



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

263298

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 P 33/00

(22) Přihlášeno 16 09 87

(21) PV 6696-87.Y

(40) Zveřejněno 15 07 88

(45) Vydáno 14 07 89

(75)
Autor vynálezu

MACHEK FRANTIŠEK ing. CSc., BĚHALOVÁ BOŽENA ing. CSc.,
ŠILLINGER VLADIMÍR ing., KRUMPHANZL VLADIMÍR ing. DrSc. člen korespondent
ČSAV, PRAHA, TOMIS BOŘIVOJ ing., VAVŘÍČKOVÁ NADĚŽDA ing., FRÍDEK-MÍSTEK

(54) Způsob výroby kvasničného extraktu a ergosterolu

Jedná se o způsob zpracování mikroorganismů, zejména kvasinkovitých, za účelem získání ergosterolu a kvasničného extraktu. Výhodou způsobu je dosažení většího výtěžku ergosterolu (přes 85 %) bez nutnosti zmydelnění lipidické frakce při současné výrobě kvasničného extraktu. Buňky mikroorganismů o neutrálním nebo kyselém pH se prudce zahřejí z teploty 0 až 25 °C na teplotu 55 až 85 °C, načež se po 5 až 20 s rychle zchladí na teplotu 0 až 25 °C. Zchlazení musí proběhnout během jedné sekundy, načež po vyhřátí na 45 až 58 °C proběhne autolýza. Po odseparování tuhých částic, ze kterých po desintegraci se extrahuje ergosterol, se získá kvasničný extrakt. Výhodou postupu je, že dochází k podstatně menším ztrátám ergosterolu v průběhu zpracování, než u dosud používaných postupů, a využívá se i ostatních složek buňky, takže nedochází k znehodnocení zvláště dusíkatých látek mikrobiální buňky. Postup je poměrně jednoduchý, tedy snadno realizovatelný. Nevznikají obtížně likvidovatelné odpady.

Vynález se týká způsobu výroby kvasničného extraktu a ergosterolu.

Ekonomika výroby ergosterolu z mikroorganismů je závislá na jeho koncentraci ve výchozím materiálu. Z toho důvodu je vyvíjena snaha po dosažení co největší koncentrace ergosterolu již ve stadiu fermentace. Pokusy o ovlivnění obsahu sterolů kultivačními podmínkami vedly k tomu, že sice celkový obsah sterolů se zvýšil, avšak hlavně zásluhou balasního 24 (28) dehydroerosterolu. Daleko výhodnější se ukázala cesta selekce kmene s konstitutivně vysokým obsahem ergosterolu. Tento kmen obsahuje až 1,6 % ergosterolu. Další zvyšování obsahu ergosterolu biologickou cestou je velmi obtížné.

Způsoby úpravy surovin (např. kvasinek) biochemickou cestou, měly za cíl využít některé další části buňky před extrakcí ergosterolu tak, aby nedocházelo k jejich znehodnocení a současně došlo k nakoncentrování ergosterolu. Je popsán (čs. AO 189 440) způsob získávání buněčných stěn mikroorganismů pro výrobu ergosterolu založený na aktivaci lytických enzymů buňky desintegrací a následnou 10 hodinovou autolýzou. Oddělené buněčné stěny slouží pak jako výchozí materiál pro získávání ergosterolu. Stejně tak AO 223 007 řeší nakoncentrování ergosterolu v malém objemu balastních lipidů v návaznosti na technologický postup podle AO 161 299. V obou případech se jedná o nakoncentrování části ergosterolu do určité frakce při zpracování kvasničných (mikrobiálních) buněk. Nevýhodou popsaných a známých postupů je nakoncentrování pouze části ergosterolu. Jeho ztráty jsou sice vyváženy získáním dalších produktů, ale přesto ztráta 30 % a více % ergosterolu je dosti velká.

Tuto nevýhodu odstraňuje způsob výroby kvasničného extraktu a ergosterolu, jehož podstatou je, že suspenze buněk mikroorganismů, s výhodou kvasinkovitých, o neutrálním nebo kyselém pH se podrobí tepelnému šoku, zahřátím z teploty 0 až 36 °C na teplotu 55 až 85 °C a po 5 až 20 s zchlazením na teplotu 0 až 25 °C během doby kratší než jedna sekunda, načež se suspenze zahřeje na teplotu 45 až 58 °C, podrobí autolýze po dobu 0,5 až 4 h a oddělí se kvasničný extrakt od tuhých částic.

K extrakci ergosterolu z odseparovaných a po případném promytí tuhých částic se použije s výhodou směs nepolárního rozpouštědla, toluenu, petroleteru, hexanu nebo heptanu s přídavkem 5 až 20 % objem. alifatického alkoholu.

Při navrhovaném postupu dojde k hydrolýze nukleových kyselin a bílkovin, přičemž lipidy, zvláště pak steroly zůstanou nezměněny. Oddělením vzniklých nízkomolekulárních látek dojde k úbytku suché hmoty buněk, získání kvasničného extraktu a tím k reaktivnímu nakoncentrování ergosterolu v buňkách. Úbytek hmoty se pohybuje od 20 až 30 % původní hmoty. Nízkomolekulární látky oddělené z buněčné suspenze se po zahuštění a usušení mohou použít jako kvalitní extrakt s vhodnými organoleptickými vlastnostmi. Postup podle vynálezu je velmi vhodný pro kontinuální výrobu a tedy pro automatizaci celého postupu. Navíc, je možnost provést desintegraci buněk po nakoncentrování ergosterolu a jeho extrakci směsí např. petroleter-
-etanol (9:1) bez hydrolýzy (zmýdelnění) lipidických složek biomasy. Tím se celý postup dost zjednoduší.

Dále jsou uvedeny příklady objasňující, nikoliv však omezující podstatu vynálezu.

P ř í k l a d 1

10 % hmot. suspenze kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* ve vodě o pH 4,5 a teplotě 21 °C byla čerpána rychlostí 1 300 ml/h přes měděný výměník, jehož konstrukce zajišťovala ohřátí suspenze na 75 °C za dobu cca 0,6 s a prodlevu při této teplotě 13 s, včetně spojovacího potrubí k chladiči, který za dobu 0,8 s ochladil suspenzi na teplotu 20 °C. Poté suspenze přicházela do průtočné temperované nádoby, kde dosáhla teploty 53 °C. Objem této míchné termostatované nádoby byl 3 000 ml, takže střední doba zdržení byla 2,3 h. Vždy po nahromadění 1 litru suspenze (v zásobní nádobě, po průtoku termostatovanou nádobou byly tuhé částice (opracované buňky) odděleny centrifugací (10 min) při 3 500 g a promyty stejným množstvím

vody. Supernatant byl oddělen a po zahuštění usušen. Sediment (opracované buňky obsahující veškerý ergosterol) byl resuspendován na suspenzi 6 % hmot. suché hmoty, desintegrovan a v poměru 1 díl suspenze, 2 díly etanolu a 18 dílů petroleteru (tv. 30 až 50 °C), po dobu 1 hodiny extrahován za intenzivního třepání. Z organické fáze byl izolován ergosterol. Obsah ergosterolu v jednotlivých frakcích v průběhu postupu podle příkladu 1 je uveden v tab 1.

T a b u l k a 1

Materiál	Množství suché hmoty	Steroly	24/28 dehydro- ergo- sterol	Ergo- sterol g
	g	g	g	
suspenze před extrakcí	130,0	2,10	0,40	1,70
celk. suspenze po extrakci	130,0	2,10	0,40	1,70
vyextrahované buňky (opracováváné)	93,6	2,06	0,37	1,69
"extrakt"-supernatant po oddělení tuhých částic	37,1	0,01	0	0,01
organická fáze po extrakci desintegrovaných opřacováván. buněk		1,85	0,40	1,45

Celkový zisk ergosterolu je více než 85 % původního množství.

P ř í k l a d 2

Stejným postupem jako v příkladu 1 byla zpracována 10 % hmot. suspenze kvasinek *Candida utilis* vyrostlých na sulfitových výluzích. Pro extrakci byl místo petroleteru použit hexan. Obsah sterolů v jednotlivých frakcích je uveden v tabulce 2

T a b u l k a 2

Materiál	Suchá hmotnost	$\Delta 5,7$ - steroly	24/28 dehydro- ergosterol	Ergosterol
	g	g	g	g
pův. suspenze	130,0	0,60	0,13	0,47
suspenze po extrakci	130,0	0,58	0,11	0,47
vyextrahované buňky opřacované	98,5	0,58	0,11	0,47
extrakt (supernatant po oddělení tuhých částic)	31,5	0	0	0
organická fáze (hexan) po extrakci desintegrovaných opřacovaných kvasinek		0,51	0,10	0,41

Celkový zisk ergosterolu je 87 % původního množství.

Ztráty ergosterolu se při způsobu úpravy podle vynálezu pohybují do 20 %, čímž se dosahuje výhodnějších parametrů, než např. podle způsobu dle AO 189 440. Navíc je možno po desintegraci přímo extrahovat homogenát, protože k uvolnění ergosterolu z buněčného extraktu dojde v průběhu tepelného šoku a není třeba provádět zmýdelnění.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby kvasničného extraktu a ergosterolu vyznačený tím, že suspenze buněk mikrorganismů, s výhodou kvasinkovitých, o neutrálním nebo kyselém pH se podrobí tepelnému šoku, zahřátím z teploty 0 až 36 °C na teplotu 55 až 85 °C a po 5 až 20 s zchlazením na teplotu 0 až 25 °C během doby kratší než jedna sekunda, načež se suspenze zahřeje na teplotu 45 až 58 °C, podrobí autolýze po dobu 0,5 až 4 h a oddělí se kvasničný extrakt od tuhých částic, které se extrahují.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že k extrakci ergosterolu z odseparovaných a po případném promytí dezintegrováných tuhých částic se použije s výhodou směs nepolárního rozpouštědla, toluenu, petroleteru, hexanu nebo heptanu s přísávkem 5 až 20 % objem. alifatického alkoholu.