

KRALJEVINA JUGOSLAVIJA

UPRAVA ZA ZASTITU

Klasa 12 (5)



INDUSTRIJSKE SVOJINE

Izdan 1. Oktobra 1930.

PATENTNI SPIS BR. 7376

Deutsche Hydrierwerke Aktiengesellschaft, Berlin—Charlottenburg, Nemačka.

Postupak za izvođenje biohemijskih procesa.

Prijava od 4. jula 1928.

Važi od 1. marta 1930.

Već je tehnički iskorišćen čitav niz poznatih biohemijskih procesa, naročito procesa vrenja, na pr. previranje ugljenih hidrata pomoću kvasca i bakterija, radi proizvodnje etanola, izoprapanola, butanola, acetona, mlečne kiseline, buterne kiseline i t.d. Ova vrenja se sprovode pomoću čistih kultura pojedinih vrsta ili pomoću njihovih simbiotskih mešavina.

Za dobijanje izazivača vrenja poznatih procesa služe opšte uobičajene metode u bakteriologiji (Kohova metoda razblažavanja, metoda ploča, postupak dušem po Burri-u, kultura kapljica i t.d.). Tako su se bakterije tipa *Bacillus butylicus* Fitz izoleisale za istovremeno izvođenje acetona i viših alkohola. Ovaj postupak je tehnički nesavršen, pošto su bakterije veoma osetljive prema infekcijama, pošto pri neznatnom koncentrisanju materije u vrenju daju rdavo iskorišćenje, pošto rade samo pri apsolutnom isključenju vazduha (anerobia), pošto ne mogu da svare belančevine iz materijala u vrenju i stoga zahtevaju skupa dodatak kvasca dobivenog sa *Tyrosin* te-nis. Veliki broj drugih bakterija (Zentralblatt f. Bakteriologie II Abt., XXIII Bd. S. 385—568) pokazuju slične nezgode: one zahtevaju pre svega prethodno povlačenje belančevine celog materijala za previranje pomoću *Aspergillus oryzae* za vreme od 3—4 dana, da bi se postiglo osrednje iskorišćenje pri neznatnoj koncentrisanosti. Dalje se predlagala za izvođenje butanola

i acetona upotreba bakterija otpornih prema toploti (D.R.P. 445982), isto kao što je već pre toga Schardinger izolirao bakterije tipa *Sacharobutylicus mobilis* non liquefaciens, koje proizvode butanol (Zentralblatt f. Bakt. II. Abt., XVIII Bd. S. 748—67). Ovaj postupak je nesavršen, pošto ga sprečava izbor bakterija veoma nesposobnih za dejstvo. Ako se naime kalem 100 cevčica pri 90—100° sa nestirilizovanim kukuruznim brašnom, to vrste oseljive u toploti odmah oslabe ili budu ubijene, među kojima se baš nalaze tehnički najsposobnije vrste. Ako ove cevčice sada budu gajene nekoliko dana i tada budu izložene postupanju toplotom, to bivaju upravo kulture, u kojima je obrazovana najveća količina proizvoda vrenja, koje dakle, sadrže najsposobnije bakterije, najbrže oslabljene ili ubijene, pošto prisustni butanol pri toploti kuvanja deluje kao vrlo jak antiseptikum, samo takve kulture mogu preživeti zagrevanje, u kojima su odrasle bakterije sa malom sposobnošću za dejstvo, koje su tako malo produktivne vrenja (butanolo) obrazovale, da njihovo antiseptično dejstvo pri toploti kuvanja nije dovoljno za ubijanje bakterija. Stvarno vodi ova regresivna selektivna metoda ka bakterijama, koje su veoma oseljive prema infekcijama i samo kljukove male koncentrisanosti (napr. 5—8% kukuruza; Industrial and Engineering Chemistry, Okt. 1927, S. 1147) mogu prevreti sa iskorišćenjem od približno $\frac{1}{3}$ sadržine

skroba materijala za previjanje. Stoga su i ovi postupci skupi i nesavršeni.

Sad je nađeno, da je za postizanje naročito sposobnih izazivača vrenja, veoma otpornih prema produktima vrenja podesna niže opisana selektivna metoda, pošto ona dozvoljava dobijanje takvih bakterija, koje su malo oseljive prema infekcijama pri visokoj koncentrisanosti materijala za previjanje, i daju mnogo veća iskorišćenja no dosadnji postupci i mogu prevreti sirovine svakog porekla, jednom reči, pružaju sva preimущества pečenja kvasca. Ovaj postupak sastoji se u tome, što se probi kljuka, koja služi za odabiranje (selekciju) dodaje produkt, koji treba da se proivede vrenjem. Ovaj dodatak za selekciju sprečava raščćenje takvih bakterija, koje su oseljive prema selektivnom dodatku, ali povlađuje razvijanje takvih vrsta, koje mogu da proizvedu dotični produkt. Pomoću podesnih koncentrisanosti selektivnog dodatka polazi za rukom takođe, da se spreči razvijanje manje sposobnih vrsta, koje su odporne samo prema neznatnim koncentrisanostima proizvoda, i da se pomogne isključivo razvijanje takvih vrsta, koje su odporne prema višim koncentrisanostima proizvoda vrenja i, dakle, i same mogu proizvoditi dotični produkt u višim koncentrisanostima, a da poslali proizvod ne sprečava dalji proces vrenja. Pošto postupanje toplotom pri ovom postupku nije potrebno, zajemčeno je i dobijanje naročito sposobnih, oseljivih prema toploti, vrsta. Postupkom nastupajuće, progresivno automatski lekuće odabiranje, biva dopunjeno još sistematskim izborom i prekalemljivanjem naročito sposobnih kultura pod izdvajanjem nepodesnih, po poznatim bakteriološkim postupcima.

U daljem donosi sobom — prema upotrebi čistih kultura i njihovih simbiotičkih mešavina upotreba takvih mešavina kultura velike koristi, u kojima mikroorganizmi međusobno žive u pseudo simbiozi i metabiozi, t. j. uspevaju jedno pored drugoga, a da nisu upućeni jedno na drugo (pseudosimbioza) i u stanju su, da proizvode eksploatisanja i proizvode izmene materija uzajamno dalje preraduju (metabioza). Takođe je korisno, ako bakterije ili veći deo istih ne bude upotrebljen da lebdi slobodno ili da je vezan na neutralne materije, nego da su vezane na čvrste, biohemiski netaložljive nosioce (na pr. biljne deliće), koji u ostalom mogu biti slobodno pokretni, usled čega postaje takozvani mikoplankton. U rastvorima imaju bakterije na raspoloženju samo rastvorene materije, dok se u mikoplanktonu nalaze i nerastvorene materije, naročito belančevine, koje omogućuju uposlenje i iskorišće-

nje svih fermenta bakterija i time izazivaju efekat vrenja.

Prema tome sastoji se postupak po pronalasku u tome, da se upotrebljuju isključivo bakterije ili pseudosimbiotične kulture mešavina, koje su veoma odporne prema proizvodima vrenja i koje se mogu dobiti sledećom selektivnom metodom:

Kalemljenje kljukove probe, pomešane sa proizvodom vrenja kao selektivnim dodatkom, sa prirodnim nosiocima bakterije, gajenje kljukovih proba i izbor kljukovih proba, koje najjače previru i sadrže bakterije koje izgledaju normalno sa podjednakom neznatnom protoplazmom. Dobro je da se upotrebljuju takve, koje pokazuju naklonost za obrazovanje planktona, pri čemu se u potrebnom slučaju izabrane uskomešale kljukove probe prekalemljuju u sveže kljukove probe, pomešane sa istim selektivnim dodatkom, gajenje se ponavlja i izbor i prekalemljivanje se naslavlja pod istim uslovima, dok se ne dobiju jedinstvene tehnički sposobne za dejstvo kulture, koje su veoma odporne prema proizvodima vrenja.

Ako se kod dobijanja izazivača vrenja postupa po pomenutim osnovnim pravilima (izbegavanje zagrevanja, proizvod vrenja kao selektivni dodatak, pseudosimbioza, metabioza, mikoplankton) to se dobivaju kao što se pokazalo, prema dosadnjim postupcima sledeća preimущества kod sprovođenja procesa vrenja i drugih biohemskih procesa:

1. Dobiveni izazivači su veoma otporni prema spoljašnjim ulicajima. Upadnici (nametljivci) su na pr, odmah napadnuti i njihovo infektivno dejstvo biva uništeno u samom početku.

2. Podesnom varijacijom selektivnog dodatka mogu izazivači vrenja biti dobiveni sa najraznovrsnijim sposobnostima za vrenje, koji predstavljaju celu bogatu skalu prirodnih procesa cepanja i oksidisanja i u kvalitativnom odnosu mogu da utiču u širokim razmerama na tok biohemskih procesa. Time je moguće svesno vođenje ovih procesa, dobijanje potpuno određenih proizvoda, povećanje njihovog proizvođenja na račun drugih neželjenih proizvoda.

3. Pomoću metabionističkih osobina izazivača vrenja dobivenih po Bakony-ovoj metodi, otklanjaju se nekorisni proizvodi vrenja odnosno prevaraju se u korisne.

4. Usled nesavršeno jače virulence ovih izazivača vrenja izlazi se na kraj sa vrlo kratkim vremenima vrenja.

5. Ovom selektivnom metodom zajamčena otpornost prema proizvodima vrenja, kao i sa metodom vezano otklanjanje škodljivih proizvoda izmene materija, dozvolja-

va održavanje daleko većih koncentrisanosti, no što je ovo moguće kod dosadanih postupaka, pošto, kao što je poznato, ovi proizvodi izmene materija, koji smelaju, često pričinjavaju prevremeni kraj ovih biohemiskih procesa.

Kod sprovođenja drugih biohemiskih postupaka osim procesa vrenja je primena gore opisanih osnovnih pravila vezana sa istim koristima (preimućstvima).

Primer 1. Prirodni nozioci bakterija (biljni delovi, humus, izmeti biljoždera itd.) prelivaju se vodom ili sterilnim kljukom i na to se dodaje neznatna količina, na pr. 1—2% kakvog hemiskog sredstva, najbolje proizvoda vrenja, koji treba da bude proizveden vrenjem na pr. butanol. (Isto tako mogu, naravno, u slučaju da vrenje treba da da više određenih proizvoda, biti dodane mešavine ovih materija namesto jednog jedinog). Ovim dodatkom se sprečava razvijanje svih bakterija, koje nisu otporne prema butanolu. Probe se gaje oko 24 časa. Mogu se pri tom upotrebiti temperature do 70° najbolje su ipak takve, koje su između 28 i 38°. Posle 24 časa predstavljaju sve uskomešane probe prethodno nediferenciranu mešavinu najraznovrsnijih bakterija otpornih prema butanol-u, koje mogu biti obeležene kao „butanol-flora“ upotrebljenog prirodnog nosioca bakterija. Ove flora-probe se mikroskopišu, pri čemu se izdvajaju sve takve, u kojima se može videti veći broj jako degenerisanih (zrnastih ili deformisanih) individua. Samo se takve flora-probe upotrebljuju dalje, kod kojih bakterije pokazuju ravnomernu protoplazmu i normalne oblike — dva znaka za to, da su razne vrste međusobno bar snošljive.

Ponovnim mikroskopskim pregledom odabiraju se one flora-probe, u kojima bakterije pokazuju naklonosti za obrazovanjem planktona.

Sa ovim flora-probama kaleme se sterilizovane kljukove probe, koje su isto tako pomešane sa oko 1—2% upotrebljenog selektivnog dodatka. Prethodno zagrevanje ovih proba, kao što je to običaj kod izvesnih dosadanih metoda gajenja (na pr. D. R. P. 445982), mora biti strogo izbegavano, jer može dovesti do slabljenja ili ubijanja, kako se pokazalo, vrlo važnih vrsti oseljivih na toploti i do potpunog razorenja naklonosti za plankton. Kalemljenje kljakove probe se ponovo gaje 24 časa, posle čega se ponavlja gore opisani mikroskopski izbor prema normalnom izgledu i intenzitetu i obilnosti obrazovanja planktona. Izabrani materijal se na isti način kalemi dalje u sterilne, sa selektivnim dodatkom pomešane kljukove probe i usko-

mešale probe podvrgavaju se daljem mikroskopskom izboru. Ove mere se ponavljaju dotle, dok se ne dobiju kulture, koje pokazuju potpuno normalnog izgleda i jako obrazovanje planktona.

Sa ovim kulturama se sad priređuju ogledi vrenja, pri čemu se kljukovoj probi za previranje dodaje isto tako unapred 1—2% selektivnog dodatka. Tada se odabiraju među ovima takve kljukove probe, koje su najbrže provrele, i opredeljuju na podesan način, na pr. destilisanim probe odatle aseptično uzete, one, koje pokazuju najveću sadržinu u željenim proizvodima vrenja, u ovom slučaju butanola. Ove probe vrenja se upotrebljuju za dalje ogleda vrenja i ogledi se dotle ponavljaju, dok se ne postigne maksimalno iskorišćenje pri minimalnom trajanju vrenja.

Tada se postepeno smanjuje koncentrisanost selektivnog dodatka, dok se pomenuti cilj ne postigne potpuno bez selektivnog dodatka.

Najzad se povećava koncentrisanost kljukove probe, koja treba da prevre, dokle god je ova moguća bez smanjivanja iskorišćenja i bez produženja trajanja vrenja.

Kranji rezultat selekcije može biti razume se, još povećan daljim izdvajanjem kultura manje otpornih prema infekciji.

Primer 2. U primeru 1 navedeni selektivni način (pul) može biti skraćen na sledeći način:

Dobivena flora, na pr. gornja butanol-flora prerađuje se dalje po jednoj poznatoj bakteriološkoj metodi, na pr. metodi ploča, t. j. pojedine kolonije, koje se nalaze na pločama, ispituju se u prisustvu selektivnog dodatka upotrebljenog za pripremanje flore u pogledu na njihovu sposobnost za dejstvo u sterilnim kljukovim probama i samo kulture sposobne za dejstvo podvrguju se eventualnoj daljoj selekciji ako je potrebno.

Primer 3. Sprovođenje vrenja cepanjem za izvođenje etanola, propanola, izopropanola, butanola, izobutanola, acetona i t. d. ili njihovih mešavina pomoću kultura dobivenih po 1. i 2. primeru vrši se na sledeći način:

Materije, koje sadrže skrob ili šećer suspendiraju se u isitnjenom stanju u vodi, pri čemu može biti zadržano uobičajeno koncentrisanje pečenjem. Skrob se kuvanjem želatiniše i ohladi se na selektivnu temperaturu izazivača vrenja. Tada se izvršuje dodatak izazivača vrenja, koji izaziva snažno vrenje, koje je najdalje posle 40 časova potpuno svršeno. Dobivanje produkata dešava se destilisanim. Pri koncentrisanosti od na pr. 12—15% kukuza (sa 60% skroba) iznosi iskorišćenje

(dobi) u alkoholima i ketonima 40—45% od upotrebljenog skroba.

Rastvori, koji sadrže šećera (na pr. melasa) mešaju se sa biljnom kašom radi omogućavanja obrazovanja planktona.

Primer 4. Ako se hoće da izazove oksidaciono vrenje, to se menja gore opisana selektivna metoda na taj način, što se dodaje slobodna organska kiselina (mlečna kiselina, buterna kiselina, sirćetna kiselina) prema vrsti željenog produkta. Osim toga se postala kiselina, čim prođe koncentrisanost od 2%, neutrališe sa kredom, sodom, amonijakom i t. d. Na ovaj način slobodna kiselina, koje uvek ima, deluje kao naročiti selektivni dodatak i vodi ka kulurama veoma otpornim prema kiselini. Pri sprovođenju procesa, koji vodi izvođenju organske kiseline dodaje se takva oksidaciona kultura kljuka i stalno se neutrališe i ovdje postala kiselina, u koliko ona prelazi preko 2%. Aseptičan rad je pri tom izlišan, pošto su kulture, dobivene prema opisanoj selektivnoj metodi, apsolutno otporne protiv infekcija. Postale ki-

seline stavljaju se u slobodu i dobijaju se čiste na uobičajen način.

Patentni zahtevi:

1. Postupak za izvođenje biohemiskih procesa vrenja, pomoću čistih kultura, bakterija ili smeša čistih kultura, naznačen time, što se upotrebljuju samo lakve kulture, koje su otporne prema produktima vrenja i dobijaju se na taj način, što se sterilne probe kljuka najpre mešaju sa 1% produkta vrenja (na pr. bulanola), zatim inficiraju sa prirodnim nosiocima bakterija (krompir, žito, zemlja, izmet) i posle 24 časovnog vrenja uzimaju se probe kljuka, koje najjače previru i sadrže bakterije, koje izgledaju zdrave.

2. Postupak po zahtevu 1 naznačen time, što se izabrane probe kljuka, koje su počele vreti, prekalemljuju u probe kljuka, kojima je dodata ista selekcija, i što se gajenje ponavlja, a izbor i prekalemljivanje nastavlja pod istim uslovima, dok se ne dobiju jednostavne tehnički sposobne kulture, koje su vrlo otporne prema produktima vrenja.