



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

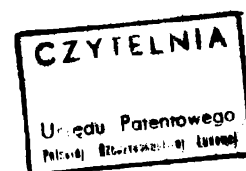
Zgłoszono: 85 06 05 (P. 253851)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 86 12 30

Opis patentowy opublikowano: 89 09 30

Int. Cl.⁴ C07G 17/00



Twórcy wynalazku: Halina Pizło, Adam Pizło

Uprawniony z patentu: Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie,
Kraków (Polska)

Sposób izolacji melanin z czarnych drożdży

Przedmiotem wynalazku jest sposób izolacji melanin z czarnych drożdży. Czarne drożdże są to drobnoustroje należące do grzybów z rodziny Dematiaceae, najczęściej rodzaju *Aureobasidium* według Wydawnictwa Naukowo-Technicznego, Warszawa 1983 r., pt. "Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej", Olga Fassatiowa, str. 197.

Melaniny mogą znaleźć zastosowanie w ochronie organizmów żywych przed promieniowaniem biologicznie szkodliwym, w hamowaniu rozwoju nowotworów, w charakterze wymiennicy jonowych, a także półprzewodników bezpostaciowych i w procesach redoksowych.

Związki melaninowe należą do pigmentów o wysokim ciężarze cząsteczkowym i dotąd nie ustalonej budowie, a brak rozpuszczalności w wodzie i popularnych rozpuszczalnikach jest przyczyną tego, że ogólna, standardowa metoda izolacji melanin z materiału roślinnego, którym są np. drożdże, nie została opracowana. Jak dotąd źródłem melaniny były surowce zwierzęce: skóra i sierść.

Znany z polskiego opisu patentowego nr 114875 sposób wytwarzania surowych melanin ze spirytusu porektyfikacyjnego polega jedynie na uzyskaniu biomasy czarnych drożdży bogatych w melaniny. W książce S.P. Ljach i E.Ł. Ruban "Mikrobnije melaniny", Moskwa 1972 na str. 158-181 wymienia się niektóre rozpuszczalniki melanin np. 0,5 n NaOH, 1 n Na₂CO₃, gorący 1n HCl, 0,86% NaCl. Jednocześnie autorzy zwracają uwagę, że każdy rodzaj surowca wymaga indywidualnego podejścia i specyficznych metod izolacji. Ogólnie, izolacja melanin z materiału biologicznego może przebiegać dwoma drogami: ekstrakcji pigmentu lub usuwania substancji, które stanowią jego "zanieczyszczenie". W czasopiśmie *Lékařské listy*, 9,2, 1954, A.F. Richter i J. Duchoň na str. 34 podają sposób izolacji melanin z materiału zwierzęcego, który polega na stosowaniu hydrolizy 20% HCL przez 60 godzin i ekstrakcji za pomocą chlorohydryny etylenu C₂H₅OCl. W Kalendarzu Przemysłu Spożywczego Tom II WPLiS, W-wa 1954 r. Dionizy Krzyżaniak na str. 255 opisuje sposób plazmolizy i autolizy drożdży w produkcji ekstraktu drożdżowego.

Plazmoliza polega na mieszaniu drożdży prasowanych piekarnianych z solą kuchenną w ilości 2,5% w stosunku do drożdży w ciągu 4 godzin i przy pH 5,3-5,4. Autoliza plazmolizatu polega natomiast na kolejnym przetrzymywaniu go w temperaturach 20°C, 50°C, 55°C i 80°C. Ponieważ

związki melaninowe znajdują się głównie w ścianach komórkowych czarnych drożdży, zatem pierwszym etapem wydzielenia melanin może być oddzielenie ścian komórkowych od treści komórek. Znany proces plazmolizy drożdży w ogóle pozwala na oddzielenie treści komórek od ścian komórkowych i można było przewidywać jego skuteczność w odniesieniu do czarnych drożdży.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu produkcji czystych melanin z materiału roślinnego, jakim są czarne drożdże, gdyż melaniny mają szereg cennych właściwości praktycznych wymienionych na wstępie.

Istota wynalazku polega na tym, że uzyskany w wyniku plazmolizy osad ścian komórkowych czarnych drożdży z resztkami treści komórek ługuje się 1n NaOH przez okres nie dłuższy niż 30 minut w temperaturze około 60°C i odwirowuje osad odrzucając ciecz nad osadem. Dalej osad poddaje się hydrolizie na gorąco HCl o stężeniu nie wyższym niż 2n przez okres nie dłuższy niż 1 godzinę utrzymując mieszaninę w stanie wrzenia. Po ochłodzeniu hydrolizat wiruje się i z osadu ługuje 1n NaOH melaniny dwukrotnie: w temperaturze pokojowej i na gorąco. Po odwirowaniu i odrzuceniu osadu dwa alkaliczne ekstrakty łączy się i za pomocą 2n HCl strąca się melaniny przy $\text{pH} = 3,0$. Po kilku godzinach osad melanin odwirowuje się i po przemyciu wodą destylowaną suszy w temperaturze nie wyższej niż 100°C, uzyskując czyste melaniny drożdżowe.

Reasumując istota wynalazku polega na połączeniu operacji oddzielania zanieczyszczeń przez plazmolizę i ekstrakcję NaOH z ekstrakcją melanin roztworem NaOH i wytrąceniem za pomocą HCl.

Sposób według wynalazku polega na tym, że biomasę czarnych drożdży o konsystencji handlowych drożdży piekarskich poddaje się w znany sposób plazmolizie z użyciem NaCl w celu oddzielenia części "zanieczyszczeń", głównie treści komórek. Następnie przemycia się niewielką ilość wody destylowanej i po ogrzaniu oraz wymieszaniu odwirowuje się osad. Z osadu ługuje się roztworem 1n NaOH dalsze "zanieczyszczenia" w temperaturze około 60°C przez okres nie dłuższy niż 30 minut. Odwirowany osad poddaje się hydrolizie na gorąco, w stanie wrzenia przez okres nie dłuższy niż 1 godzinę 2n HCl. Po ochłodzeniu i odwirowaniu osadu oraz przemyciu wodą destylowaną z osadu ługuje się melaniny 1n NaOH najpierw w temperaturze pokojowej, potem na gorąco w temperaturze około 70°C, łącząc ekstrakty i odwirowując osad. Z klarownych połączonych ekstraktów strąca się melaniny za pomocą 2n HCl dozowanego do $\text{pH} = 3,0$, a po kilku godzinach odwirowuje się melaniny, przemycia wodą destylowaną i suszy w temperaturze nie wyższej niż 100°C uzyskując czyste melaniny drożdżowe.

Sposób według wynalazku objaśniony jest bliżej na przykładzie nie ograniczającym jego zastosowania.

Przykład. 17,4 g czarnych drożdży o zawartości suchej masy 30% wagowych zmieszano z 0,5 g NaCl i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez okres 4 godzin. Następnie dodano 50 cm³ wody destylowanej i ogrzano do wrzenia. Po ochłodzeniu i odwirowaniu osadu ciecz zdekantowano, a osad wymieszano z 30 cm³ wody destylowanej i ponownie odwirowano, po czym ciecz zdekantowano. Osad zadano 50 cm³ 1n NaOH i mieszano w temperaturze 60°C przez 30 minut. Po odwirowaniu osadu ciecz zdekantowano, a osad zalano 50 cm³ 2n HCl i hydrolizowano w stanie wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę. Po ochłodzeniu hydrolizat odwirowano, ciecz odlano, a osad ługowano 1n NaOH dwukrotnie kolejno: 50 cm³ w temperaturze pokojowej i 50 cm³ w temperaturze 70°C. Po każdym ługowaniu osad odwirowywano. Klarowne ekstrakty połączono i wytrącono melaniny 2n HCl dozowanym w czasie mieszania do $\text{pH} = 3,0$. W celu dokładnego strącenia mieszaninę pozostawiono na okres 6 godzin, po czym odwirowano osad, przemyto 30 cm³ wody destylowanej, odwirowano i wysuszono w temperaturze 80°C uzyskując preparat czystych melanin w ilości 0,62 g, co stanowi 11,9% suchej masy użytych drożdży. Przeprowadzono próbę czystości preparatu, który mógł być zanieczyszczony melanoidami rozpuszczalnymi w tetrahydrofuranie. W tym celu rozpuszczono preparat w tetrahydrofuranie - próba wypadła negatywnie, co świadczy o czystości preparatu.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób izolacji melanin z czarnych drożdży o konsystencji handlowych drożdży piekarskich, **znamienny tym**, że biomasę czarnych drożdży poddaje się plazmolizie, przemycia gorącą wodą

destylowaną i odwirowuje osad ścian komórkowych z resztkami treści komórek czarnych drożdży, który to osad łączy się 1n roztworem NaOH w temperaturze około 60°C przez okres nie dłuższy niż 30 minut, odwirowuje i otrzymany osad ścian komórkowych czarnych drożdży poddaje się hydrolizie na gorąco kwasem solnym o stężeniu nie wyższym niż 2 n przez okres nie dłuższy niż 1 h, po czym po ochłodzeniu, hydrolizat wiruje się i z osadu zanieczyszczonych melanin łączy melaniny porcjami 1n NaOH dwukrotnie: w temperaturze pokojowej i na gorąco, a po odwirowaniu i odrzuceniu osadu z połączonych alkalicznych ekstraktów strąca się melaniny za pomocą 2n HCl dozowanego do pH = 3,0, a dalej po kilku godzinach strącania się melanin, osad melamin odwirowuje się i po przemyciu wodą destylowaną suszy w temperaturze nie wyższej niż 100°C.