Výše uvedeným způsobem byla rovněž vypočtena hodnota %RT po vyvločkování. Vytvořené vločky byly vystaveny smykovému namáhání s cílem stanovit jejich výše diskutovaný index pevnosti. Po vystavení vloček smykovému namáhání byla opět určena rychlost usazování. Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 1.

Tabulka 1

Polymer	MED	Popis sraženiny	Rychlost usazování (cm/min)	Rychlost usazování po v.s.n.* (cm/min)	Pevnost vloček (FSI)
2	130	vláknitá	17,6	5,3	99
1	229	částicová	1,8	0,3	86
Směs	166	částicová	10,6	5,3	99

* v.s.n. = vysoké smykové namáhání

Z těchto výsledků je zřejmé, že i když samotný polymer 1 poskytuje částicovou sraženinu, je v tomto případě rychlost usazování nízká, což platí i pro pevnost vloček, jak je to doloženo nízkou hodnotou FSI a nízkou rychlostí usazování po vystavení vloček vysokému smykovému namáhání. Samotný polymer 2 poskytuje dobrou rychlost usazování a dobrou pevnost vloček, avšak vláknitou sraženinu. Směs obou polymerů poskytuje částicovou sraženinu, dobrou rychlost usazování a dobrou pevnost vloček. Je třeba rovněž uvést, že MED je v tomto případě nižší než MED polymeru 1 a nevýrazně vyšší než MED polymeru 2.

Příklad 3

V rámci tohoto příkladu jsou provedeny testy s cílem stanovit optimální množství jak prvního, tak i druhého kationtového polymerního materiálu.

Vzorek *B.subtilis* nakultivovaný do koncentrace 4 g/l na živné půdě byl ostředován při 3000 g po dobu 15 minut.

Supernatant byl oddělen a odstředěné buňky byly opětovně suspendovány ve stejném objemu solanky (0,85% [hmotn./hmotn.] roztok chloridu sodného).

Optimální množství polymeru 1 bylo získáno kontinuálním přidáváním roztoku polymeru 1 k supernatantu až do okamžiku, kdy absorbance při 600 nm dosáhne maximum. Požadovaná dávka činí 140 ppm.

Optimální dávka polymeru 2 byla získána přidáváním různých dávek polymeru 2 k suspenzi *B.subtilis* v roztoku chloridu sodného až do okamžiku, kdy je pozorována 100% hodnota %RT. Požadovaná dávka činí 50 ppm.

Směs 140 ppm polymeru 1 a 50 ppm polymeru 2 se potom použije k vyvločkování *B.subtilis* výše popsaným způsobem. Hodnota %RT po 15 minutách činí 100 %.

V následujících příkladech se vyvločkování provádí za použití 100 cm³ alikvotů ve 250 cm³ kádince míchané míchadlem Lightnin A200 Impellor (průměr 4,7 cm), načež se měří rychlost usazování v 100 cm³ odměrném válci měřením časového intervalu, kterou linie vyvločkovatého pevného podílu *B.subtilis* potřebuje k tomu, aby urazila dráhu 50 mm.

Polymer 3 je komerčně dostupným kationtovým polymerem [účinná kompozice 40 % akrylamidu a 60 % kationtového monomeru (dimethylaminoethylmethakrylát kvarternizovaný methylchloridem)] majícím vnitřní viskozitu rovnou asi 12 dl/g.

Polymer 4 je komerčně dostupným kationtovým polymerem (účinná kompozice 20 % akrylamidu a 80 % monomerů stejného jako v polymeru 3) majícím vnitřní viskozitu 4 dl/g výhodně po smykovém namáhání (jak je popsán v evropském patentu

0202780B).

Polymery 1 a 3 nebo 4 individuálně nebo ve směsi byly přidány k suspendujícímu prostředí ve formě 1% a 0,2% (hmotn./obj.) roztoku ve vodě, pokud není výslovně uvedeno jinak.

Příklad 4

V rámci tohoto příkladu se nejdříve dávka polymeru 1 přidá k 4,76 g/l suspenzi *B.subtilis* kultivované na 13 g/l živné půdě (Oxoid) ve dvoulitrových třepačkových baňkách s přepážkami při teplotě 30 °C po dobu 16 hodin. První dávka polymeru 1 činící 210 ppm je dávkou, o které bylo zjištěno, že způsobí maximální srážení při zpracování samotného použitého suspendujícího prostředí. Při druhém experimentu byla použita dávka polymeru 1 rovná 290 ppm, přičemž tato dávka je výrazně vyšší než dávka použitá při prvním experimentu. Suspenze zpracované oběma polymery se potom rozdělí na alikvoty a ke každé z těchto alikvotovaných suspenzí (210 a 290 ppm) se přidávají různé dávky polymeru 3 nebo polymeru 4 až do okamžiku, kdy je dosaženo hodnoty MED polymeru 3 nebo 4 (%RT = 95 %). Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Sekvenční přidávání polymerů

Dávka polymeru 1 (ppm)	210	290
Dávka polymeru 1 /mg/d/sušina buněk)	44	60,9
MED polymeru 3 (ppm)	175	148
MED polymeru 3 (mg/g/sušina buněk)	36,8	31,1
MED polymeru 4 (ppm)	250	200
MED polymeru 4 (mg/g/sušina buněk)	52,5	42

Získané výsledky ukazují, že vyšší dávka polymeru 1 má za následek snížení minimální účinné dávky polymeru 3 nebo polymeru 4.

Příklad 5

Provede se vyvločkování *B.subtilis* v koncentraci 4,76 g (sušina buněk)/l použité živné půdy (Oxoid) za použití směsi polymeru 1 a polymeru 3 v poměru 65:35 a směsi polymeru 1 a polymeru 4 v poměru 60:40.

Maximální účinné dávky každé z obou směsí jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Polymerní směs	MED (ppm)	MED (mg/g[sušina buněk])
Polymer 1/polymer 2 65:35	290	60,9
Polymer 1/polymer 4 60:40	414	87,0

Seovnání celkové dávky polymeru použitého k vyvločkování vždy stejné suspenze *B.subtilis* za použití polymerů přidaných sekvenčně (například přidáním sekvenčních dávek polymeru 1 a polymeru 3 v tabulce 2 příkladu 4) a za použití směsi polymerů překvapivě ukazuje, že celková polymerná dávka je v tomto posledně uvedeném případě výrazně nižší.

Příklad 6

Tabulka 4 ukazuje usazovací schopnost vloček a stabilitu vloček při jejich vystavení smykovému namáhání, přičemž tyto vločky jsou získány za použití přidání pouze polymeru 1, sekvenčního přidání polymeru 1 a potom polymeru 3 nebo polymeru 4 a podání polymeru 1 a polymeru 3 nebo polymeru 4 ve směsi.

Stejně jako v příkladech 4 a 5 je suspenzí, která má být vyvločkována suspenze *B.subtilis* o koncentraci 4,76

g/l (sušina buněk) v použité živné půdě. Za účelem testování stability vloček získaných každým z uvedených způsobů při jejich vystavení smykovému namáhání byly vyvločkované suspenze (100 cm³) vystaveny smykovému namáhání ve 250 cm³ kádince za použití mixéru Triton po dobu 90 sekund (rychlost otáčení míchadla: 300 otáček za minutu, průměr oběžného kola: 6,2 cm a šířka oběžného kola: 0,5 cm).

Tabulka 4

Rychlosti usazování

	MED (ppm)	MED (mg/g)	%RT	Rychlost usazování (cm/min)	Rychlost usazování po smyko- vém namá- ní (cm/min)	%RT po smy- kovém namáhá- ní
Polymer 1	700	147	95,5	2,1	0,8	86,4
Polymer 1+	210+	44,1+	95,7	29,5	22,7	98,2
polymer 3	221 =431	46,4 =46,4				
Polymer 1+	210+	44,1+	96,8	49,1	12,3	98,1
polymer 4	280 =490	58,8 =102,9				
Polymer 1/ polymer 3 65:35	320	67,2	95,7	14,4	8,4	93,3
Polymer 1/ polymer 4 65:35	430	90,3	96,7	18,5	3,9	92,8

Použití samotného polymeru 1 poskytuje suspenzi s jemnými vločkami, které mají nízkou usazovací rychlost a které mají malou stabilitu při jejich vystavení smykovému namáhání, jak je to patrné ze snížení hodnoty %RT po smykovém namáhání. Použití sekvenčně přidaného polymeru 1 a polymeru 3 nebo polymeru 4 poskytuje rychle se usazující vločky, které mají po vystavení smykovému namáhání zmenšenou velikost (jak to vyplývá z měření rychlosti usazování), avšak které neerodují (jak je to prokázáno vysokou hodnotou FSI). Polymerní směsi poskytují vločky s vysokou rychlostí usazování, které jsou stabilní při jejich vystavení smykovému namáhání a to při snížení celkové polymerní dávky.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob vyvločkování mikrobiálního buněčného materiálu ze suspendujícího prostředí, které obsahuje buněčný materiál, v y z n a č e n ý t í m, že se k suspendujícímu prostředí přidá první polymerní materiál, který je kationtovým materiálem a který má vnitřní viskozitu nejvýše rovnou 2 dl/g, a že se následně nebo současně přidá k suspendujícímu prostředí druhý polymerní materiál, který je kationtovým nebo v podstatě neionogenním materiálem a který má vnitřní viskozitu alespoň rovnou 4 dl/g, načež se buněčný materiál ponechá vyvločkovat.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že první polymerní materiál má teoretickou hustotu kationtového náboje alespoň rovnou 5 mekv/g.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č e n ý t í m, že druhý polymerní materiál je kationtovým materiálem.

4. Způsob podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n ý t í m, že druhý polymerní materiál má teoretickou hustotu kationtového náboje nejvýše rovnou 4 mekv/g.

5. Způsob podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n ý t í m, že druhým polymerním materiálem je kopolymer dialkylaminoalkyl(meth)akrylátového monomeru ve formě kvartérní soli nebo adiční soli s kyselinou s

neionogenním ethylenicky nenasyceným monomerem, výhodně kopolymer akrylamidu a dimethylaminoethylakrylátu kvarternizovaného methylchloridem.

6. Způsob podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a č e n ý t í m, že první a druhý polymerní materiál se přidají k suspendujícímu prostředí současně.

7. Způsob podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a č e n ý t í m, že první a druhý polymerní materiál se přidají k suspendujícímu prostředí ve formě předsměsi.

8. Způsob podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a č e n ý t í m, že účinná dávka druhého polymerního materiálu je nejvýše rovna 500 ppm, výhodně nejvýše rovna 250 ppm, vztaženo na hmotnost suspendujícího prostředí.

9. Způsob podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a č e n ý t í m, že účinná dávka prvního polymerního materiálu je nejvýše rovna 1000 ppm, výhodně nejvýše rovna 500 ppm, vztaženo na hmotnost suspendujícího prostředí.

10. Způsob podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a č e n ý t í m, že první a druhý polymerní materiál se přidají k suspendujícímu prostředí ve formě předsměsi, přičemž účinná dávka této směsi je nejvýše rovna 500 ppm, výhodně nejvýše rovna 250 ppm, vztaženo na hmotnost suspendujícího prostředí.

11. Způsob podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a č e n ý t í m, že první a druhý polymerní materiál se přidají k suspendujícímu prostředí v poměru 60:40 až 80:20, výhodně v poměru 65:35 až 75:25.

12. Způsob podle nároku 10, v y z n a č e n ý t í m, že prvním polymerním materiálem je polyDADMAC a druhým polymerním materiálem je kopolymer akrylamidu a dimethylaminoethylakrylátu kvarternizovaného methylchloridem.

13. Způsob podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a č e n ý t í m, že vyvločkový buněčný materiál se oddělí od suspendujícího prostředí a použije jako katalyzátor.

14. Způsob stanovení dávek dvou koagulačních materiálů určených pro přidání k suspendujícímu prostředí obsahujícímu suspendovaný buněčný materiál, v y z n a č e - n ý t í m, že se

- 1) odebere vzorek suspendujícího prostředí, načež se z tohoto vzorku oddělí buněčný materiál mechanickými prostředky k získání odděleného buněčného materiálu a použitého suspendujícího prostředí, načež se.
- 2) k použitému suspendujícímu prostředí přidá první polymerní materiál a ponechá se zvýšit absorbance,
- 3) přičemž se tento postup opakuje s dalšími vzorky suspendujícího prostředí a různými množstvími prvního polymerního materiálu a zaznamená se množství prvního polymerního materiálu, které poskytne maximální zvýšení absorbance, jako dávka 1, načež se
- 4) oddělený buněčný materiál opětovně suspenduje v roztoku solanky, který má stejný objem, stejnou iontovou sílu

a stejnou hodnotu pH jako použité suspendující prostředí,

- 5) k opětovně suspendovanému buněčnému materiálu se přidá druhý polymerní materiál a umožní se, aby proběhlo snížení zákalu, a
- 6) stupeň 4) se opakuje pro různá množství druhého polymerního materiálu a zaznamená se jako dávka 2 množství, které poskytne maximální snížení zákalu.

15. Způsob podle nároku 14, v y z n a č e n ý t í m, že prvním polymerním materiálem je materiál definovaný v nároku 1 a druhým polymerním materiálem je materiál definovaný v nároku 2 a uvedené dávky se následně použijí při způsobu podle nároku 1.

16. Způsob podle nároku 15, v y z n a č e n ý t í m, že následný způsob má některý ze znaků uvedených v nárocích 2 až 13.