



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

263297

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/16

(22) Přihlášeno 30 07 87

(21) PV 5697-87.V

(40) Zveřejněno 15 07 88

(45) Vydáno 14 07 89

(75)

Autor vynálezu

ŠTROS FRANTIŠEK ing. CSc., RUT MILOSLAV ing., ADÁMEK LUBOMÍR dr.,
BENEŠ BOHUSLAV RNDr. CSc., TÁBORSKÝ OTTO RNDr. CSc., PRAHA

(54) **Způsob přípravy kvasničné biomasy s vysokým obsahem biologicky
aktivních komplexů chromu**

V průběhu kultivace kvasinek se zdroj trojmocného chromu přidává do kultivačního média v dávkách úměrných přírůstku kvasničné biomasy, s výhodou v množství 1 000 až 5 000 µg Cr na 1 g nově vytvořené kvasničné sušiny. Za těchto podmínek chromitá sůl neinhibuje kultivaci, dosahuje se vysokého stupně retence chromu v biomase a získává se kvasničná biomasa s vysokým obsahem intracelulárního chromu. Doporučuje se používat kvasinky patřící k druhům povoleným pro přípravu potravinářských aditiv.

Vynález se týká způsobu přípravy kvasničné biomasy s vysokým obsahem biologicky aktivních komplexů chromu.

Trojmocný chrom je pro živé organismy esenciálním prvkem, který ovlivňuje některé důležité metabolické funkce. U savců je prvním a nejvýznamnějším důsledkem deficience chromu poškození glukózové tolerance, projevující se mimo jiné snížením efektivnosti insulínu, glykosurií a hyperglykemií. Deficience chromu dále způsobuje zpomalení růstu, snížení délky života, zvýšení hladiny cholesterolu a triglyceridů a další negativní symptomy. Denní potřeba chromu u dospělých lidí se odhaduje na 200 až 300 μg , u dětí a dospívajících je potřeba chromu nižší, u starých lidí naopak značně vyšší.

Značná část populace má však denní příjem chromu nižší se všemi z toho vyplývajícími riziky. V ČSSR se např. denní příjem chromu odhaduje na 50 až 100 μg .

Při odstraňování následků deficience chromu, hlavně při obnovování glukózové tolerance má daleko vyšší biologický účinek než jednoduché anorganické sloučeniny chromu organický komplex s obsahem trojmocného chromu, který byl poprvé zjištěn v pivovarských kvasnicích a nazván glukózový toleranční faktor (GTF). Tento komplex obsahuje kromě chromu aminokyseliny glycin, kyselinu glutamovou a cystein a především kyselinu nikotinovou.

Přirozené zdroje organických komplexů chromu v pivovarských kvasnicích jsou poměrně nízké (cca 2 $\mu\text{g/g}$) a proto se vyvíjejí postupy na přípravu kvasničné biomasy s vysokým obsahem intracelulárního chromu. Při postupu podle USA patentu č. 4 343 905 se obsah GTF v pivovarských kvasnicích zvyšuje až na 2 000 $\mu\text{g/g}$ tak, že se suspenze kvasinek nechá reagovat s roztokem kyseliny nikotinové, kyseliny l-glutamové, glycinu, l-cysteinu a oxidu chromitého. Podle USA patentu č. 4 348 483 se kvasničný produkt s obsahem intracelulárního chromu až 1 000 $\mu\text{g/g}$ připravuje tak, že se na suspenzi živých kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* při pH 4 až 7 působí za nerůstových podmínek vodným roztokem netoxické chromité soli po dobu asi 30 minut. Takto upravené kvasinky se buď přímo zkoncentrují, vyperou a usuší, nebo se po přidání živin pomnoží kultivací, při níž se obsah vnitrobuněčného chromu stabilizuje a sníží na žádanou hodnotu.

Při těchto známých postupech obohacování mikrobiální biomasy biologicky aktivním chromem se chromité soli vesměs přidávají k mikrobiální suspenzi najednou na počátku procesu a to v poměrně velkém množství. Použití vysoké koncentrace chromitých iontů brzdí rozmnožování mikrobiálních buněk a proto chrom vniká do nemnožících se buněk pasivním transportem, nebo v průběhu velmi pomalu probíhající kultivace.

Podíl chromu, který se zabudovává do buněk, je poměrně nízký a nízké bývají i dosahované koncentrace intracelulárního chromu.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob přípravy kvasničné biomasy s vysokým obsahem biologicky aktivních komplexů chromu vsádkovou, přiživovanou periodickou nebo kontinuální kultivací kvasinek za přítomnosti zdroje trojmocného chromu podle vynálezu, při němž se chromité soli přidávají v průběhu kultivace do fermentujícího média průběžně nebo v periodických dávkách v množství úměrném přírůstkům biomasy, s výhodou 1 000 až 5 000 $\mu\text{g Cr}$ na 1 g nové vytvořené kvasničné sušiny.

Při přiživované periodické nebo při kontinuální kultivaci je výhodné rozpustit chromité soli v používaném zdroji uhlíku nebo v jeho vodném roztoku. Dávka d chromité soli v g na 100 g zdroje uhlíku se vypočítá ze vzorce:

$$d = \frac{100 \cdot y \cdot \text{Cr}_x}{p}, \text{ kde}$$

y je předpokládaný výtěžnostní koeficient

Cr_x je požadovaná dávka chromu na 1 g přírůstku kvas. sušiny

p je obsah chromu v 1 g chromité soli.

Má-li být získaná biomasa s vysokým obsahem biologicky aktivních komplexů chromu použita pro lidskou konzumaci, doporučuje se použít kvasinky schválené pro přípravu potravinářských aditiv patřící např. k durhům *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Torulopsis ethanolitolerans*.

Po zakončení kultivace se kvasinky ze zralého média oddělí, zkoncentrují, vyperou vodou, inaktivují a případně, usuší.

Výhodou postupu podle vynálezu je to, že obsah chromitých solí ve fermentujícím médiu je v průběhu kultivace relativně nízký a nedosahuje toxických koncentrací, které by zpomalovaly rozmnožování kvasinek. Další výhodou je to, že se vysoký podíl, až 80 % z přidaného chromu, přeměňuje na chrom intracelulární a že napěstovaná biomasa obsahuje 3 000 µg/Cr na 1 g sušiny. Nízká zbytková koncentrace chromitých solí ve zralém médiu usnadňuje praní kvasinek.

Postup podle vynálezu je objasněn, nikoliv však omezen následujícími příklady.

P ř í k l a d 1

V laboratorním fermentoru s užitečným obsahem 15 l a dosahovaným přestupem kyslíku $5,5 \text{ g O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ byla provedena série 5 přiživovaných periodických kultivací kvasinky *Torulopsis ethanolitolerans* CCY 26-58-1 na syntetickém etanolu.

Před zahájením všech kultivací bylo do fermentoru napuštěno 14 l vody, přidáno 15 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 250 ml roztoku živných solí obsahujícího v litru 35 ml 85 % hmot. H_3PO_4 , 30 g KOH, 160 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a 0,5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Médium pak bylo inokulováno 300 g kvasničné pasty (22,5 % sušiny). Kultivace byly vedeny při 33 °C, pH se upravovalo 10 % roztokem amoniaku na hodnotu 4,0 a koncentrace etanolu v médiu se přístrojem Netrex udržovala v rozmezí 0,15 až 0,25 % obj. Kultivace byly ukončeny, když se spotřebovalo 314 g absolutního etanolu.

Rozdíly mezi jednotlivými kultivacemi spočívaly v přidávaném množství chromité soli. Kultivace č. 1 byla kontrolní bez přídavku Cr, při kultivacích 2 až 5 bylo v přítokovaném rozpuštěno odstupňované množství $\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.

Po ukončení kultivací byly kvasinky z média odseparovány, promyty vodou a odstředěny na kvasničnou pastu. Pasta byla resuspendována v pitné vodě na mléko o sušině 16 %. Mléko se inaktivovalo 30minutovým zahříváním na 80 °C a pak usušilo v laboratorní rozprašovací sušárně. Výsledky dosažené při srovnávacích kultivacích jsou shrnuty v tabulce 1.

T a b u l k a 1

Kultivace	Obsah Cr v etanolu mg Cr/g a.a.	Růstová rychlost h^{-1}	Výtěžnost kvas. suš. z etanolu $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	Množství výrobku 94 % suš.	Obsah Cr ve výrobku $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	Retence Cr %
1	-	0,43	0,80	339	-	-
2	0,95	0,39	0,79	335	0,73	82
3	1,91	0,34	0,71	305	1,62	82
4	3,82	0,25	0,50	238	3,40	67
5	5,73	0,19	0,47	229	4,50	54

Z výsledků je zřejmé, že při kultivacích 2 a 3 nebyla proti kontrole podstatně snížena růstová rychlost ani výtěžnost a dosažena retence Cr v biomase 82 %. Přídavek Cr na 1 g přírůstku kvasničné sušiny činil při těchto kultivacích 1 200 resp. 2 700 µg. Při kultivacích 4 a 5 snížily vyšší dávky Cr podstatně růstovou rychlost a výtěžnost a nižší byla i retence chromu v biomase.

P ř í k l a d 2

V témže fermentoru jako v příkladu 1 a za obdobných kultivačních podmínek byla provedena přiživovaná periodická kultivace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* RIFIS 104 na sacharóze. Médium bylo inokulováno 300 g lisovaných kvasinek (27 % sušiny), v průběhu kultivace se roztok sacharózy do fermentoru dával při náhlém poklesu koncentrace oxidu uhličitého ve výdechu. Kultivace byla ukončena po spotřebování 270 g sacharózy. Spolu s roztokem sacharózy byl do média přidáván i síran chromitodraselný v množství odpovídajícím $1,37 \mu\text{g Cr na } 1 \text{ g sacharózy}$. Při kultivaci byla dosažena růstová rychlost $0,25 \text{ h}^{-1}$ a výtěžnost $0,4 \text{ g.g}^{-1}$. Přídavek Cr na 1 g nově vytvořené kvasničné sušiny činil $3\,425 \mu\text{g}$. Bylo získáno 201 g sušených kvasinek (94 % sušiny) s obsahem $1\,530 \mu\text{g Cr/g}$. Do biomasy přešlo 81 % z nadávkovaného chromu.

P ř í k l a d 3

Ve fermentoru popsaném v příkladu 1 byla provedena vsádková kultivace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* RIFIS 104 na sacharóze. Před zahájením kultivace se do fermentoru napustilo 14,5 l vody, přidalo se 150 ml roztoku minerálních živin (příklad 1), 5 g síranu amonného, 20 g močoviny a 300 g sacharózy. Živné médium se inokulovalo 120 g lisovaných kvasinek (27 % sušiny). Při kultivaci se udržovala teplota 30°C a do fermentujícího média se programovým čerpadlem dával roztok chloridu chromitého. Dávky Cr se v průběhu kultivace zvyšovaly úměrně přírůstkům kvasničné biomasy, ověřeným předem kontrolním pokusem. Konec kultivace byl indikován prudkým vzestupem rozpuštěného kyslíku po spotřebování zdroje uhlíku. Při kultivaci byla dosažena výtěžnost $0,38 \text{ g kvasničné sušiny z } 1 \text{ g sacharózy}$ a do média bylo nadávkováno 230 mg chromité soli, což odpovídá dávce $2\,017 \mu\text{g Cr na } 1 \text{ g vytvořené kvasničné sušiny}$. Bylo připraveno 150 g sušených kvasinek (94 % suš.), které obsahovaly $1\,240 \mu\text{g Cr.g}^{-1}$. Retence Cr při kultivaci byla 81 %.

P ř í k l a d 4

Ve fermentoru s účinným objemem 2,5 l a dosahovaným přestupem kyslíku $5,3 \text{ g O}_2.\text{l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ byla provedena kontinuální kultivace kvasinky *Torulopsis ethanolitolerans* na syntetickém etanolu. Kultivace byla vedena při zředovací rychlosti $0,25 \text{ h}^{-1}$, teplotě 33°C a pH 4,0. V průběhu $0,25 \text{ h}^{-1}$, teplotě 33°C a pH 4,0. V průběhu kultivace se do fermentoru přidávalo 625 ml.h^{-1} čerstvého média, které obsahovalo v litru 20 g etanolu, 15 ml roztoku minerálních živin (příklad 1), $0,6 \text{ g (NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 g močoviny a $0,154 \text{ g CrCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$. Stejný objem zralého média odcházel z fermentoru přepadem, rovnovážná koncentrace kvasničné sušiny při kultivaci byla 15 g.l^{-1} . Při kultivaci se dosáhlo výtěžnosti kvasničné sušiny $0,75 \text{ g.g}^{-1}$, přídavek Cr na 1 g přírůstku biomasy činil $2\,000 \mu\text{g}$. Výrobek s 93 % sušiny obsahoval $1\,488 \mu\text{g.g}^{-1}$ a do biomasy přešlo 80 % z přidaného chromu.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob přípravy kvasničné biomasy s vysokým obsahem biologicky aktivních komplexů chromu vsádkovou, přiživovanou periodickou nebo kontinuální kultivací kvasinek za přítomnosti zdroje trojmocného chromu, vyznačený tím, že se chromité sole přidávají v průběhu kultivace do fermentujícího média průběžně nebo v periodických dávkách v množství úměrném přírůstkům biomasy, s výhodou $1\,000$ až $5\,000 \mu\text{g Cr na } 1 \text{ g nově vytvořené kvasničné sušiny}$.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se při přiživované periodické nebo při kontinuální kultivaci chromité soli rozpouštějí ve zdroji uhlíku, nebo v jeho vodném roztoku.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že použité kvasinky patří k druhům *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Torulopsis ethanolitolerans*.