



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

223007
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 33/00

(22) Přihlášeno 08 08 80
(21) (PV 5473-80)

(40) Zveřejněno 26 02 82

(45) Vydáno 15 03 86

(75)

Autor vynálezu

MACHEK FRANTIŠEK ing. CSc., BĚHALOVÁ BOŽENA ing., FENCL
ZDENĚK dr. DrSc., BERAN KAREL dr. ing. CSc., ŠILLINGER VLADIMÍR
ing., PRAHA

(54) Způsob úpravy odpadních surovin pro izolaci ergosterolu

1

2

Předmětem vynálezu je způsob úpravy odpadních surovin pro izolaci ergosterolu, který je důležitým prekursorem vitamínu D₂, používaném v lékařství.

Způsob získávání ergosterolu podle vynálezu navazuje na technologický postup podle AO č. 161 299, který předpokládá rozdělení jednotlivých frakcí buněk, tj. proteinu, lipidické složky a zkrmitelných zbytků (směs buněčných stěn a supernatantu po srážení proteinu).

Uvedená frakce zbytků se upraví na hodnotu 7 — 12 pH, odvodní se odpařením vody nebo s výhodou ethanolem, aby obsah vody byl nižší než 10 %, načež se buněčná frakce, tj. izolovaná kvasničná bílkovina, nebo stěny kvasinek rozmíchají s ethanolem, při teplotě od 40 °C do 100 °C za tlaku od 0,1 do 0,3 MPa, na dobu 1 — 20 hodin, čímž se provede extrakce, načež se z lipidické frakce známým způsobem izoluje ergosterol.

Způsob podle vynálezu vytváří podmínky pro nakoncentrování ergosterolu pouze v malém objemu ethanolem extrahovatelných látek (asi 80 % veškerého ergosterolu se nakoncentruje v malém množství balastních lipidů). To umožňuje snadnější následující izolaci a čištění ergosterolu.

Ergosterol je důležitým prekursorem vitamínu D₂ a jeho cena neustále roste. Dosaďadní způsoby izolace ergosterolu jsou založeny na hydrolýze buněk kvasinek *S. cerevisiae* a extrakci organickými rozpouštědly [US pat. č. 2 874 171; aj]. Podle US patentu č. 2 874 171 se hydrolýza provádí alkálemu v přítomnosti alkoholů omezeně mísitelných vodou. Vychází se z celých buněk (mikroorganismů), přičemž se využije pouze ergosterol. Podle jiného postupu (US patent 2 865 934) se provádí extrakce usušených alkalický opracovaných kvasinek rozpouštědly mísitelnými s vodou. Opět se nevyužívá bílkovinná, ani glycidická složka buňky. US patent 2 794 035 je založen na zpracování methanolického extraktu. Suspenze kvasinek v methanolu se za varu extrahuje 1,5 hodiny. Po filtraci (oddělení buněk) se zmýdelňuje a izoluje se cerebrin a ergosterol. V US patentu č. 2 865 934 se jako surovina uvažuje i možnost využití autolyzovaných buněk. Využití buněčných stěn mikroorganismů pro výrobu ergosterolu je rovněž předmětem autorského osvědčení č. 189 440 (PV. 4611-77).

Nevýhoda všech známých způsobů spočívá v časové náročnosti procesu a ve využívání pouze jedné nebo dvou složek buněk. Nejrychlejší způsob využívající desintegrace mikroorganismů pro urychlení autolýzy kalkuluje s 8 — 12 hod. — autorské osvědčení č. 189 440 (PV. 4611-77). U ostatních způsobů se buď získá samotný ergosterol a ostatní složky buňky, jako jsou bílkoviny a glycidy tvoří odpad, nebo se využívá ještě některá další složka. Postup je časově náročný a zbývající odpad se musí nákladně likvidovat.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob úpravy odpadních surovin pro izolaci ergosterolu, jehož podstatou je, že se pH buněčných frakcí upraví na hodnotu 7 — 12, odvodní se odpařením vody, nebo s výhodou ethanolém, aby obsah vody byl nižší než 10 procent, načež se buněčné frakce, tj. izolovaná kvasničná bílkovina nebo stěny kvasinek rozmíchají s ethanolém, při teplotě od 40 °C do 100 °C za tlaku od 0,1 do 0,3 MPa, na dobu 1 — 20 minut, čímž se provede extrakce, načež se z lipidické frakce známým způsobem izoluje ergosterol. Místo ethanolu jako rozpouštědlo lze použít i jiná rozpouštědla mísitelná s vodou jako například další alkoholy, jako methanol, isopropanol, dále ketony jako aceton apod. Jako odpadní surovina pro způsob úpravy dle vynálezu lze s výhodou použít frakce z kombinované výroby potravinářských a krmných bílkovin.

Způsob podle vynálezu navazuje rovněž na technologický postup podle autorského osvědčení č. 161 299. Předpokládá rozdělení jednotlivých frakcí buněk, tj. proteinů, lipidické složky a zkrmitelných zbytků (směs buněčných stěn a supernatantu po srážení proteinu). Na rozdíl od autorského osvědčení č. 161 299 však způsob podle vynálezu

vytváří podmínky pro nakoncentrování ergosterolu pouze v malém objemu ethanolém extrahovatelných látek (EEL-lipidická frakce). Navíc předpokládá extrakci zkrmitelného podílu. Podle AO 161 299 se provádí extrakce isopropanolem (poslední při zvýšené teplotě) a teprve potom alkalickým ethanolém. Postup podle vynálezu předpokládá úpravu pH materiálu před extrakcí, která se může provádět kombinací rozpouštědel či pouze jedním rozpouštědlem a hned první extrakce se provádí při zvýšené teplotě, případně tlaku. pH se musí pohybovat v neutrální až alkalické oblasti. Zmíněný postup má za následek, že asi 80 % extrahovatelného ergosterolu se nakoncentruje v poměrně malém množství balastních lipidů (viz příklady). Následující izolace a čištění ergosterolu je potom snadnější, než při zpracování tukové frakce s malým obsahem ergosterolu. Dále jsou uvedeny příklady provedení způsobu podle vynálezu.

Příklad 1

Způsob získání odpadní frakce ze zkrmitelného podílu připraveného podle AO č. 161 299, který obsahuje buněčné stěny a supernatant po srážení proteinu, a který je usušen na sprayové sušce. Zkrmitelný podíl z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* dle uvedeného AO měl obsah vody nižší než 6 %. Směs před sušením obsahovala 1,16 % ergosterolu (stanoveno analyticky), tj. v 1000 g hmoty 11,6 g ergosterolu. Ze vzorku zkrmitelného podílu bylo zjištěno, že ethanolém lze z 1000 g hmoty vyextrahovat 76 g ethanolém extrahovatelných látek (EEL), z čehož je 4,76 g ergosterolu (6,26 % v celkovém extraktu). Množství nevyextrahovatelného ergosterolu (6,84 g) je buď destruováno při sušení, nebo vázáno na nelipidické složky buňky.

1000 g suché hmoty se smíchá s 2500 g bezvodého ethanolu. Pokud nebylo pH zkrmitelného podílu upraveného před sušením na hodnotu pH 7 — 8, přidá se 25 ml ethanolátu sodného. Dobře rozmíchaná suspenze se zahřeje na teplotu 50 °C a po 10 minutách zfiltruje (pod tlakem). Získá se 1400 gramů ethanolového extraktu, který obsahuje 39,8 g EEL, v nichž je obsaženo 2,9 g ergosterolu. K filtračnímu koláči se přidá 1000 g ethanolu a pokud nebylo pH směsi před sušením upraveno přidá se 10 ml ethanolátu sodného. Suspenze se za míchání vyhřeje na 50 °C a udržuje se na této teplotě cca 10 min. Poté se pod tlakem zfiltruje. Po druhé extrakci bylo 1080 g ethanolového extraktu obsaženo 15,3 g ethanolém extrahovatelných látek a z toho 1,2 g ergosterolu. Extrakce se stejným způsobem opakuje ještě jednou s 1000 g ethanolu. V ethanolovém extraktu po třetí extrakci je obsaženo 7,8 g EEL a 0,4 g ergosterolu.

Přehled rozdělení EEL a ergosterolu v

jednotlivých frakcích je uveden v tabulce 1. Extrakty z 1. a 2. stupně se spojí a po oddestilování ethanolu se získá 55,1 g EEL o obsahu 4,1 g ergosterolu (7,44 % v EEL). Extrakce byla prováděna v šesti stupních, přičemž většina ergosterolu byla soustředěna v extraktech z prvních dvou stupňů. Z těchto dvou prvních extraktů se potom známým způsobem (extrakce po zmýdlení) izoluje ergosterol.

Příklad 2

Způsob získání odpadní frakce z vodní suspenze potravinářského proteinu, izolovaného z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. 5 kg suspenze potravinářského proteinu získaného podle AO č. 161 299 o sušině 17 %, tj. 850 g suchého podílu se po upravení pH na hodnotu 7,3 rozmíchá s 5 kg bezvodého ethanolu a po 5 minutách míchání se tuhý podíl z této suspenze odseparuje. 3850 g vlhké hmoty (39 % vody) se opět rozmíchá s 5 kg bezvodého ethanolu a po 5 minutách se odseparuje tuhá fáze. Ta obsahuje kromě ethanolu 10,8 % vody. Třetí extrakce probíhá při teplotě 60 °C. Extrahuje se 3 kg bezvodého ethanolu. Po 20 minutách míchání se za tlaku odfiltruje extrakt. Vzniklý filtrační koláč obsahuje 5,1 % vody a asi 52 % ethanolu. Získaný extrakt obsahuje 35,8 g EEL s 2,9 g ergosterolu. Extrakce se za zvýšené teploty opakuje ještě 2 — 3×. Extrakty se spojí a oddestiluje se ethanol.

Tabulka 1

Látková bilance extrakce zkrmitelného podílu usušeného teplem.
(viz příklad 1)

materiál	g	EEL % sušiny	EEL % celk.	g	ergosterol % sušiny	% EEL	% vyextra- hovaného ergostero- lu z celko- vého množ- ství (ex- trahova- telného)
výchozí materiál	76	7,6	100	11,6	100		
po usušení	76	7,6	100	4,76	41		100
1. extrakt	39,8		52,4	2,9		7,3	60,7
2. extrakt	15,3		20,1	1,2		7,8	25,2
1. + 2. extrakt	55,1		72,5	4,1		7,4	86,1
3. extrakt	7,8		10,3	0,4		5,0	8,4
4. extrakt	5,3		6,9	0,18		3,4	3,8
5. extrakt	4,6		6,0	0,15		3,3	3,1
6. extrakt	3,0		3,9	0,11		3,6	2,3

Odparek se použije k izolaci ergosterolu. Celkem se z původních 10,2 g ergosterolu vyextrahuje v použitelné koncentraci 5,3 g. Zbytek zůstává vázán v buněčné frakci, případně je obsažen v dalších extrakčních podílech. Přehled látkové bilance k příkladu 2 udává tabulka 2. Ethanol z 1., případně 2. extrakce se může použít jako složka živného média nebo zrektifikovat a odvodnit. Ethanol z 3. až 5. (případně 6.) extrakce podle příkladu 2 a ethanol z 1. až 6. extrakce podle příkladu 1 se oddestiluje, zrektifikuje a použije znovu k extrakci.

Způsob odvodnění podle příkladu 2 (1. a 2., případně 3. extrakce) je energeticky výhodnější než přímé odpaření vody dle příkladu 1. Na získání 1 kg proteinu z 10% suspenze dle příkladu 1. (koncentrovanější suspenze proteinu nejde vzhledem k tvorbě gelu na sprejové sušce sušit) musíme ohřát a odpařit 9 kg vody. K tomu je zapotřebí $9 \times 80 \times 4,19 + 9 \times 2252 = 23\,283$ kJ.

Na oddestilování s rektifikací cca 13 kg ethanolu (1., 2. a 3. extrakce podle příkladu 2) je zapotřebí $13 \times 80 \times 2,8 + 13 \times 904 = 14\,664$ kJ.

Také výtěžnost ergosterolu je dle příkladu 2 vyšší (52 % proti 41 % při extrakci frakce sušené teplem) a také kvalita bílkovinné frakce je zde lepší (stupeň denaturace bílkoviny je nižší a z toho vyplývá lepší rozpustnost ve vodě, lepší emulgační kapacita apod.).

Tabulka 2

Látková bilance extrakce vodní suspenze potravinářského proteinu.

(viz příklad 2)

materiál	hmotnost etha- nolu na extrak- ci g	hmotnost sus- penze po část. odděl. ethanolu g	% vody po část. tečném odděl. ethanolu	hmotnost suší- ny g	hmotnost EEL g	% vyextrahovaného ergosterolu původní v extraktu	hmot. ergoste- rolu g
původní suspenze		5000	83	850	97	1,2	10,2
1. extrakce (20 °C)	5000	3850	39		nestanoveno	0	0
2. extrakce (20 °C)	5000	1920	10,8		nestanoveno	0,1	cca 0
3. extrakce (60 °C)	3000	1750	5,1		35,8	8,1	2,9
4. extrakce (60 °C)	3000	1630	5,2		28,8	6,25	1,8
5. extrakce (60 °C)	3000	1590	5,1	753	18,7	3,2	0,6
6. extrakce (60 °C)	3000	1530	4,9		nestanoveno	1,8	—

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob úpravy odpadních surovin pro izolaci ergosterolu, vyznačený tím, že se pH buněčných frakcí upraví na hodnotu 7 až 12, odvodní se odpařením vody, nebo s výhodou ethanolem, aby obsah vody byl nižší, než 10 %, načež se buněčné frakce, tj.

izolovaná kvasničná bílkovina nebo stěny kvasinek rozmíchají s ethanolem, při teplotě od 40 °C do 100 °C za tlaku od 0,1 do 0,3 MPa, na dobu 1 až 20 minut, čímž se provede extrakce, načež se z lipidické frakce známým způsobem izoluje ergosterol.