



Patent dodatkowy
do patentu _____

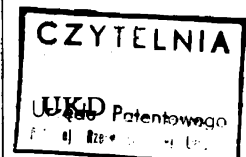
Zgłoszono: 30.X.1968 (P 129 809)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 31.III.1971

Kl. 6 b, 16/03

MKP C 12 d, 5/00



Współtwórcy wynalazku: Zdzisław Pazoła, Henryk Switek, Józef Janicki

Właściciel patentu: Centralne Laboratorium Przemysłu Koncentratów
Spożywczych, Poznań (Polska)

Sposób otrzymywania karotenu na drodze mikrobiologicznej

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania karotenu na drodze mikrobiologicznej za pomocą skojarzonej hodowli seksualnie przeciwnych szczepów pleśni z rodziny Choanephoraceae, na płynnym podłożu odżywczym zawierającym białka, węglowodany, tłuszcze, witaminy, sole mineralne, węglowodory i dodatek stymulatorów, jak na przykład betajononu lub melasy cytrusowej.

W znanych sposobach wytwarzania karotenoidów na drodze biosyntezy za pomocą skojarzonej hodowli pleśni, szczególnie za pomocą szczepów *Blakeslea trispora*, stosuje się często dodatek węglowodorów do płynnego podłoża odżywczego.

Z opisu patentowego St. Zjedn. Am. nr 3.025.221 wynika, że jako dodatku używano naftę odwonioną o ciężarze właściwym 0,775 — 0,789. Według opisu patentowego nr 53.106 dodatek nafty odwonionej wynosił 4 części wagowe w stosunku do podłoża odżywczego.

Dotychczasowe stosowanie nafty powodowało na ogół wzrost wydajności karotenu, jednak zależne to jest od rodzaju danej nafty. W skład nafty wchodzi różnego rodzaju węglowodory, na przykład alifatyczne o prostych i rozgałęzionych łańcuchach o różnej długości, jak i węglowodory aromatyczne. Zawartość poszczególnych grup węglowodorów ulega dużym wahaniom. Składniki nafty, które powodują wzrost wydajności karotenu nie są jednakże znane. W literaturze spotyka się również wzmianki

2

o ujemnym wpływie surowej lub odwonionej nafty. Należy przypuszczać, gdyż nie było to dotychczas zbadane, że w nafcie występują również tego rodzaju składniki, które przeszkadzają w procesie biosyntezy karotenu.

Nafta oczyszczona, a nawet odwoniona przenika przez wszystkie fazy procesu wytwarzania powodując nieprzyjemny i trudny do usunięcia posmak i zapach końcowego produktu, a mianowicie w tłuszczowym ekstrakcie karotenowym.

Wada ta utrudnia zastosowanie otrzymanych preparatów karotenu do wzbogacania i barwienia środków żywnościowych, ograniczając użycie ich jedynie do wzbogacania pasz treściwych.

Ponadto stosowanie nafty i analogicznych produktów nieodpowiednio oczyszczonych stwarza niebezpieczeństwo wprowadzenia do podłoża, a następnie do końcowego produktu śladów 3,4-benzopirenu wykazującego, jak wiadomo, własności rakotwórcze.

Celem wynalazku jest zastosowanie takiego źródła węglowodorów jako dodatku do płynnego podłoża odżywczego, aby otrzymany na drodze biosyntezy końcowy produkt pozbawiony był wad smaku i zapachu i w pełni nadawał się do witalizowania i barwienia środków żywności.

Sposób według wynalazku polega na zastosowaniu jako źródła węglowodorów czystego nasyconego alifatycznego węglowodoru o zawartości 10 — 15 atomów węgla lub mieszaniny czystych nasyco-

nych alifatycznych węglowodorów o zawartości 10 — 15 atomów węgla, posiadającej ciężar właściwy 0,740 — 0,765, korzystnie około 0,760.

Okazało się, że dodatek czystych normalnych parafin, albo mieszaniny czystych parafin wprowadzony do płynnego podłoża w ilości 1 — 5% wagowych, w jednej lub kilku porcjach na początku lub w trakcie fermentacji, w tym drugim przypadku korzystnie po 36 — 48 godzinach od jej rozpoczęcia, wpływa bardzo dodatnio na wydajność karotenu i na właściwości organoleptyczne końcowego produktu.

Liczne doświadczenia wykazały, że wydajność karotenu wzrasta o ponad 20% w porównaniu ze znanymi sposobami stosującymi dodatek nafty surowej lub odwonionej. Otrzymany końcowy tłuszczowy preparat karotenu pozbawiony jest przykrego woni i posmaku nafty i dlatego nadaje się dla celów spożywczych.

Sposób według wynalazku wyjaśniają bliżej podane przykłady stosowania, w których dla porównania użyto dodatku różnych węglowodorów.

Przykład I. Sporządzono płynne podłoże odżywcze o następującym składzie podstawowym wyrażonym w częściach wagowych:

drożdże suszone	3,0
kukurydza mielona	2,5
soja mielona	3,0
chlorowodorek tiaminy	0,0002
olej autoklawowy	4,6
woda	95,0

108,1002

części wagowych

Otrzymaną płynną pożywkę podzielono na cztery równe części osiągając w ten sposób cztery próby od nr 1 — 4.

Do każdej z tych prób wprowadzono dodatek innego rodzaju węglowodoru o wyszczególnionych niżej cechach:

próba nr 1 zawierała 4 części wagowe odwonionej nafty KB o ciężarze właściwym 0,794 — destylacja normalna:

10%	przeddestylowuje do 216°C
50%	przeddestylowuje do 221°C
96%	przeddestylowuje do 244°C

próba nr 2 zawierała 4,15 części wagowych nafty kosmetycznej o ciężarze właściwym 0,830 — destylacja normalna:

początek destylacji	180°C
10%	przeddestylowuje do 200°C
75%	przeddestylowuje do 250°C
koniec destylacji	275°C

Kwasowość w mg KOH/100 ml do 2,5.

Zawartość węglowodorów aromatycznych do 0,5%, próba nr 3 zawierała 3,90 części wagowych odwonionej nafty Deobase o ciężarze właściwym 0,780 — destylacja normalna:

początek wrzenia	197°C
50%	przeddestylowuje do 217°C
zakończenie destylacji	251°C
liczba Hauri-butanolowa	29

próba nr 4 zawierała 3,75 części wagowych mieszaniny czystych normalnych parafin o ciężarze właściwym 0,751, o zakresie destylacji normalnej 197 — 253°C, zawartości związków aromatycznych 0 oraz składzie niżej wyszczególnionym:

undekan	28% wagowych
dodekan	42%
tridekan	28%
tetradekan	2%
razem	100% wagowych

Powyższe próby pożywek zostały wysterylizowane i schłodzone w znany sposób, a następnie wprowadzono do nich płynne inokulum szczepów pleśni *Blakeslea trispora* i przeprowadzono fermentację węgloną w ciągu 5-6 dni w temperaturze 26 — 28°C w warunkach tlenowych.

W ciągu 36 — 48 godzin od rozpoczęcia fermentacji wprowadzono do płynnego podłoża odżywczego dodatkowo znany stymulator w postaci mieszaniny jononów w ilości 0,0935 części wagowych. Po osiągnięciu największego stężenia karotenu w płynnym podłożu, co nastąpiło w szóstym dniu fermentacji, oddzielono wytworzoną masę grzybni od brzezki za pomocą wirówki. Otrzymaną grzybnię poddano badaniom dla oznaczenia suchej masy i zawartości karotenu dla przeprowadzenia bilansu wydajności procesu fermentacji w przeliczeniu na objętość płynnej pożywki w zależności od zastosowanego źródła węglowodorów i wyniki przedstawiono w tablicy 1.

Tablica 1

Próba	Rodzaj źródła węglowodorów	Ilość suchej grzybni w g/100 ml podłoża	Wydajność karotenów w mg/100 ml podłoża
1	Nafta KB	5,6	70,0
2	Nafta kosmetyczna	6,0	77,4
3	Nafta Deobase	6,0	77,4
4	Mieszanina n-parafin	5,7	98,9

Przykład II. Sporządzono płynne podłoże o następującym składzie podstawowym, wyrażonym w częściach wagowych:

preparat białkowy Pharmamedia	5,0
kukurydza mielona	2,5
melasa cytrusowa	5,0
chlorowodorek tiaminy	0,0002
olej sojowy rafinowany	4,6
woda	95,0

Razem 112,1002

Powyższą pożywkę płynną podzielono podobnie jak w przykładzie I na cztery partie, dodając do nich różne źródła węglowodorów tego samego pochodzenia, jednak w ilościach zmniejszonych o 20% w stosunku do poprzedniego przykładu. Nie zastosowano dodatku syntetycznych stymulatorów biosyn-

tezy z uwagi na wprowadzenie melasy cytrusowej w podstawowy skład pożywki. Proces sterylizacji i przebieg fermentacji przeprowadzono w sposób podobny jak to podano w przykładzie I.

Uzyskane w poszczególnych próbach wydajności karotenu przedstawia tablica 2.

Tablica 2

Próba	Rodzaj źródła węglowodorów	Ilość suchej grzybni w g/100 ml podłoża	Wydajność karotenów w mg/100 ml podłoża
1	Nafta KB	5,9	68,7
2	Nafta kosmetyczna	6,0	78,6
3	Nafta Deobase	5,7	75,2
4	Mieszanina n-parafin	5,9	100,9

Przykład III. Sporządzono podłoże płynne o takim samym podstawowym składzie jak w przykładzie I. Otrzymane podłoże podzielono na dziesięć różnych partii, dodając do dziewięciu różne rodzaje czystych indywidualnych n-parafin, natomiast dziesiątą partię pozostawiono jako próbę kontrolną bez dodatku węglowodorów.

Ilość dodanych n-parafin w każdej próbie wyrażona w częściach wagowych przedstawia się następująco:

w próbie nr

1	dekan	2,92
2	undekan	2,964
3	dodekan	3,064
4	tridekan	3,068
5	tetradekan	3,072
6	pentadekan	3,076
7	heksadekan	3,10
8	heptadekan	3,112
9	oktadekan	3,113
10	próba kontrolna bez węglowodorów	

Dalszy tok postępowania, to znaczy proces sterylizacji, szczepienia, fermentacji, dodatku stymulatorów i oddzielenia grzybni, przeprowadzony został w taki sam sposób, jak to podano w przykładzie I.

Uzyskane wydajności suchej grzybni i karotenu w zależności od zastosowanego rodzaju czystych n-parafin obrazuje podana tablica 3.

Tablica 3

Próba	Rodzaj źródła węglowodorów	Ilość suchej grzybni w g/100 ml podłoża	Wydajność karotenów w mg/100 ml podłoża
10	1 dekan	5,5	32,7
	2 undekan	6,0	78,0
	3 dodekan	6,0	97,5
	4 tridekan	6,0	58,2
	5 tetradekan	6,5	50,7
15	6 pentadekan	6,2	43,4
	7 heksadekan	8,1	51,0
	8 heptadekan	7,4	41,1
	9 oktadekan	7,1	38,7
20	10 próba kontrolna bez węglowodorów	5,7	28,9

Reasumując, zastosowanie czystych n-parafin w postaci undekanu, dodekanu i tridekanu, wpływa szczególnie korzystnie na wydajność karotenu.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania karotenu na drodze mikrobiologicznej za pomocą skojarzonej hodowli seksualnie przeciwstawnych szczepów pleśni z rodziny Choanephoraceae, na płynnym podłożu odżywczym zawierającym białka, węglowodory, tłuszcze, witaminy, sole mineralne, stymulatory, a także węglowodory, **znamienny tym**, że jako źródło węglowodorów stosuje się nasycony alifatyczny węglowódor o łańcuchu prostym, zawierający 10 — 15 atomów węgla w cząsteczce lub mieszaninę nasyconych alifatycznych węglowodorów o łańcuchu prostym, zawierających 10 — 15 atomów węgla w cząsteczce, o ciężarze właściwym 0,740 — 0,765, korzystnie 0,750, korzystnie zawierającą co najmniej 40% wagowych dodekanu, przy czym węglowodory dodaje się w ilości 1—5% wagowych w stosunku do podłoża.