

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

259289
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
A 23 L 1/28

(22) Prihlášené 29 12 86
(21) (PV 10163-86.K)

(40) Zverejnené 15 02 88

(45) Vydané 15 03 89

(75)

Autor vynálezu

ŠTURDÍK ERNEST ing. CSc., BRATISLAVA, KOLLÁR ROMAN ing., NIŽNÁ,
MIKULÁŠOVÁ MÁRIA RNDr., KRČMÁŘ STANISLAV ing. CSc.,
BRATISLAVA, HUNČÍKOVÁ SOŇA ing., TRENCÍN

(54) Spôsob uvoľňovania cytoplazmatického obsahu kvasiniek indukovanou autolýzou

1

2

Uvedené riešenie rozširuje paletu doposiaľ používaných iniciačných faktorov autolýzy. Podstata riešenia spočíva v tom že na vstupnú surovinu o sušine 5 až 30 % hmot. sa pôsobí aktívnym autolyzátom v objemovom pomere 1 : 3 až 1 : 12, zmes sa lyzuje za miešania pri teplote 45 až 55 °C počas 5 až 30 hodín. Na vstupnú surovinu sa súčasne s autolyzátom môže pôsobiť etanolom v hmotnostnom pomere 1 : 99 až 1 : 9 a/alebo chloridom sodným v hmotnostnom pomere 1 : 999 až 1 : 9.

Vynález sa týka spôsobu uvoľňovania cytoplazmatického obsahu kvasiniek indukovanou autolýzou za účelom získavania potravinársky a farmaceuticky využiteľných bunkových komponent.

Na rozrušenie bunkovej steny a tým sprístupnenie proteínov a ostatných zložiek biomasy kvasiniek sa používajú rôzne fyzikálne, chemické a biochemické spôsoby dezintegrácie, pričom potrebný stupeň rozrušenia bunky sa dosahuje často kombináciou týchto metód.

Jednou z fyzikálnych metód dezintegrácie je balotínová dezintegrácia, čo je vlastne drvenie alebo mletie biomasy v zariadeniach s rôznymi abrazívami (Mogren, H., Lindblom, H., Hedenskog, G., *Biotechnol. Bioeng.* 16, 261—274, 1974). Nevýhodou tohto spôsobu je pomerne veľký oter abrazíva, s čím súvisí potreba viacnásobného premývania a lokálne zahrievanie susepnzle vyžadujúce chladienie.

Vysokotlaková metóda dezintegrácie (Brookman, J. S., *Biotechnol. Bioeng.* 17, 465—479, 1975) spočíva v tom, že suspenzia kvasiniek prechádza z oblasti vysokého tlaku cez trysky dezintegračného zariadenia do oblasti normálneho tlaku. Rozbitie buniek je v priamej závislosti na hodnote hydrostatického tlaku a na rýchlosti zmeny tlaku v prostredí, v ktorom sú bunky suspendované. Aj pri pomerne vysokých hodnotách tlaku sa však tento spôsob vyznačuje pomerne nízkou účinnosťou, nesúcou so sebou nutnosť viacnásobne opakovať proces, čím vznikajú fragmenty rôznych veľkostí a problémy pri ich separácii. Navyše zahrievanie pri zmenách tlaku môže viesť k inaktivácii intracelulárnych enzýmov.

Princípom dezintegrácie explozívnu dekompresiou je nasýtenie suspenzie vhodným plynom pod tlakom a rýchle zníženie tlaku (Nesterov, A. I., Stavoroitova, G. A., *Prikl. Biochim. Mikrobiol.* 11, 593—597, 1975). Následkom vyrovnávania tlakového rozdielu vo vnútri bunky a jej okolí dochádza k rozrušeniu bunkových stien. Vnútrobuňový obsah však zostáva z veľkej časti vnútri buniek, nakoľko rozrušená bunka po krátkodobom pôsobení dezintegrácie už nie je mechanicky namáhaná. To si vyžaduje nutnosť viacnásobného opakovania dezintegrácie.

Okrem týchto najznámejších spôsobov dezintegrácie sa zriedkavo využíva aj ultrasonikácia, zmrazovanie, sušenie.

Chemické spôsoby spočívajú v pôsobení určitých látok (napr. tiolov) na zložky bunkovej steny, čím sa bunková stena labilizuje až rotpadá (Shetty, J. K., Kinsella, J. E., *Biotechnol. Bioeng.* 20, 755—766, 1978).

Biochemické metódy sú založené na enzymatickom pôsobení cudzieho alebo vlastného lytického aparátu na bunkovú stenu. V experimentálnych podmienkach je hojne rozšírené napmä využívanie exogénnych sy-

stémov (Phaff, M. J., *Adv. Chem. Ser.* 160, 249—282, 1977) získaných z baktérií *Arthrobacter luteus*, *Bacillus subtilis*, húb *Oerskonia*, *Albus*, *Coprinus*, *Flavus* a ďalších, alebo sa v laboratórnom rozsahu využíva tráviaca šťava slimáka *Helix pomatia*.

Pomerne menej sa využíva endogénny lytický systém kvasiniek (Chrenova, N. M., Bezrukov, M. G., Kogan, A. S., Sergejev, W. A., *Nahrung* 25, 837—844, 1981). Bunka za určitých okolností (vyčerpanie živín, nevhodná teplota, Ph) produkuje lytické enzýmy — andopeptidázy, karboxypeptidázy, aminopeptidázy, kyslú fosfatázu, β -[1,3]glukanázu, ktoré pôsobia na vlastnú bunkovú stenu a rozkladajú ju. Tento proces — autolýza priebehu v konečnom dôsledku až do rozloženia buniek na základné zložky ako sú aminokyseliny, patidy, nukleotidy, nízkomolekulové sacharidy, vitamíny atď. Ak sa však vedie len do určitého požadovaného stupňa, môže slúžiť ako vhodný prostriedok na dezintegráciu bunky a uvoľňovanie proteínov a iných vnútrobuňových zložiek do prostredia. Doba prirodzeného autolytického procesu je pomerne dlhá (niekoľko dní), čo vyvoláva riziko bakteriálnej kontaminácie.

Tento nedostatok v podstatej miere odstraňuje spôsob podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že na vstupnú surovinu o sušine 5 až 30 % hmot. sa pôsobí aktívnym autolyzátom v objemovom pomere 1 : 3 až 1 : 12, zmes sa lyzuje za miešania pri teplote 45 až 55 °C počas 5 až 30 hodín. Na vstupnú surovinu sa súčasne s autolyzátom môže pôsobiť etanolom v hmotnostnom pomere 1 : 99 až 1 : 9 a/alebo chloridom sodným v hmotnostnom pomere 1 ku 999, až 1 : 9.

Spôsob podľa vynálezu rozširuje paletu doposiaľ používaných iniciačných faktorov autolýzy. Spočíva v iniciácii autolýzy prídáním vhodného množstva už zlyzovanej suspenzie tohoistého mikroorganizmu. V prídavanom lyzáte sú už naprodukované a uvoľnené lytické enzýmy, ktoré môžu hneď atakovať bunkové steny, tieto sa stávajú prístupnejšie vlastnému lytickému systému, ktorý sa zatiaľ utvorí a proces rozloženia bunky sa takto podstatne skráti na 5 až 30 hodín.

Kombináciou s inými iniciačnými faktormi, ako je chlorid sodný a etanol sa ešte zefektívni pôsobenie autolytického systému. Ak ako kritérium autolytickej dezintegrácie buniek používame množstvo uvoľnených proteínov, tak potom sa týmto spôsobom, t. j. prídavkom etanolu, chloridu sodného a aktívneho autolyzátu k suspenzii za niekoľko hodín z bunky uvoľní 50—80 % z celkových proteínov, stanovených Lowryho metódou.

Vhodný pomer prídávaneho aktívneho autolyzátu k biomase zabezpečuje, že sa k mikrobiálnej suspenzii prídá dostatočné

množstvo lytických enzýmov a pritom čo najmenej ulitizovateľných živín.

Množstvo uvoľnených proteínov pri rôz-

ných spôsoboch iniciácie autolýzy udáva tabuľka 1.

Tabuľka 1

Množstvo proteínov uvoľnených do supernatantu (v %) z pôvodného obsahu proteínov v intaktnom droždí, pri rôznych dobách a spôsoboch iniciácie autolýzy. Etanol, respektíve chlorid sodný pridávaný vo výsled-

nej koncentrácii 5 % hmot., autolyzát v množstve zodpovedajúcom 1/6 objemu vstupnej suroviny (kvasničné mlieko o sušine 10 %).

Čas (h)	50 °C	50 °C NaCl	50 °C etylalkohol	50 °C autolyzát	50 °C etylalkohol NaCl autolyzát
1	0,7	0,9	1,9	17,5	18,2
5	4,6	5,6	7,1	26,6	37,2
10	9,0	12,1	16,0	45,3	68,5
24	36,3	46,3	50,9	64,7	78,8

Príklad 1

K 3 l kvasničnej suspenzie o sušine 10 % a obsahu proteínov 32,8 mg/ml sa pridá 600 ml štandardného autolyzáta, 30 g chloridu sodného, 150 g etanolu a zmes sa inkubuje za miešania pri 50 °C. Po 5 hodinách sa suspenzia scentrifuguje, pričom sa získa 730 g sedimentu, využiteľného na izoláciu napríklad ergosterolu a 2 812 ml supernatantu o sušine 4,1 % a obsahu proteínov 15,5 mg/ml využiteľného na izoláciu proteínov.

Príklad 2

Postup rovnaký ako v príklade 1, lýza sa však nepreruší po 5. hodine, ale po 24. hodine. Po centrifugácii sa z rovnakého množstva suspenzie získa 639 g sedimentu a 3 044 ml supernatantu o sušine 6 % a obsahu proteínov 25 mg/ml.

Príklad 3

Postup rovnaký ako v príklade 2, pridá sa však 1 000 ml aktívneho autolyzáta a 60 g chloridu sodného. Získaný supernatant má sušinu 9,1 % a obsah proteínov 48,5 mg/ml.

Príklad 4

Postup rovnaký ako v príklade 2, pridá sa však 3 g chloridu sodného a 30 g etylalkoholu. Získaný supernatant má sušinu 7,4 % a obsah proteínov 43,0 mg/ml.

Príklad 5

Postup rovnaký ako v príklade 2, pridá sa však 150 g chloridu sodného a 300 g etylalkoholu. Získaný supernatant má sušinu 11 % a obsah proteínov 44 mg/ml.

Príklad 6

Postup rovnaký ako v príklade 2, pridá sa 500 ml aktívneho autolyzáta, 60 g chloridu sodného a 30 g etylalkoholu. Získaný supernatant má sušinu 8,2 % a obsah proteínov 44 mg/ml.

Príklad 7

Postup rovnaký ako v príklade 2, pridá sa však 150 g chloridu sodného a 500 ml aktívneho autolyzáta, získaný supernatant má sušinu 11,2 % a obsah proteínov 41,5 mg/ml.

Príklad 8

Postup rovnaký ako v príklade 2, pridá sa však 500 ml aktívneho autolyzáta, 3 g chloridu sodného a 300 g etylalkoholu. Získaný supernatant má sušinu 6,9 % a obsah proteínov 46,2 mg/ml.

Príklad 9

Postup rovnaký ako v príklade 2, pridá sa však 100 ml aktívneho autolyzáta, 150 g chloridu sodného a 30 g etylalkoholu. Získaný supernatant má sušinu 10,7 % a obsah proteínov 46,2 mg/ml.

Príklad 10

Postup rovnaký ako v príklade 2, pridá sa však 100 ml aktívneho autolyzáta, 3 g chloridu sodného. Získaný supernatant má sušinu 6,2 % a obsah proteínov 36,2 mg/ml.

Príklad 11

Postup rovnaký ako v príklade 2, pridá sa však 100 ml aktívneho autolyzáta, 60 g chloridu sodného a 300 g etylalkoholu. Získaný supernatant má sušinu 7,0 % a obsah proteínov 40,5 mg/ml.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob uvoľňovania cytoplazmatického obsahu kvasiniek indukovanou autolýzou vyznačujúci sa tým, že na vstupnú surovinu o sušine 5 až 30 % hmot. sa pôsobí aktívnym autolyzátom v objemovom pomere 1 ku 3 až 1 : 12, zmes sa lyzuje za miešania pri teplote 45 až 55 °C počas 5 až 30 hodín.

2. Spôsob uvoľňovania cytoplazmatického obsahu kvasiniek podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že na vstupnú surovinu sa súčasne s autolyzátom pôsobí etanolom v hmotnostnom pomere 1 : 99 až 1 : 9 a/alebo chloridom sodným v hmotnostnom pomere 1 : 999 až 1 : 9.