

Použitie odpeňovacích prostriedkov pri fermentačnej výrobe alkalických proteínáz

663.1 579

PhMr. ANNA ŠNAJDROVÁ, Ing. ELENA KUZMOVÁ, Ing. VLADIMÍR SITKEY, Výzkumný ústav LIKO, Bratislava

Kľúčové slová: odpeňovače, fermentácia, proteolytická aktivita, enzýmy, alkalická proteináza, fermentor, trepačka.

Enzýmy ako biokatalyzátory bielkovinovej povahy usmerňujú a ovládajú všetky životné procesy. Ich pôsobením sa urýchľujú a vyvolávajú biochemické reakcie, ktoré zabezpečujú organizmu látkovú výmenu.

Enzýmy získané zo živočíšnych a rastlinných zdrojov sú známe už dávno a využívajú sa v potravinárskom priemysle v relatívne veľkom množstve. Avšak ako stúpala cena rastlinných a živočíšnych zdrojov, hľadali sa možnosti ich náhrady v mikrobiálnych zdrojoch.

Výroba mikrobiálnych enzýmových preparátov je veľmi náročná a dá sa porovnať s výrobou antibiotík. Uskutočňuje sa vo fermentačných zariadeniach-fermentoroch na živných pôdach zaočkovovaných produkčným mikroorganizmom za sterilných podmienok, za neustáleho miešania a vzdušenia. Živné pôdy, ktoré sa používajú pri výrobe enzýmov sú relatívne koncentrované roztoky, obsah sušiny sa často pohybuje od 10 do 15 %. Ako zdroje uhlíka sa tu používajú: glukóza, sacharóza, laktóza, hydrolyzáty škrobu a pod. Ako zdroje dusíka sa používajú: kvasničný extrakt, kvasničný hydrolyzáty, peptón, kazeinový hydrolyzáty, sojový hydrolyzáty, aminokyseliny a pod.

Už samotné zloženie fermentačnej pôdy pri intenzívnom miešaní a vzdušení vedie k silnému peneniu, ktoré je potrebné v priebehu fermentačného procesu obmedzovať. Intenzita tvorby peny je podmienená teda jednak vzájomným vzťahom rôznych zložiek fermentačnej pôdy, množstvom a štádiom rastu produkčného mikroorganizmu a produktov metabolizmu. Okrem toho majú na tvorbu peny vplyv aj ďalšie faktory, ako je viskozita fermentačného média, pH pôdy a kultivačná teplota.

Vznik peny vedie na jednej strane k urýchlenému rozpusteniu kyslíka zo vzduchu v pôde, na druhej strane intenzívne penenie často zabraňuje maximálne využitie objemu fermentora, pretože je nebezpečie vypenenia a straty produktu, pričom sa narušia aseptické požiadavky kladené na technologický proces.

Otázky likvidácie peny sa vyskytujú v každom technologickom procese, kde vznikajú produkty mikrobiálneho pôvodu. Na zabránenie vypenenia fermentora sú tieto často vybavené mechanickými odpeňovačmi, pričom rôzni výrobcovia fermentorov používajú rôzne konštruované mechanické odpeňovače a s rôznou technickou úrovňou.

Veľký význam sa však vo fermentačnom priemysle pripisuje chemickým odpeňovačom. Z chemických odpeňovačov sa pri fermentačnej výrobe mikrobiálnych enzýmov používajú hlavne rastlinné oleje ako sú sojový olej, kľíčkový olej, slnečnicový olej a pod., ďalej silikonové oleje a rôzne iné odpeňovače vyrobené na báze kopolymérov polyetylénu, polypropylénu, polypropylénglykolov, etylénoxidov, propylénoxidov a propylénglykolov.

Pri výrobe enzýmov podobne ako v mikrobiologickom priemysle vôbec, sú pre odpeňovacie prostriedky kladené určité špecifické požiadavky. Sú to predovšetkým:

- rýchly pokles peny po aplikácii odpeňovača s dlhodobým účinkom,
- použité odpeňovače by mali byť účinné už v malých dávkach,
- vo fermentačných médiách by nemali ovplyvňovať prestup kyslíka,

— vzhľadom na to, že enzýmy sa využívajú prevažne v potravinárskom priemysle, je podmienka, aby používané odpeňovače neboli toxické,

— dostupnosť odpeňovačov z domácej výroby,

— nízka cena odpeňovačov.

Experimentálna časť

Pri riešení štátnej výskumnej úlohy výroby alkalických proteínáz submerzným spôsobom s použitím produkčného mikroorganizmu *Bacillus subtilis*, museli sme sa nevyhnutne zaoberať otázkami znižovania penenia v priebehu fermentácie. Fermentačné pokusy boli prevádzané na trepačke a v 5 l laboratórnom fermentore L. H. E. Hlavné zložky fermentačnej pôdy boli: pšeničná múka krmná, sojová múka a živné soli. Plnenie fermentora bolo 3 l, vzdušenie V/V.

Do základného výberu sme zaradili rôzne odpeňovače, ktoré sme mali možnosť získať z niektorých pracovísk z tuzemska a zo zahraničia. Boli to: Kontramín 210, Dow corning B, Pluronic, Glanapon 2000 conz., Depenol, sojový olej.

Ako kritérium vhodnosti jednotlivých odpeňovačov bolo stanovenie proteolytickej aktivity vo fermentačnej pôde, množstvo použitého odpeňovača, odpeňovacia účinnosť. Výsledky týchto pokusov sú uvedené v tabuľke 1.

Tab. 1.

Použitý odpeňovacie činidlo	Proteolytická aktivita ferm. pôdy [j . ml ⁻¹]	Množstvo použitého odpeňovača	Poznámka
Kontramín	0	60 ml prvých 8 h	vypenil
Depenol	0	150 ml	vypenil
Dow corning B	4 937,0	450 ml	vypenil pôda zraz.
Pluronic	0	160 ml/48 h	nevypenil pôda zraz.
Sojový olej	8 750,0	75 ml	nevypenil
Glanapon 2000 (ried. 8X)	11 550,0	25 ml	nevypenil

Ako vidno z tabuľky, Kontramín a Depenol sú nevhodné pre daný typ fermentácie, pretože ani prídavok vysokých dávok odpeňovačov nezabránil vypeneniu fermentačnej pôdy. Pluronic a Dow corning B sú nevhodné svojím chemickým zložením, pretože so zložkami fermentačnej pôdy vytvárajú zlúčeniny a tým pravdepodobne vyviažu potrebné živiny z kultivačnej pôdy, čo sekundárne vplyva na životný cyklus produkčného mikroorganizmu a tým na jeho produkčnú schopnosť. Sojový olej je účinný, ale použitý vo väčších dávkach zabraňuje dostatočnému prestupu kyslíka.

Najúčinnejší zo sledovaných odpeňovačov bol Glanapon 2000 konz., ktorý v zriedení 1 : 8 (podľa odporúčania výrobcu) postačil na zabránenie vypenenia počas 48 hodín fermentačného cyklu, pričom sa dosiahla najvyššia proteolytická aktivita vo fermentačnej pôde. Jeho nevýhodou je, že je z dovozu z devízovej oblasti.

Z tohoto dôvodu sme nadviazali spoluprácu s Výskumným ústavom petrochemickým v Novákoch, ktorý nám na požiadanie pripravil na odskúšanie 6 typov odpeňovacích činidiel typu Depenol, a to: Depenol 200, Depenol 205, Depenol 206, Depenol N 101, Depenol N 102, Depenol N 103.

Vhodnosť týchto odpeňovačov pre fermentáciu alkalické proteínázy sme odskúšali najprv na trepačke, pri použití rovnakej fermentačnej pôdy ako v prvom pokuse. Uvedené odpeňovače sme dávkovali v koncentracii 0,2; 1,0; 2,0 %. Prídavok 0,2 % odpeňovača je považované pri fermentáciách za ešte optimálne množstvo aj z ekonomického hľadiska. Výsledky týchto pokusov sú v tabuľke 2.

Z nameraných hodnôt vidno, že použité odpeňovače sú v podstate rovnocenné pri použití 0,2 % odpeňovačov. Pri použití väčších množstiev sú výsledky už značne odlišné. Najslabší inhibičný vplyv na produkčnú aktivitu mikroorganizmu sa dosiahol s použitím odpeňovača Depenol N 101.

Tab. 2.

Použitý odpeňovací činidlo	Množstvo použitého odpeňovača [%]	Proteolytická aktivita ferm. pôdy [j. ml ⁻¹]	pH
Depenol 200	0,2	13 223,7	7,92
	1,0	725,0	7,58
	2,0	720,0	7,43
Depenol 205	0,2	13 373,2	7,78
	1,0	7 724,2	7,83
	2,0	1 099,9	7,60
Depenol 206	0,2	13 273,7	8,05
	1,0	4 899,5	7,87
	2,0	145,0	6,03
Depenol N 101	0,2	13 973,2	7,98
	1,0	7 824,5	8,05
	2,0	3 500,0	8,00
Depenol N 102	0,2	13 548,6	8,20
	1,0	1 824,8	7,99
	2,0	474,1	7,45
Depenol N 103	0,2	12 698,7	7,79
	1,0	2 024,0	7,75
	2,0	0	7,35

Na základe týchto výsledkov sme použili Depenol N 101 na odskúšanie jeho odpeňovacej účinnosti pri fermentácii alkalické proteínázy v laboratórnom fermentore.

Priebeh fermentácie bol sledovaný v určitých časových úsekoch mikroskopicky, stanovením proteolytickej aktivity a meraním pH. Výsledky sú v tabuľke 3.

Tab. 3.

Hodina fermentácie [h]	Proteolytická aktivita fermentačnej pôdy [j. ml ⁻¹]	pH
24	20,0	8,18
29	375,0	8,05
44	10 474,0	8,42
46	12 548,7	8,23
48	13 398,7	8,37

Tento fermentačný pokus nám potvrdil vhodnosť použitého odpeňovača Depenol N 101 pri fermentácii alkalické proteínázy. Dosiahnuté výsledky vo fermentéri sú zrovnateľné s výsledkami na trepačke.

Záverom možno konštatovať, že sa nám podarilo nájsť vhodný odpeňovací prostriedok domácej výroby v podobe Depenolu N 101, ktorý je vhodný pre submerznú fermentáciu alkalické proteínázy. Výsledky získané laboratórne sa v súčasnosti overujú v poloprevádzkových podmienkach v enzýmovej poloprevádzke Dolná Krupá.

Literatúra

- [1] BERNLOHR, R. W. a CLARK, V.: J. Bacteriol., **105**, 1971.
- [2] VIESTUR, U. E., KRISTAPSONS, M. Ž., DOLGICER, N. S.: Spôsobu i ustrojstva dľa penogašenija v mikrobiologických procesach, Moskva 1973.
- [3] TICHOMIROV, V. K.: Peny teorija i praktika ich polučeniia i rozrušeniia, Moskva 1975.
- [4] XI. seminár o tenzidoch a detergentoch, Bojnice 1975.
- [5] XVIII. seminár o tenzidoch a detergentoch a IX. seminár o penení a odpeňovaní, Žilina 1934.
- [6] ŠNAJDROVÁ, A. et al. Priebežná správa výskumnej úlohy S 11-529-113.
- [7] KALUNJANC, K. A., GOLGER, L. I.: Mikrobnyje fermentnyje preparaty, 1979.
- [8] Firemná literatúra firmy Novo Industri.

Šnajdrová, A. - Kuzmová, E. - Sitkey, V.: Použitie odpeňovacích prostriedkov pri fermentačnej výrobe alkalických proteínáz. Kvas. prům., **32**, 1986, č. 5, s. 103—108.

V technológii výroby mikrobiálnych enzýmových preparátov hrá použitie odpeňovacích prostriedkov významnú úlohu. Článok pojednáva o požiadavkách kladených na odpeňovače používané v mikrobiologickom priemysle a použití chemických odpeňovačov pri submerznej fermentácii alkalické proteínázy pomocou produkčného mikroorganizmu *Bacillus subtilis*. V experimentálnej časti sú porovnávané odpeňovače rôzneho typu zahraničnej a domácej výroby. Experimentálne bolo preukázané, že najvhodnejším zo sledovaných odpeňovačov domácej výroby bol Depenol N 101, vyvinutý pre tieto účely vo VÚP Nováky.

Шнайдрова, А., Кузмова, Е., Ситкей, В.: Применение пеногасительных средств при микробиологическом производстве щелочных протеиназ. Квас. прум. **32**, 1986, № 5, стр. 106—108.

V technologii производства микробных ферментных препаратов применение пеногасительных средств играет важную роль. Статья рассматривает требования, предъявляемые к пеногасительным средствам в микробиологической промышленности и применение химических пеногасительных средств при глубокой ферментации щелочной протеиназы при помощи производственного микроорганизма *Bacillus subtilis*. В экспериментальной части сравниваются пеногасительные средства разного типа зарубежного и отечественного производства. Было доказано, что лучше всех из исследуемых пеногасительных средств эти требования удовлетворяет Депенол Н 101, разработанный с этой целью НИИ нефтехимической промышленности.

Šnajdrová, A. - Kuzmanová, E. - Sitkey, V.: Application of Antifoams During Fermentation of Alkaline Proteases. Kvas. prům. **32**, 1986, No. 5, pp. 106—108.

An application of antifoams in the production of microbial enzyme preparates is very significant. The article describes the application of chemical antifoams during a submerged fermentation of alkaline protease with the production strain of *Bacillus subtilis*. A comparison of various types of antifoams of the domestic and foreign production is made in the experimental part of the article. The experimental result proved that the most suitable preparate of domestic antifoams was Depenol N 101 that was developed for this purpose in the Research Institute VÚP in Nováky.

Šnajdrová, A. - Kuzmová, E. - Sitkey, V.: Anwendung von Entschäumungsmitteln bei der fermentativen Produktion alkalischer Proteinase. Kvas. prům. **32**, 1986, Nr. 5, S. 106—108.

In der Technologie der Erzeugung mikrobieller Enzympräparate spielt die Anwendung von Entschäumungsmitteln eine bedeutende Rolle. Der Artikel erörtert die Forderungen, die an die in der mikrobiologischen Industrie angewendeten Entschäumungsmittel gestellt

werden; weiter wird die Applikation der chemischen Entschäumer bei der Submersionsfermentation der alkalischen Proteinase des Produktions-Mikroorganismus *Bacillus subtilis* behandelt. In dem experimentellen Teil werden Entschäumer verschiedener Typen tschechoslowakischer und ausländischer Provenienz verglichen. Durch Versuche wurde bewiesen, daß aus den verfolgten inländischen Entschäumern Depenol N 101, der zu diesen Zwecken in VÚP Nováky entwickelt wurde, am besten geeignet ist.