

Jolanta Bohdziewicz,
Michał Bodzek,
Irena Korus

Instytut Inżynierii i Technologii Wody,
Ścieków i Odpadów
Politechnika Śląska
Gliwice

Oczyszczanie i zateżnianie enzymów pektynolitycznych metodą ultrafiltracji

1. Wstęp

Obserwowany w ostatnich latach coraz intensywniejszy rozwój biotechnologii wynika między innymi z rozwoju procesów fermentacji prowadzonych z udziałem mikroorganizmów jedno- i wielokomórkowych oraz biochemicznej konwersji przy użyciu immobilizowanych enzymów lub całych komórek mikroorganizmów. Sugeruje się (1), że w najbliższym dziesięcioleciu biotechnologia skierowana będzie na wytwarzanie produktów w małych ilościach, za to o dużych wartościach oraz takich, których innymi sposobami nie da się otrzymać. W coraz większym stopniu poszukuje się efektywniejszych i uzasadnionych ekonomicznie sposobów hodowli mikroorganizmów, metod odzyskiwania i izolowania kosztownych i nietrwałych produktów oraz usuwania toksycznych odpadów. W tej sytuacji membrany oraz ciśnieniowe techniki rozdzielania membranowego stały się obiektem wzrastającego zainteresowania jako sposoby umożliwiające rozwiązanie wielu problemów technologicznych.

Szczególną uwagę zwrócono na proces ultrafiltracji, charakteryzujący się niską energochłonnością, niewielkimi kosztami eksploatacji, możliwością prowadzenia procesu w temperaturze otoczenia i bez przemian fazowych, brakiem konieczności wprowadzania do układu dodatkowych reagentów chemicznych, a także możliwością osiągnięcia w jednej operacji zarówno oczyszczenia, jak i zateżnienia makrocząsteczek i koloidów. Istnieją dwa zasadnicze kierunki wykorzystania ultrafiltracji w procesach biotechnologicznych, a mianowicie do wydzielania, zateżniania i oczyszczania produktów fermentacji oraz do zapewnienia ciągłości pewnych układów reakcyjnych.

2. Zastosowanie procesu ultrafiltracji do izolowania białek enzymatycznych z cieczy pofermentacyjnej

Wiadomo, że większość procesów biotechnologicznych opiera się na reakcjach fermentacji. W tabeli 1 przedstawiono zawartość suchej masy w brzeczce pofermentacyjnej typowych procesów biotechnologicznych, natomiast dane umieszczone w tabeli 2 charakteryzują ich właściwości fizykochemiczne (2).

Tabela 1

Stężenie składników w typowej pohodowlanej cieczy pofermentacyjnej (cyt. za (2))

Produkt	Stężenie % masowy
bakterie albo drożdże (pojed. kom. białka)	3 - 5
grzyby (produkcja kwasu cytrynowego, penicyliny)	1.5 - 3
komórki zwierzęce	0.05 - 0.2
tkanki roślinne	0.1 - 5
kwas cytrynowy	10

kwas mlekowy	5
enzymy pozakomórkowe	0.5 – 1.0
witaminy	0.0005 – 0.1
antybiotyki	1 – 5
etanol	7 – 12

Tabela 2

Fizykochemiczna charakterystyka cieczy pofermentacyjnej (cyt. za (2))

Rodzaj substancji stałej	Wymiar (μm)	Lepkość 2% r-r zawiesiny (cP)	Odporność na siły ścinające
komórki bakterii	1x2	1,5	dobra
komórki drożdży	2x10	1,5	słaba
komórki tkanki zwierzęcej	40x40	3	słaba
komórki roślin	100x100	3	wystarczająca

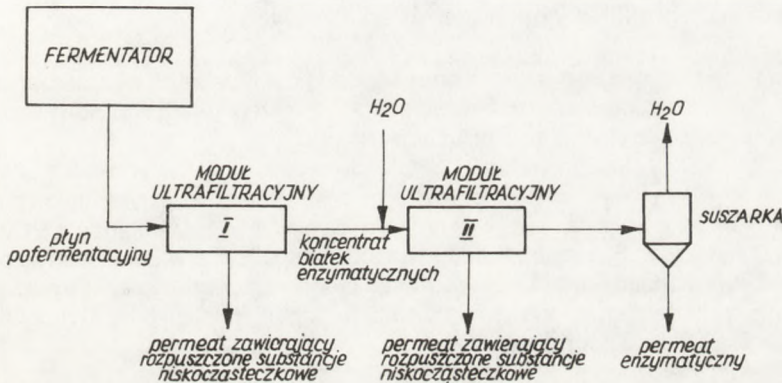
W większości przemysłowych procesów fermentacyjnych pierwszym etapem jest oddzielenie z cieczy pofermentacyjnej biomasy drobnoustroju metodą wirowania lub konwencjonalnej filtracji. Procesy te umożliwiają usunięcie z roztworów substancji występujących w formie zawiesiny, między innymi komórek mikroorganizmów oraz ich fragmentów, a także substancji odpadowych występujących w postaci koloidów. Aby jednak dana metoda była uzasadniona ekonomicznie w skali przemysłowej musi być procesem ciągłym. Tę zaletę posiadają wirówki, np. typu Scharpless. Są one jednak bardzo kosztowne w eksploatacji, a ich wydajność jest funkcją wielu zmiennych, głównie średnicy oddzielanych cząsteczek oraz gęstości i lepkości roztworu. Co więcej, w trakcie pracy wirówki wydzielają się duże ilości ciepła i w związku z tym wymagają one skomplikowanych systemów chłodzenia. Proces filtracji nie jest limitowany wielkością zatrzymywanych cząsteczek, jednakże poważny problem stanowi tutaj spadek szybkości filtracji związany z akumulowaniem się na materiale filtru komórek mikroorganizmów i innych substancji nierozpuszczonych.

Bardziej użyteczną okazała się filtracja typu *cross flow*, będąca metodą przemysłowej ultrafiltracji, w której nadawa przepływa równolegle do powierzchni filtru membranowego a prostopadle do kierunku strumienia permeatu. W przypadku zachowania wysokiego stosunku powierzchni czynnej membrany do objętościowej wydajności modułu można doprowadzić do tego, że grubość wytwarzanego placka filtracyjnego na powierzchni membrany jest mała, a jego oporność przy przenikaniu cieczy odpowiednio niska. Stosując membrany o odpowiednich właściwościach rozdzielczych oraz odpowiednie parametry procesowe można osiągnąć współczynnik retencji substancji stałych wynoszący 100%. Wydajność filtru można dodatkowo rozszerzyć przez zwiększenie powierzchni czynnej membran. Z danych zawartych w tabeli 2 wynika, że nie wszystkie produkty biologiczne są odporne na oddzielanie tą metodą. Niektóre brzeczki pofermentacyjne charakteryzują się bardzo dużą lepkością przy jednocześnie niskim stężeniu produktu podstawowego, co w znacznym stopniu, w przypadku tego rodzaju przepływu, przyczynia się do występowania zjawiska polaryzacji stężeniowej, a w związku z tym znacznego obniżenia strumienia permeatu.

W ostatnich latach proces ultrafiltracji znalazł najszersze zastosowanie do przemysłowego oczyszczania i zateżnienia enzymów. Mniejsze sukcesy osiągnięto w ich rozfrakcjonowywaniu, z wyłączeniem takiego układu kiedy wymiary rozdzielanych cząsteczek różniły się dziesięciokrotnie od pozostałych. Należy pamiętać o tym, że otrzymana po wstępnej filtracji ciecz pofermentacyjna charakteryzuje się znacznym rozcienczeniem, skomplikowanym składem i zróżnico-

wanymi właściwościami fizykochemicznymi, a zawarte w niej białka enzymatyczne wykazują dużą wrażliwość na temperaturę, pH roztworu, jego siłę jonową, rodzaj rozpuszczalnika oraz oddziaływania mechaniczne (występowanie sił ścinających).

Dotychczas, na skalę przemysłową proces zatężania aktywnych białek prowadzony jest najczęściej metodami wyparnymi, a do ich izolacji stosuje się wysalanie lub wytrącanie rozpuszczalnikami organicznymi. Fakt, że ciecz pochodząca otrzymana w wyniku biosyntezy enzymów przez drobnoustroje zawiera oprócz aktywnych białek liczne związki o niższych masach cząsteczkowych (nieorganiczne sole, węglowodany, barwniki oraz nieaktywne białka), przyczynił się do powstania koncepcji wprowadzenia do podstawowego cyklu technologicznego procesu ultrafiltracji, dzięki któremu można ją częściowo oczyścić od tych domieszek (rys. 1).



Rys. 1. Ultrafiltracyjne oczyszczanie i zatężanie białek enzymatycznych.

W tej sytuacji podjęliśmy w naszym Instytucie doświadczenia mające na celu ocenę możliwości wykorzystania syntetyzowanych przez nas z polimerów krajowych (poliakrylonitryl – PAN, poli[chlorek winylu] – PCW), asymetrycznych membran ultrafiltracyjnych do oczyszczania i zatężania surowych preparatów enzymów pektynolitycznych (Pektopol-P), produkowanych w Zakładach Przemysłu Owocowo-Warzywnego „PEKTOWIN” w Jaśle. Pektopol-P jest produktem ciekłym, otrzymywanym przez wodną ekstrakcję enzymów z hodowli nietoksycydnego szczepu grzyba nitkowatego *Aspergillus niger*. Otrzymuje się go na drodze zagęszczania ekstraktu z grzybami w urządzeniach wyparnych po jego wstępnym przefiltrowaniu. Wiadomo, że enzymy pektynolityczne są jedną z ważniejszych grup enzymów stosowanych w przemyśle spożywczym. Hydrolizują one kwaśne wielocukry, zwane substancjami pektynowymi, które nie występują w stanie wolnym, ale w postaci złożonego kompleksu protopektyny. W skład substancji pektynowych wchodzi takie polisacharydy, jak: poligalakturonidy o różnym stopniu metoksylicacji, ramnogalakturonidy, arabany, galaktany i arabanogalaktany (3).

Stopień ultrafiltracyjnego zatężania i oczyszczania tych białek będzie przede wszystkim zależał od zmiany lepkości roztworu w czasie zatężania oraz związanej z tym intensywności występowania zjawiska polaryzacji stężeniowej. O efektywności samego procesu zadecydują ponadto: sposób jego prowadzenia, rodzaj modułu ultrafiltracyjnego, właściwości transportowe i separacyjne membran oraz parametry eksploatacyjne procesu ultrafiltracji. W związku z tym

część eksperymentalna pracy wykonana była według następującego planu. Pierwszy etap badań dotyczył doboru membrany, która nadawałaby się do oczyszczania i zateżenia enzymów pektynolitycznych *Aspergillus niger*. Następnie, wyznaczono optymalne parametry procesowe ultrafiltracji (ciśnienie transmembrańowe, prędkość liniową przepływu roztworu nad powierzchnią membrany, temperaturę, pH) i w oparciu o nie ustalono optymalny stopień zateżenia surowego preparatu pektynolitycznego. Ostatni cykl badań obejmował zbadanie możliwości zagęszczenia retentatu ultrafiltracyjnego metodą wyparną pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 313°K.

3. Dobór membrany odpowiedniej do ultrafiltracji enzymów pektynolitycznych wytwarzanych przez *Aspergillus niger*

3.1. Preparatyka ultrafiltracyjnych membran rurowych

Badania mające na celu wytypowanie najkorzystniejszej membrany do oczyszczania i zateżenia surowego preparatu pektynolitycznego Pektopol – P przeprowadzono na membranach syntetyzowanych z poliakrylonitrylu oraz z poli(chloroku winylu).

Surowcem do otrzymywania membran z PAN było niemiatowane włókno z Zakładów Włókien Sztucznych „Chemitex–Anilana”, skąd pochodził również poliakrylonitrylowy roztwór przedzalniczy stosowany do wytwarzania włókna anilanowego (PRZ). Membrany z PCW otrzymywano z PCW–Tarnwinył S–60 produkowanego metodą suspensyjną w Zakładach Azotowych w Tarnowie. W tabeli 3 przedstawiono skład roztworów błonotwórczych, symbolikę oraz warunki preparowania wszystkich badanych przez nas membran. Ich charakterystykę fizykochemiczną i technikę formowania opisano poprzednio (4–6).

Tabela 3

Skład roztworów błonotwórczych oraz warunki preparowania membran ultrafiltracyjnych

Polimer	Symbol membrany	Skład roztworu błonotwórczego % mas.		Temp. roztworu błonotwórczego °K	Czas odparowania s
		polimer	rozpuszczalnik ¹		
włókno PAN–anilana	PAN–17,5	17,5	82,5	291–293	10
	PPAN–21	20,0	80,0	291–293	10
	AN–20	21,0	79,0	291–293	10
poliakrylonitrylowy roztwór przedzalniczy do prod. włókna PAN–anilana	PRZ	12,5–13,0	87,5–87,0 ²	291–293	10
poli(chlorok winylu) Tarnwinył S–60	PCW–14	14,0	86,0	291–293	5

Temperatura preparowania: 291–293°K temp. łaźni żelującej: 293° K³; czas żelowania: 600 s; grubość wylewania: 0,2 mm.

¹Dimetyloformamid.

²Okolo 45% wodny roztwór rodanku sodowego.

³W przypadku membrany PCW–14 temp. łaźni żelującej: 278° K.

3.2. Badanie charakterystyki membran rurowych pod kątem ich przydatności do oczyszczania i zateżenia surowych preparatów pektynolitycznych

Zarówno membrany z PAN jak i PCW testowane były w trzech etapach. Pierwszy, obejmował wpracowanie błony (ostateczne uformowanie się jej struktury) w wyniku filtrowania przez nią w ciągu 5 godzin wody destylowanej pod ciśnieniem, kolejno 1h – 0,05 MPa, 1h – 0,1 MPa, 1h – 0,2 MPa, 1h – 0,3 MPa oraz 2h – 0,4 MPa. W drugim etapie badań określono zależność objętościowego strumienia wody przypadającego na jednostkę powierzchni membrany od ciśnienia. W tym celu dokonano pomiaru objętościowego strumienia wody wypływającej w czasie 45 minut kolejno dla poszczególnych wartości ciśnień. W końcowej fazie badań membrany testowano ciekłym preparatem enzymatycznym stosując następujące parametry:

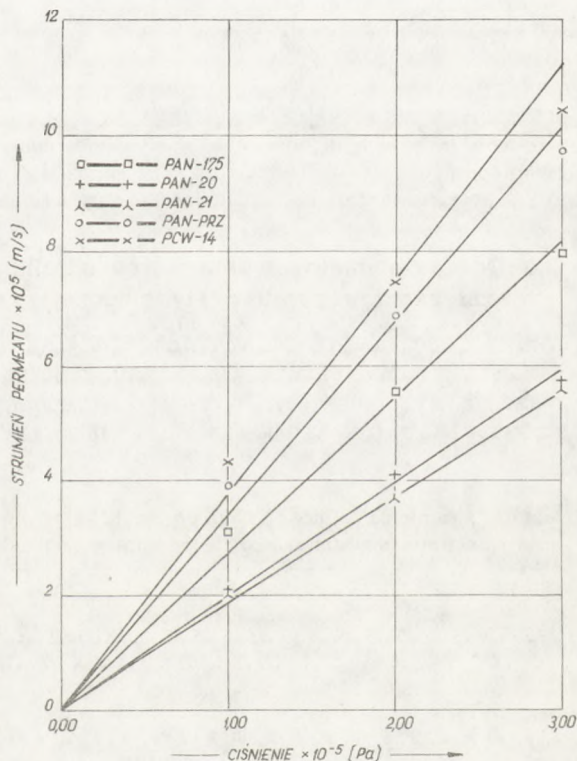
- początkowe stężenie preparatu enzymatycznego – 4% mas.,
- ciśnienie transmembranowe – 0,2 MPa,
- prędkość liniowa nadawy nad powierzchnią membrany – 2 m/s,
- temperatura – 296° K,
- odzysk permeatu – 50%.

Wyniki otrzymane w ostatnim etapie miały określić pełną charakterystykę membrany, na której w przypadku zadowolających rezultatów przeprowadzono by pełną optymalizację podstawowych parametrów procesu oczyszczania i zateżenia badanego preparatu enzymatycznego.

Dla każdej próby wyznaczano objętościowy strumień permeatu, przepuszczalność membrany, opór membrany (7), a także ogólną aktywność pektynolityczną permeatu i retentatu (8), oznaczoną wiskozymetrycznie. Jednostką aktywności pektynolitycznej (°PM) określa w ilu litrach 0,5% roztworu pektyny nastąpi spadek lepkości o 85% w ciągu 5h w 20°C pod działaniem 1 kg preparatu pektynolitycznego.

Wyniki transportu wody przez syntetyzowane przez nas membrany ultrafiltracyjne w zależności od stężenia polimeru podstawowego w roztworze błonotwórczym oraz stosowanego ciśnienia przedstawiono na rys.2.

Dla wszystkich pięciu badanych membran (PAN i PCW) stwierdzono liniową zależność transportu wody od ciśnienia (do 0,3 MPa). Obliczono również wartości przepuszczalności membran (A_w) uzyskane po aproksymacji wyników pomiarów do równania $J = A_w \times (\Delta P)$. Otrzymane wyniki świadczą o dobrej zgodności danych doświadczalnych z obliczonymi (współczynnik korelacji 0,99). Wzrost procentowego udziału polimeru w roz-



Rys.2. Zależność transportu wody od ciśnienia transmembranowego dla membran z PAN i PCW.

tworze błonotwórczym przyczynił się we wszystkich przypadkach do zmiany struktury porowatej otrzymanych membran, zwiększając ich zwartość, a tym samym obniżając wartość średniego promienia porów. Zmiany struktury membrany spowodowały także zmiany w ich właściwościach transportowo-rozdzielczych.

Z przetestowanych preparatem pektynolitycznym membran najefektywniejszą okazała się błona o przepuszczalności w odniesieniu do wody około $1,87 \times 10^{-10}$ m/s x Pa. Wprawdzie średni strumień objętościowy permeatu był niższy w porównaniu z innymi membranami (tab.4), jednak otrzymany filtrat przy stosunkowo wysokim 50% odzysku permeatu posiadał bardzo niską aktywność pektynolityczną (55° PM). W związku z tym dalsze badania dotyczące doboru podstawowych parametrów ultrafiltracyjnego oczyszczania i załączenia Pektopolu-P prowadzono na tej właśnie membranie.

Tabela 4

Zależność aktywności preparatu pektynolitycznego „Pektopol P” od rodzaju stosowanej membrany ultrafiltracyjnej

Rodzaj membrany*	Średni strumień objętościowy permeatu	Aktywność pektynolityczna °PM	
		retentat	filtrat
PAN - 21	$0,96 \times 10^{-5}$	6891	55
PAN - 20	$1,11 \times 10^{-5}$	5925	89
PAN - 17,5	$1,27 \times 10^{-5}$	5380	460
PRZ	$1,26 \times 10^{-5}$	5690	432
PCW - 14	$1,09 \times 10^{-5}$	5450	430

*Grubość membrany: 0,2 mm. Ciśnienie transmembranowe: 0,2 MPa; liniowa prędkość przepływu roztworu nad powierzchnią membrany: 2 m/s; temperatura: 303° K; początkowa aktywność preparatu: 3360°PM; początkowe stężenie preparatu: 4,0%; odzysk filtratu: 50%.

3.3. Dobór optymalnych parametrów ultrafiltracyjnego oczyszczania i załączenia preparatu pektynolitycznego

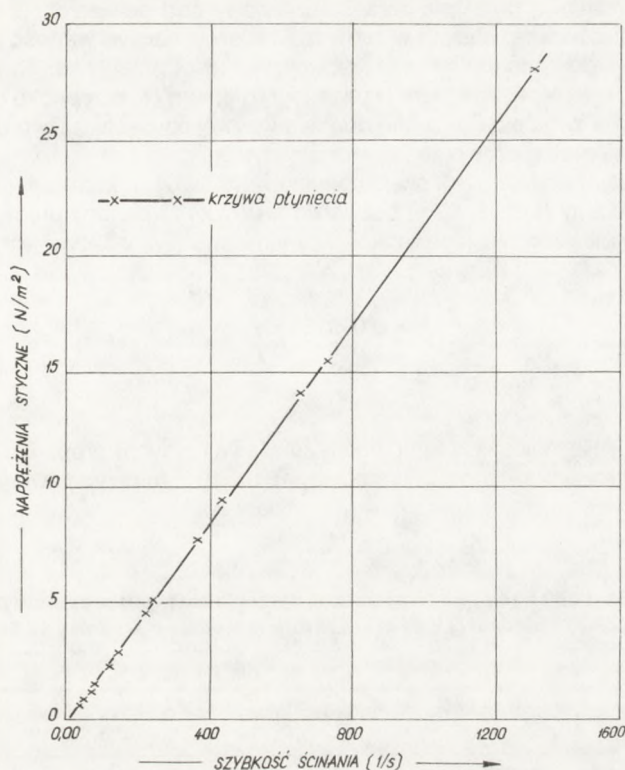
Wpływ parametrów procesowych ultrafiltracji na właściwości transportowe i separacyjne membran polimerowych, na przebieg samego procesu oraz na aktywność preparatu enzymatycznego został już omówiony (7). Wyniki dotyczące wpływu ciśnienia transmembranowego na objętościowy strumień permeatu i współczynnik retencji aktywnych białek przedstawia tabela 5.

Tabela 5

Zależność strumienia objętościowego permeatu i aktywności pektynolitycznej filtratu i retentatu od ciśnienia transmembranowego dla membrany z poliakrylonitrylu ($A_w = 1,87 \times 10^{-10}$ m/s x Pa)

Ciśnienie MPa	Średni strumień objętościowy permeatu m/s	Aktywność pektynolityczna PM	
		retentat	permeat
0.1	0.79×10^{-5}	6778	67
0.2	1.17×10^{-5}	6876	61
0.3	1.35×10^{-5}	7299	65
0.4	1.39×10^{-5}	7379	89

Liniowa prędkość przepływu roztworu: 2 m/s; temperatura: 303° K; odzysk filtratu: 50%; [odzysk filtratu: (objętość filtratu)/(początkowa objętość roztworu enzymatycznego) x 100] początkowe stężenie preparatu: 4.2%; początkowa aktywność preparatu 3220 °PM.



Rys.3. Krzywa płynięcia preparatu pektynolitycznego „PEKTOPOL-P” ($r = 293^{\circ}\text{K}$, $p = 101,3 \text{ kPa}$).

Zależność objętościowego strumienia permeatu (J) roztworu enzymatycznego przez badaną przez nas membranę PAN-21 od stosowanego ciśnienia (ΔP) ogólnie opisać można równaniem potęgowym

$$J = A_p \times (\Delta P), \quad (1)$$

gdzie b jest wykładnikiem potęgowym zależnym od zwartości membrany. Aproxymując wyniki uzyskane w badaniach do równania (1) otrzymujemy zależność:

$$J = 9,97 \times 10^{-6} \times (\Delta P)^{0,39}, \quad (2)$$

gdzie objętościowy strumień permeatu posiada wymiar m^3/s , a stosowane ciśnienie wyrażone jest w Pa.

Tak jak się można tego było spodziewać, wraz ze wzrostem ciśnienia w układzie membranowym wyraźnie rośnie strumień permeatu uzyskany z filtrowanego preparatu pektynolitycznego. W zakresie stosowanych przez nas ciśnień od 0,1 do 0,4 MPa wartość średniego objętościowego strumienia permeatu wzrosła o 75%, przy czym największy jej wzrost zaobserwowano w zakresie ciśnień od 0,1 do 0,2 MPa (47,3%). Nie stwierdzono wyraźnego wpływu ciśnienia na aktywność pektynolityczną filtratu i retentatu. Aktywność filtratu jest 83 razy niższa w porównaniu z aktywnością retentatu.

Aby wyznaczyć liniową prędkość przepływu nadawy nad powierzchnią membrany zapewniającą przepływ turbulentny należało w pierwszej fazie wyznaczyć wartość liczby Re w funkcji stężenia roztworu, jego temperatury oraz liniowej prędkości przepływu. To jednak wiązało się bezpośrednio z określeniem charakteru filtrowanego medium (w przypadku płynu nienutonowskiego $\eta \neq \text{const.}$). W tym celu dokonano pomiaru krzywej płynięcia roztworu enzymatycznego. Sporządzony wykres reologiczny przedstawiono na rys.3.

Wysokie wartości współczynników determinacji (0,9997) i korelacji (0,9999) oraz niski standardowy błąd oceny ($1,339 \times 10^{-2}$) pozwalają twierdzić, że badany preparat posiada właściwości płynu niutonowskiego, a jego lepkość dynamiczna wyznaczona jest kątem nachylenia prostej:

$$\tau = 0,002154 \times \gamma \quad (3)$$

i wynosi $\eta = 2,154 \text{ N} \times \text{s/m}^2 \times 10^{-3}$.

Zależność liczby Reynoldsa od temperatury, stężenia roztworu preparatu pektynolitycznego i prędkości liniowej roztworu w module o średnicy $16,5 \times 10^{-3} \text{ m}$ przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6

Zależność liczby Reynoldsa (L_{Re}) od temperatury, stężenia roztworu preparatu pektynolitycznego „Pektopol-P” i prędkości liniowej roztworu w module o średnicy $16,5 \times 10^{-3} \text{ m}$

Stężenie roztworu pektynolitycznego %	L_{Re} dla $T = 285^\circ\text{K}$			
	Prędkość liniowa $u = 1\text{m/s}$	Prędkość liniowa $u = 2\text{m/s}$	Prędkość liniowa $u = 3\text{m/s}$	Prędkość liniowa $u = 4\text{m/s}$
4	12772	25544	38316	51088
6	11723	23446	35169	46892
8	10829	21658	32487	43316
10	10098	20196	30294	40392
12	9304	18608	27912	37216
	L_{Re} dla $T = 293^\circ\text{K}$			
4	15637	31274	46911	62548
6	14197	28394	42591	56788
8	13619	27238	40857	54476
10	12576	25152	37728	50304
12	11728	23456	35184	46912
	L_{Re} dla $T = 303^\circ\text{K}$			
4	19612	39224	58836	78448
6	17487	34974	52461	69948
8	16996	33992	50988	67984
10	15722	31444	47166	62888
12	14943	29886	44829	59771

Wpływ liniowej prędkości przepływu roztworu nad powierzchnią membrany na jego średni objętościowy strumień permeatu oraz zdolność membrany do zatrzymywania białek enzymatycznych badaliśmy dla wartości od 1 m/s do 4 m/s (tab.7).

Tabela 7

Zależność strumienia objętościowego permeatu i retentatu od liniowej prędkości przepływu preparatu nad powierzchnią membrany z poliakrylonitrylu ($A_w = 1,87 \times 10^{-10}$ m/s x Pa)

Liniowa prędkość przepływu m/s	Średni strumień objętościowy permeatu m/s	Aktywność pektynolityczna °PM	
		retentat	permeat
1	$0,66 \times 10^{-5}$	4846	72
2	$1,31 \times 10^{-5}$	5863	69
3	$1,45 \times 10^{-5}$	5798	74
4	$1,52 \times 10^{-5}$	5866	73

Ciśnienie: 0,2 MPa; temperatura: 303° K; odzysk filtratu: 50%; początkowa aktywność preparatu: 3220°PM; początkowe stężenie preparatu: 4,2%.

Objętościowy strumień permeatu wzrósł w tym zakresie 2,3 razy, przy czym największy jego wzrost zaobserwowano przy zmianie prędkości liniowej z 1 m/s na 2 m/s (99,3%). Zależność strumienia permeatu roztworu pektynolitycznego (J) od stosowanej w układzie liniowej prędkości przepływu (u) można opisać również równaniem potęgowym:

$$J = 7,22 \times 10^{-6} \times u^{0,612}, \quad (4)$$

gdzie: J m/s; u m/s.

Wyznaczony dla tego równania współczynnik korelacji jest wyższy od 0,94.

Kolejnym parametrem wpływającym na efektywność ultrafiltracji jest temperatura. Badania przeprowadzono w przedziale temperatur 292–309°K, a wyniki przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8

Zależność strumienia objętościowego permeatu i retentatu od temperatury roztworu zatężanego dla membrany z poliakrylonitrylu ($A_w = 87 \times 10^{-10}$ m/s x Pa)

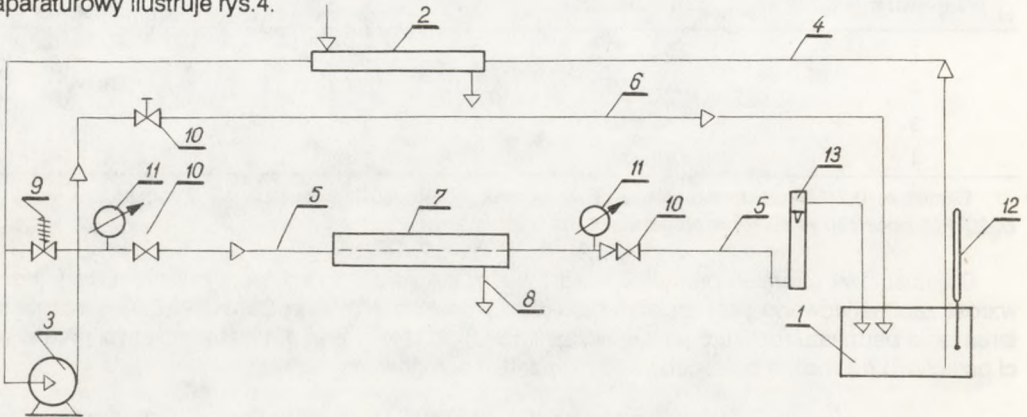
Temperatura °K	Średni strumień objętościowy permeatu m/s	Aktywność pektynolityczna °PM	
		retentat	permeat
292–293	$0,84 \times 10^{-5}$	5698	67
303–304	$1,26 \times 10^{-5}$	5786	71
308–309	$1,38 \times 10^{-5}$	5706	70

Ciśnienie: 0,2 MPa; liniowa prędkość przepływu roztworu: 2 m/s; odzyski filtratu: 50%; początkowe stężenie permeatu: 4,2%; początkowa aktywność preparatu: 3220 °PM.

Ze wzrostem temperatury o około 20 stopni średni strumień permeatu roztworu pektynolitycznego rośnie o 62,8%, natomiast aktywności filtratu nie ulegają zmianie. Nie stwierdzono również różnicy w kwasowości roztworu enzymatycznego poddawanego procesowi ultrafiltracji i retentatu (pH = 3,41).

4. Próby ultrafiltracyjnego oczyszczania i zażęzania rozcieńczonego preparatu pektynolitycznego w warunkach laboratoryjnych

Proces ten prowadzony był w układzie szarżowym, w którym roztwór zażęzany (60 dm^3) pozostawał w obiegu do osiągnięcia założonej dziesięciokrotnej objętościowej redukcji nadawy. W module zastosowano wytypowane wcześniej jako najefektywniejsze membrany rurowe z włókna poliakrylonitrylowego o przepuszczalności dla wody $1,87 \times 10^{-10} \text{ m/s} \times \text{Pa}$. Schemat aparaturowy ilustruje rys.4.



Rys.4. Zestaw aparaturowy układu badawczego z rurowym modulem membranowym: 1 – zbiornik, 2 – wymiennik ciepła, 3 – pompa, 4 – przewód ssący, 5 – przewód tłoczny, 6 – przewód bocznikujący, 7 – moduł ultrafiltracyjny, 8 – odprowadzenie ultrafiltratu, 9 – zawór bezpieczeństwa, 10 – zawory, 11 – manometr, 12 – termometr, 13 – rotametr.

Natomiast w tabeli 9 przedstawiono warunki oraz wyniki ultrafiltracyjnego zażęzania. Widać wyraźnie, że wraz ze wzrostem odzysku filtratu maleje strumień permeatu, przy czym w początkowym etapie spadek ten jest nieznaczny.

Tabela 9

Ultrafiltracyjne oczyszczanie i zażęzanie pektynolitycznego roztworu enzymatycznego

Stopień odzysku filtratu %	Strumień permeatu m/s		Aktywność pektynolityczna ŁPM		Sucha masa kg/m^3	
	chwilowy	średni	retentat	filtrat	retentat	filtrat
10,0	$1,38 \times 10^{-5}$	$1,43 \times 10^{-5}$				
20,0	$1,38 \times 10^{-5}$	$1,41 \times 10^{-5}$				
30,0	$1,28 \times 10^{-5}$	$1,38 \times 10^{-5}$				
40,0	$1,25 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-5}$				
50,0	$1,14 \times 10^{-5}$	$1,31 \times 10^{-5}$	8156	14	44,8	35,5
60,0	$1,08 \times 10^{-5}$	$1,27 \times 10^{-5}$	9831	50	48,2	36,7
70,0	$1,06 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-5}$	12786	83	55,0	37,3
80,0	$0,82 \times 10^{-5}$	$1,18 \times 10^{-5}$	17430	123	62,2	38,1
90,0	$0,45 \times 10^{-5}$	$1,04 \times 10^{-5}$	30976	336	90,6	42,4

Stała przepuszczalności membrany PAN-21, $1,87 \times 10^{-10} \text{ m/s} \times \text{Pa}$; ciśnienie: 0,3 MPa; liniowa prędkość przepływu: 3 m/s; temperatura: 295–298° K; początkowa aktywność roztworu enzymatycznego: 3366°PM; początkowe stężenie roztworu enzymatycznego: $41,86 \text{ kg/m}^3$ (4,15%)*; początkowa zawartość związków mineralnych: $9,98 \text{ kg/m}^3$; ChZT roztworu enzymatycznego: 54864 mg O_2/dm^3 ; odzysk filtratu: 90%.

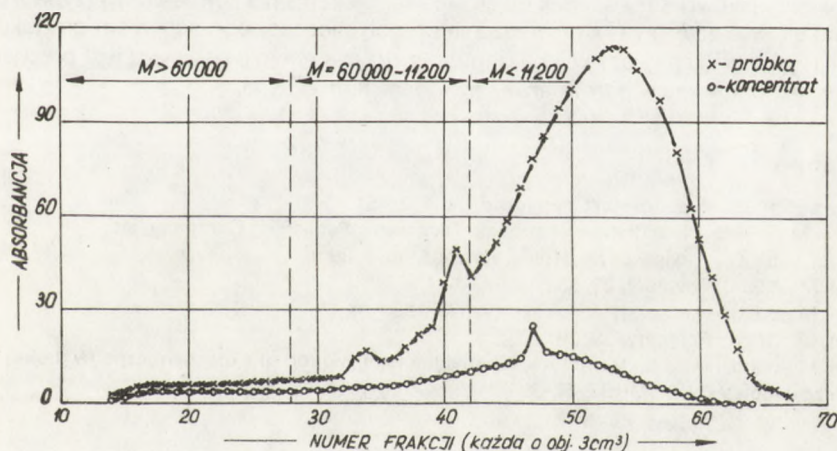
Natomiast w tabeli 9 przedstawiono warunki oraz wyniki ultrafiltracyjnego zatężania. Widać wyraźnie, że wraz z wzrostem odzysku filtratu maleje strumień permeatu, przy czym w początkowym etapie spadek ten jest nieznaczny. W przypadku 50% odzysku filtratu średni strumień permeatu wynosi $1,31 \times 10^{-5}$ m/s. Spadek objętościowego strumienia permeatu przy wydajności filtratu w zakresie 50–90% ilustruje poniższe zestawienie odzysku filtratu:

- 50–60% spadek $J = 3,5\%$;
- 60–70% spadek $J = 6,1\%$;
- 70–80% spadek $J = 10,5\%$;
- 80–90% spadek $J = 21,1\%$.

Tak gwałtowny spadek strumienia permeatu w ostatnim etapie zatężania wynika z dużego wzrostu stężenia retentatu. O ile jego sucha masa w przypadku odzysku permeatu w zakresie od 50% do 70% różniła się nieznacznie i wynosiła odpowiednio od 44,8% do 55,0%, to już przy 80% odzysku filtratu kształtowała się na poziomie $62,2 \text{ kg/m}^3$, a dla 90% wzrosła do $90,6 \text{ kg/m}^3$.

Sucha masa filtratów dla poszczególnych etapów zatężania zmieniała się nieznacznie i w zakresie od 50% do 90% stopnia odzysku filtratu wzrosła o 6,9%, przy czym o 4,3% w ostatnim etapie zatężania (80–90%). Okazało się, że pomimo dziesięciokrotnej objętościowej redukcji nadawy roztworu pektynolitycznego sucha masa retentatu jest tylko dwukrotnie wyższa w porównaniu z suchą masą próbki wyjściowej. Widać zatem, że znaczna część małowczątkowych związków rozpuszczalnych przeszła do filtratu (78,4%), w tym aż około 87% związków mineralnych. Otrzymany retentat ultrafiltracyjny charakteryzuje się wysoką aktywnością pektynolityczną. Aktywność początkowa roztworu wynosząca 3366°PM wzrosła w retencji do 30971°PM , a więc 9,2-krotnie, a jej straty były stosunkowo małe i wynosiły 8%.

W celu dokładniejszego zobrazowania przebiegu procesu oddzielania z roztworu pektynolitycznego białek o masach cząsteczkowych niższych w porównaniu z masami cząsteczkowymi aktywnych białek pektynolitycznych przeprowadziliśmy sączenie molekularne próbki preparatu wyjściowego i retentatu (rys. 5) na kolumnie (55 x 1,5 cm) wypełnionej Sephadexem G-100, zrównoważonej buforem fosforanowym.



Rys.5. Sączenie molekularne wyjściowego surowego preparatu enzymatycznego Pektopol-P i retentatu otrzymywanego w wyniku ultrafiltracji (90% odzysk filtratu).

*Oznaczono refraktometrycznie: zawartość związków mineralnych w koncentracie: $12,49 \text{ kg/m}^3$; zawartość związków mineralnych w filtracie: $9,69 \text{ kg/m}^3$; stężenie filtratu: $36,56 \text{ kg/m}^3$; aktywność filtratu: 21°PM ; ChZT filtratu: $45720 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$.

Dla odbieranych frakcji eluatu wyznaczano absorbancję przy 280 nm. Na podstawie porównania profilów elucji próbki wyjściowej i retentatu stwierdzono, że retentat zawiera zdecydowanie mniej białek i niższych mas cząsteczkowych w porównaniu z próbką wyjściową.

5. Wpływ procesu zagęszczania próżniowego na zmianę aktywności retentatu ultrafiltracyjnego

Wspomniano już, że na skalę przemysłową retentat pektynolityczny Pektopol – P otrzymywany jest na drodze termicznego kilkunastokrotnego zateżenia ekstraktu z grzybni *Aspergillus niger* (zawartość ekstraktu ogólnego w preparacie oznaczona refraktometrycznie nie mniejsza niż 35% po jego obróbce w filtrach próżniowych). Aby ocenić możliwość zwiększenia aktywności otrzymanego w procesie ultrafiltracji retentatu enzymatycznego przeprowadzono laboratoryjne próby jego zateżenia pod zmniejszonym ciśnieniem w wyparce. Retentat ultrafiltracyjny charakteryzował się następującymi parametrami: aktywność pektynolityczna – 30971^oPM, sucha masa – 90,6 kg/m³. Odparowywano go w stałych warunkach (próżnia 36 mm Hg, temp. 313° K) aż do osiągnięcia roztworu, w którym zawartość suchej pozostałości wynosiła 50%. Otrzymany retentat wykazywał aktywność pektynolityczną równą 148950^oPM, a zatem 3,2 razy wyższą w porównaniu z preparatem handlowym.

6. Podsumowanie

W oparciu o przeprowadzone badania laboratoryjne stwierdzono, że istnieje możliwość ultrafiltracyjnego oddzielenia z surowego preparatu enzymatycznego rozpuszczonych związków niskocząsteczkowych, dzięki czemu następuje jego znaczne oczyszczenie. Do tego celu wskazane jest użycie membran z włókna poliakrylonitrylowego o przepuszczalności $1,87 \times 10^{-10}$ m/s x Pa. Za optymalny stopień zateżenia roztworu pektynolitycznego (41,86 kg/m³, 3366^oPM) można przyjąć dwukrotne zmniejszenie jego początkowej objętości (50% odzysk filtratu), z uwagi na stosunkowo duży spadek objętościowego strumienia permeatu w przypadku dalszego wzrostu stopnia zateżenia. Wprowadzenie do dotychczasowego schematu produkcji Pektopolu–P procesu ultrafiltracji pozwoli na obniżenie zużycia energii, ponieważ jest on zdecydowanie bardziej ekonomiczny w porównaniu z metodami termicznymi.

Literatura

1. Drózd M., (1985), Wiadomości Chemiczne, 34, 1–2, 451.
2. Cheryan M., (1986), Ultrafiltration Handbook, Technomic Publishing Company, Inc.
3. Galas E., Kubik C., Turkiewicz M., (1989), Kosmos, 38, 1, 39.
4. Bodzek M., (1984), Polimery, 29, 63.
5. Bodzek M., Bohdziewicz J., (1989), Polimery, 33, 185.
6. Bodzek M., (1980), Polimery, 30, 391.
7. Bodzek M., Bohdziewicz J., Membrany w biotechnologii, Monografie biochemiczne (w druku).
8. Norma zakładowa ZN-83/MRGZ-57-39.

Ultrafiltration purification and concentration of pectinolytic enzymes

Summary

The aim of these investigations was to test the applicability of ultrafiltration to purifying and concentrating of the pectinolytic enzymatic products, known as Pektopol – P. The purpose of the investigation carried out in the first phase was to select the most adequate ultrafiltration membranes made from

polyacrylonitrile and poly (vinyl chloride). The next step was the determination of the optimal operational parameters of the ultrafiltration process: transmembrane pressure, linear velocity of flow of the solution over the membrane surface, as well as the determination of the flux rate in the function of the volume reduction factor.

Adres dla korespondencji:

Jolanta Bohdziewicz, Instytut Inżynierii i Technologii Wody, Ścieków i Odpadów, Politechnika Śląska, ul. Kuczewskiego 2, 44-101 Gliwice.

NOWOŚCI!

Prawo własności intelektualnej

Według opinii części ekspertów wartość światowego rynku nowych produktów biotechnologicznych (w tym wypadku głównie związanych z technikami inżynierii genetycznej) wyniesie w roku 2000 ok. 40 mld USD. Podstawową jej część stanowią będą osiągnięcia wynikające z innowacji technologicznej i postępu technicznego. Z całą pewnością możemy w tym wypadku mówić o wartościach uzyskanych dzięki rozwojowi intelektualnemu. Dotychczas teorie i koncepcje naukowe przyrodników, czyli specyficzna „produkcja intelektualna” nie była bezpośrednio przeliczana na wymierne środki materialne. W ograniczonym stosunkowo stopniu istniał problem ochrony **praw własności** koncepcji. Był on znany i analizowany przez prawników, np. w odniesieniu do praw autorskich twórców: grafików, pisarzy czy też artystów, a także do własności znaków czy nazw firmowych. Natomiast w przypadku biotechnologii spotykamy się z nowym jakościowo zjawiskiem, dotychczas nie analizowanym ani przez prawników, ani przez businessmanów. Zagadnieniem podstawowym jest kwestia zapewnienia praw nie tylko autorskich (te można pozyskać poprzez publikację naukową), ale także zabezpieczenia potencjalnych korzyści finansowych, będących ewentualną konsekwencją dokonanych innowacji technicznych czy też odkryć naukowych.

W Stanach Zjednoczonych działa obecnie ok. 1000 firm biotechnologicznych. Większość z nich to małe lub wręcz bardzo małe przedsiębiorstwa będące spółkami zatrudniającymi kilkunastu pracowników i dysponujące kapitałem kilku milionów dolarów. Podstawowym „kapitałem” tych przedsiębiorstw jest dobra koncepcja i znajomość technik oraz metod badawczych, natomiast ich największym kłopotem jest problem – w jaki sposób zarobić (bardzo wielkie pieniądze) konkurując z potentatami na rynku biotechnologicznym. Jednakże podstawowym miejscem walki nie są laboratoria, a ciche sale sądowe, gdyż właśnie problemy prawne stanowią najczęściej istotę i największą przeszkodę w realizacji zamierzonych celów. Przykładowo, w minionym roku firma kalifornijska Hybritech straciła 2 mln USD opłat sądowych w trakcie przegranego procesu (z inną firmą biotechnologiczną z Kalifornii – Monoclonal Antibodies) dotyczącego patentu tzw. „testu kanapkowego” (ang. *sandwich assay*) stosowanego w pracach z przeciwciałami monoklonalnymi. W opinii prawników sytuację prawa patentowego będzie można w pełni uregulować po nabyciu odpowiedniego doświadczenia, co wymaga opracowania stosunkowo dużej liczby wniosków patentowych. Aktualnie, amerykański urząd patentowy zarejestrował ok. 7000 wniosków z zakresu biotechnologii. Zrozumiałe, że długotrwała procedura patentowa wymaga odpowiednio wykwalifikowanych kadr, których jest obecnie zbyt mało. Długi okres oczekiwania, zniecierpliwienia i brak zaufania do systemu prawnego prowadzą do rezygnacji z patentowania pewnych odkryć i technologii na rzecz stosowania „sekrety firmy”.

T.T.