



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

207473
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/08

(22) Přihlášeno 27 07 77

(21) [PV 4982-77]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 27 07 76
(P 26 33 666.3)
Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 15 09 80

(45) Vydáno 15 02 84

(72)

Autor vynálezu

SCHLINGMANN MERTEN dr., KELKHEIM a VÉRTESY LASLO dr.,
EPPSTEIN/TS. (NSR)

(73)

Majitel patentu

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, FRANKFURT/M. (NSR)

(54) Způsob snížení obsahu lipidů a nukleových kyselin v mikrobiální buněčné hmotě

1

Vynález se týká způsobu snížení obsahu lipidů a nukleových kyselin v mikrobiální buněčné hmotě. Každá buňka obsahuje uhlohydráty, bílkoviny, lipidy a nukleové kyseliny. Použitelnost mikrobiální buněčné hmoty v potravinářství a jako krmiva je nepříznivě ovlivněna obsahem nukleových kyselin a lipidů.

Obsah nukleových kyselin je závadný z toho důvodu, že vede k patologickým stavům jako je dna a močové kameny. Lipidy omezují skladovatelnost, protože dochází ke žluknutí, a ovlivňují chuť.

Vynález si klade za úkol snížit obsah lipidů a nukleových kyselin v mikrobiální buněčné hmotě. Podle známých způsobů se lipidy buněčné stěny a buněčných membrán vymývají rozpouštěním v organickém roztoku nebo se zmýdelňují vodným roztokem zásad.

Znáмым způsobem k rozpouštění lipidů v mikroorganismech je vymývání směsí metanolu a chloroformu. Tento způsob je pracný a může vést ke vzniku toxických produktů. Extrakce lipidů směsí alkoholu a vody, popsána v DT-OS 2 405 593 nebo DT-OS číslo 2 137 038, je nevhodná pro použití u bakterií a nákladná technická vybavení.

Další známé postupy pro zbavení mikrobiální buněčné hmoty většiny nukleových

2

kyselin a lipidů užívají rozklad pomocí zásad při vyšších teplotách. Nepříznivé je v tomto případě uvolnění volných mastných kyselin, vzniklých při hydrolýze, které se pak oddělují současně s bílkovinou.

Z US patentového spisu č. 3 931 772 je znám postup, při němž se sušená buněčná hmota například z *Candida utilis* extrahuje směsí vody a rozpouštědla typu alkoholu, například 60 až 80 objemovými % alifatického alkoholu, například ethanolu, načež se suší. Tímto způsobem je možno zlepšit chuť a vůni výsledného produktu, avšak obsah nukleových kyselin zůstává beze změny.

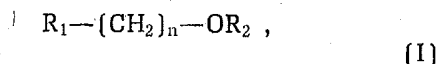
V US patentových spisech č. 3 615 654 a 3 775 393 a v britském patentovém spisu č. 1 400 691 jsou popsány postupy, směřující ke snížení obsahu nukleových kyselin v kvasinkových buňkách. Podle US patentu číslo 3 615 654 se postupuje tak, že se buňky několikrát extrahují velkými objemy kapalného amoniaku při teplotě -45 až -50 °C, s výhodou po dobu 24 hodin v Soxletově přístroji. Při tomto postupu, při němž se spotřebuje velké množství energie, je možno snížit obsah ribonukleové kyseliny z 8,5 na 1,4 %. Podle US patentu č. 3 775 393 se postupuje tak, že se kvasinkové buňky zpracovávají vodným roztokem amoniaku v autoklávu při teplotě 121 °C. Obsah nukleové

kyseliny přitom klesne z 10,5 na 1,3 %. V britském patentu č. 1 400 691 se snižuje obsah nukleové kyseliny v kvasinkových buňkách tak, že se v prvním stupni provádí extrakce směsí vody a alkoholu, například směsí isopropanolu a vody, která je azeotropní při 80 °C, načež se ve druhém stupni směs zpracovává roztokem hydroxidu sodného při teplotě 60 °C. Tímto způsobem je možno snížit obsah nukleové kyseliny z 9 na 2 %. Ve spisu se rovněž uvádí, že druhý stupeň postupu je možno provádět při použití amoniaku nebo hydroxidu amonného. Přesné údaje se však neuvádí.

Způsob podle vynálezu si klade za úkol zlepšit známé postupy v tom smyslu, že je možno snížit obsah lipidů a nukleových kyselin v mikrobiální buněčné hmotě až na méně než 1 % hmotnostní v případě kyseliny nukleové, a to kombinovanou extrakcí při použití organického rozpouštědla, zejména typu alkoholu a amoniaku při teplotě místnosti po dobu 0,5 až 2 hodiny, načež se výsledná směs promyje vodou. Způsob podle vynálezu je možno provádět bez použití nízkých i zvýšených teplot, takže je možno ušetřit energii a tím i způsob podle vynálezu provádět v technickém měřítku.

Mimoto při těchto postupech dochází k tomu, že část základních aminokyselin, obsažených v bílkovinách, například část lysinu, přechází do stavu, v němž je organismus nemůže využít.

Předmětem vynálezu je způsob snížení obsahu lipidů a nukleových kyselin v mikrobiální buněčné hmotě, vyznačující se tím, že se buněčná hmota extrahuje směsí amoniaku nebo hydroxidu amonného v organickém rozpouštědle obecného vzorce I



kde

R_1 a R_2 znamená atom vodíku a

n znamená celé číslo 1, 2 nebo 3 nebo

R_1 znamená hydroxyskupinu a

R_2 znamená atom vodíku, methyl, nebo ethyl, a

n znamená celé číslo 2 nebo 3,

přičemž celkový obsah vody činí 0 až 30 procent hmotnostních a obsah amoniaku 1 až 10 % hmotnostních, vztaženo na celkovou hmotnost rozpouštědla, a po oddělení buněčné hmoty z extrakční směsi se buněčná hmota promyje vodou, vodná fáze se oddělí a po případné extrakci organickým rozpouštědlem obecného vzorce I se buněčná hmota usuší.

Mikrobiální buněčnou hmotou jsou s výhodou mikroorganismy, které byly získány pěstováním na alkoholu nebo nasycených uhlovodících s přímým řetězcem za přítomnosti vodného živného prostředí a plynu s obsahem volného kyslíku. S výhodou jsou těmito organismy bakterie, kvasinky a houby.

Příkladem těchto mikroorganismů mohou být bakterie, využívající methanol, z čeledi *Methylomonas*, například *Methylomonas clara* ATCC 31226 nebo kvasinky *Candida lipolytica* ATCC 20383, které je možno získat pěstováním na nasycených uhlovodících s přímým řetězcem za přítomnosti vodného živného roztoku.

Stejně dobře je možno užít sušené mycelium hub. Tento buněčný materiál je možno získat při výrobě antibiotik, například při fermentaci penicilinu po extrakci antibiotika.

Jako rozpouštědlo obecného vzorce I je možno užít alkoholy jako methanol, ethanol, n-propanol a isopropanol. Výhodné jsou methanol a ethanol, zvláště výhodný je methanol.

Kromě alkoholů je možno užít také glykoly a jejich monoethery vzorce I, jmenovitě glykol a monomethylglykol.

Amoniak je možno k uvedeným rozpouštědlům přidat v plynné formě (NH_3) nebo ve formě koncentrovaného vodného roztoku (NH_4OH). Volba typu amoniaku závisí na obsahu vody v sušině buněčného materiálu a na množství a obsahu vody v použitém rozpouštědle. Vodný roztok amoniaku je vhodný při použití buněčné hmoty s malým obsahem vody (0 až 15 %), plynný amoniak je vhodnější při použití buněčné hmoty s vyšším obsahem vody (10 až 30 %).

Podíl lipidů, které je možno odstranit extrakcí amoniakem a rozpouštědlem, závisí na celkovém obsahu vody v % hmotnostních, vztaženo na celkové množství použitého rozpouštědla a na koncentraci plynného amoniaku v hmotnostních %, vztaženo na množství užitého rozpouštědla.

Zvláště dobrých pokusných výsledků je možno dosáhnout při hmotnostním poměru buněčné hmoty a rozpouštědla v rozmezí 1:3 až 1:6 při použití methanolu a ethanolu a v rozmezí 1:8 až 1:12 při použití propanolu, glykolu a monoglykoletherů. Koncentrace amoniaku, vztaženo na množství rozpouštědla, je 1 až 10 % hmotnostních, s výhodou 1 až 5 % hmotnostních. Celkové množství vody přítomné v buněčné hmotě, rozpouštědle a popřípadě ve vodném roztoku amoniaku je 0 až 30, s výhodou 0 až 20, zvláště 0 až 10 % hmotnostních, vztaženo na celkové množství užitého rozpouštědla.

Při provádění postupu v technickém měřítku je možno upustit od sušení buněk po fermentaci až na malý zbytkový obsah vody 4 % nebo nižší. Stačí usušit buněčnou hmotu tak, aby celkový obsah vody se pohyboval po přidání nutného množství rozpouštědla v optimálním rozmezí, popřípadě se k rozpouštědlu přidá amoniak v plynné formě.

Rozpuštění tuků z mikrobiální buněčné hmoty se provádí tak, že se buněčný materiál uvede v suspenzi v organickém rozpouštědle obecného vzorce I a nechá se procházet plynným amoniakem nebo se přidá roztok amo-

niaku. Je účelné suspenzi míchat. Teplota při zpracování se pohybuje v rozmezí -20 až $+60^{\circ}\text{C}$, při výhodném rozmezí 25 až $+50^{\circ}\text{C}$, zvláště $+10$ až $+30^{\circ}\text{C}$. Postup trvá 5 až 120 minut, s výhodou 25 až 35 minut. Zpracování se obvykle provádí při atmosférickém tlaku.

Po ukončeném zpracování směsí rozpouštědla a amoniaku se získaný buněčný materiál (bílkoviny) oddělí libovolným způsobem, například odstředěním, filtrací nebo usazením z rozpouštědla.

Výhodným způsobem je filtrace. Získaný pevný buněčný materiál je možno stejným způsobem zpracovat při použití uvedeného organického rozpouštědla ještě jednou, aby byly lipidy pokud možno úplně odstraněny.

Získaný materiál se pak suší k odstranění zbytků rozpouštědla a amoniaku. Sušení se s výhodou provádí za sníženého tlaku, s výhodou 1064 až 1995 Pa a vyšší teplotě, s výhodou 40 až 50°C . Produkt zbavený tuku je po usušení bez zápachu.

Vodná fáze, získaná svrchu uvedeným postupem a oddělená od pevného buněčného materiálu, obsahuje amoniak a rozpuštěné lipidy. Užití rozpouštědla je možno oddělit od tuků vakuovou destilací a znovu použít.

Nakonec se buněčná hmota zbavená tuků a popřípadě usušená smísí s vodou. Výhodné je užití takového množství vody, aby poměr vody k buněčné hmotě byl v rozmezí $1:1$ až $1:30$, zvláště $1:5$ až $1:15$. Množství vody má být alespoň takové, aby bylo možno suspenzi míchat.

Hodnota pH se má při zpracování vodou pohybovat v rozmezí 5 až $8,5$, s výhodou 6 až $7,5$ a popřípadě je nutno ji na toto rozmezí upravit. To je důležité zejména v tom případě, kdy se užívá neúplně usušené buněčné hmoty z prvního stupně, která může obsahovat ještě zbytky amoniaku, což vede k vysokým hodnotám pH.

Tato extrakce nukleových kyselin, solí, polysacharidů a ve vodě rozpustných sekundárních metabolitů vodou se obvykle provádí v teplotním rozmezí 30 až 95°C při atmosférickém tlaku. Výhodné jsou teploty 40 až 70°C , zvláště 50 až 60°C . Doba extrakční teploty a množství vody 5 až 120 minut, dobrých výsledků se dosahuje při extrakční době 25 až 45 minut. K oddělení pevných a kapalných součástí se suspenze odstředí s výhodou při teplotě 10 až 30°C . Dalším vhodným dělicím postupem je usazování a filtrace.

K jednoduchému oddělení buněčné hmoty se s výhodou přidá k vodě ve druhém stupni až 20% hmotnostních, s výhodou 5 až 15% hmotnostních nižšího alkoholu jako ethanolu nebo methanolu, s výhodou methanolu.

Pevná fáze se pak uvolní běžnými postupy jako jsou lyofilizace, sušení rozprašováním nebo sušením ve vakuu od kapalných zbytků. Produkt má příjemnou vůni, světlejší barvu než výchozí materiál a dobrou

schopnost vázat vodu. Po svrchu uvedeném odstranění lipidů a nukleových kyselin je produkt vhodný k výrobě potravinářských výrobků a krmiv.

V produktu podle vynálezu jsou odstraněny lipidy až na zbytkový obsah $0,5$ až $3,5\%$ procenta hmotnostních, nukleové kyseliny až na zbytkový obsah $0,5$ až $4,5\%$ hmotnostních.

Způsob podle vynálezu odstraňuje nevýhody známých postupů jako je užití rozpouštědel nebo štěpení zásadami. Není nutné užít chlorovaných uhlovodíků. Odstranění tuků pomocí směsí rozpouštědel a amoniaku je zvláště u bakterií úplnější než při zpracování buněčné hmoty směsí rozpouštědla a vody. Přitom není zapotřebí užít extrémních teplot a hodnot pH, které snižují použitelnost produktu. Energetický náklad je nižší než při štěpení zásadami. K obohacení bílkovinami dochází bez úbytku těchto látek a bez použití velkých množství neutralizačních solí.

Vodná fáze, oddělená od pevného buněčného materiálu, obsahuje kromě jiných ve vodě rozpustných součástí nukleové kyseliny, které je možno získat známými postupy, například srážením v kyselém prostředí, ultrafiltrací, dialýzou nebo enzymatickým zpracováním.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady:

Příklad 1

Methylomonas clara ATCC 31226 se pěstuje v živném prostředí s obsahem methanolu jako jediného zdroje uhlíku, amoniaku jako jediného zdroje dusíku, fosfátů a solí železa a hořčíku a dalších běžných stopových prvků za aerobních podmínek. Takto získaná bakteriální buněčná hmota se z roztoku oddělí a suší se rozprašováním.

100 g této buněčné hmoty se smísí se 300 gramy methanolu. Za stálého míchání suspenze se přivádí a rozpustí 10 g plynného amoniaku. Za přivodu amoniaku se udržuje chlazením teplota 25 až 35°C . Směs methanolu, amoniaku a buněčné hmoty se pak míchá 30 minut při 20°C .

K oddělení pevné a kapalně fáze se směs zfiltruje a pevný podíl se promyje 300 ml methanolu. Po nové filtraci se oba filtráty slíjí. Tento hnědý roztok obsahuje lipidy výchozího materiálu. Methanol a amoniak se odstraní vakuovou destilací při tlaku 1330 Pa a teplotě 40°C . Zbytek, který obsahuje $9,5\%$ hmotnostních výchozího buněčného materiálu, je tmavě hnědá páchnoucí pasta, sestávající z volných mastných kyselin, glyceridů, fosfolipidů a sekundárních metabolitů.

Pevný podíl extrahované buněčné hmoty získaný filtrací se suší 5 hodin za sníženého tlaku 1330 Pa a při teplotě 40°C . Získá se 90 g tuku prosté buněčné hmoty bez zá-

pachu, světlé barvy, světlejší než výchozí materiál.

Ke snížení obsahu nukleových kyselin se tato buněčná hmota uvede v suspenzi v 900 ml vody. Hodnota pH homogenizované míchané suspenze je 6,9.

Po zvýšení teploty na 55 °C se směs míchá ještě 20 minut, pak se zchladí na 30 °C a odstředěním rozdělí na pevnou a kapalnou fázi. Získaný sediment se znovu smísí s 900 ml vody a míchá se 10 minut při 20 °C. Pak se směs znovu odstředí a sediment se usuší za sníženého tlaku.

Výtěžek je 65 g. Obsah nukleových kyselin byl snížen z původních 11,2 % na 1,5 procenta. Produkt v sušeném stavu je bez zápachu, po zvlhčení vodou má příjemnou vůni.

Příklad 2

Výchozím materiálem byla tatáž bakteriální buněčná hmota jako v příkladu 1. Tato hmota byla zpracována stejným postupem a za stejných podmínek s tím rozdílem, že místo plynného amoniaku bylo užito 30 ml koncentrovaného NH_4OH (33 %).

Příklad 3

Postup byl prováděn stejně jako v příkladu 2 s tím rozdílem, že bylo užito 60 ml koncentrovaného NH_4OH (33 %).

Příklad 4

Postup byl prováděn stejně jako v příkladu 2 s tím rozdílem, že jako rozpouštědlo byl užit místo methanolu ethanol.

Příklad 5

Postup byl prováděn stejným způsobem jako v příkladu 3 s tím rozdílem, že jako rozpouštědlo byl místo methanolu užit glykolmonomethylether.

Příklad 6

Postup byl prováděn stejným způsobem jako v příkladu 2 s tím rozdílem, že jako rozpouštědla byl místo methanolu užit isopropanol.

Příklad 7

Jako výchozí materiál byla užita buněčná hmota z *Methylobacterium clara* jako v příkladu 1. 100 g produktu sušeného rozstříkáním se stejně jako v příkladu 1 štěpí a zbaví tuku při použití 15 g plynného amoniaku. Takto získaný produkt se však úplně nesuší, kdežto důkladně odsátý filtrační koláč s obsahem plynných látek 85 % se uvede v suspenzi v 900 ml vody. Hodnota pH je 8,9 vzhledem k tomu, že vlhká biologická hmota obsahovala ještě amoniak.

Teplota suspenze se za stálého míchání zvýší na 65 °C a po 5 minutách se hodnota pH upraví přidáním kyseliny chlorovodíkové na 7,2. Směs se míchá ještě 15 minut při teplotě 65 °C, pak se zchladí na 40 °C a odstředí. Získaný sediment se usuší.

Příklad 8

Kmen kvasinek *Candida lipolytica* ATCC 20383 schopný využívat uhlovodíky se pěstuje na nasycených uhlovodících s přímým řetězcem za přítomnosti vodného živného prostředí a plynu s obsahem kyslíku. Kvasinková hmota se od živného roztoku oddělí a usuší.

100 g sušených kvasinkových buněk se uvede v suspenzi při teplotě místnosti a za atmosférického tlaku ve 300 g methanolu a do této směsi se v průběhu 15 minut přivede 10 g plynného amoniaku. Při přidávání se udržuje teplota suspenze chlazením na 15 °C. Po přívodu plynu se směs ještě 20 minut míchá při teplotě 22 °C a pak se zfiltruje na odsávací fritě. Filtrační koláč se na fritě promyje 300 ml methanolu a směs se znovu zfiltruje za odsávání. Oba filtráty se slíjí. Roztok je žlutý a obsahuje lipidy původního buněčného materiálu. Methanol a plynný amoniak se odstraní za sníženého tlaku 186,2 Pa.

Po druhé filtraci se produkt, sestávající z rozrušených a tuku zbavených buněk mikroorganismu suší ve vakuové sušičce při teplotě 40 °C a tlaku 1330 Pa 5 hodin. Takto získaný produkt má světlejší barvu než původní kvasinková hmota a je bez zápachu.

Ke snížení obsahu nukleových kyselin z původních 7,5 % hmotnostních, vztaženo na výchozí materiál, se 100 g tuku zbavených a sušených kvasinek uvede v suspenzi v roztoku 1 litru destilované vody a 1000 ml methanolu. Za stálého míchání se nastaví pH směsi z původního pH na hodnotu 6,8 a během 15 min. se zahřeje na 50 °C, načež se rozdělí odstředěním na sediment, který obsahuje kvasinkovou bílkovinu a na kapalnou fázi, která obsahuje rozpustné nukleové kyseliny. Sediment se po několikanásobném promytí při teplotě místnosti lyofilizuje.

Obsah nukleových kyselin v sušeném materiálu byl snížen z původní hodnoty 7,5 % hmotnostních na 0,4 % hmotnostního.

Příklad 9

Postupuje se stejně jako v příkladu 8 s tím rozdílem, že se místo methanolu užije ethanol a místo 10 g plynného amoniaku se užije 60 ml 33% roztoku amoniaku.

Příklad 10

Penicillium chrysogenum ATCC 10238 se pěstuje v živném roztoku s obsahem laktózy, kapalného kukuřičného výluhu, fosfátu, uhličitanu a síranu hořečnatého běžným

způsobem za aerobních podmínek. Po oddělení vzniklého penicilinu zbývá mycelium, které je po usušení výchozí látkou.

Zpracování výchozího materiálu se provádí způsobem podle příkladu 8, s tím rozdílem, že se místo plynného amoniaku užije 33% roztok amoniaku. Sušené mycelium zbavené tuku se promyje vodou při 30 °C.

Příklad 11

Výchozí látkou je stejná buněčná směs jako v příkladu 10. Postup se provádí stejným způsobem, místo methanolu se však užije ethanol a při extrakci vodou se teplota zvýší na 85 °C a na této teplotě se udržuje 15 minut.

Výsledky z příkladů 1 až 11 jsou uvedeny v následujících tabulkách 1 a 2.

TABULKA 1

Odstranění lipidů

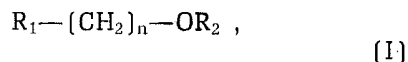
Příklad	100 g buněčné hmoty Druh	Tuky % hmot.	Nukleové kyseliny % hmot.	Rozpouštědlo 300 g	NH ₃ [g] nebo 33% NH ₄ OH [ml]
1	Methylomonas	7	11,2	methanol	NH ₃ 10
2	Methylomonas	7	11,2	methanol	NH ₄ OH 30
3	Methylomonas	7	11,2	methanol	NH ₄ OH 60
4	Methylomonas	7	11,2	ethanol	NH ₄ OH 30
5	Methylomonas	7	11,2	glykolmonomethyl- ether	NH ₄ OH 60
6	Methylomonas	7	11,2	i-propanol	NH ₄ OH 30
7	Methylomonas	9,6	15,4	methanol	NH ₃ 15
8	Candida lipolytica	8,2	7,5	methanol	NH ₃ 10
9	Candida lipolytica	8,2	7,5	ethanol	NH ₄ OH 60
10	sušené mycelium	3,5	2,6	methanol	NH ₄ OH 30
11	sušené mycelium	3,5	2,6	ethanol	NH ₄ OH 30

TABULKA 2

Příklad	Promývací voda			Získaná buněčná hmota		
	množství (litr)	pH	teplota (°C)	množství (g)	tuky (% hmot.)	nukleové kyseliny (% hmot.)
1	0,9	6,9	55	68	0,8	1,5
2	0,9	6,9	60	67	1,3	1,2
3	0,9	7,0	65	63	2,0	1,1
4	0,9	6,9	50	67	2,2	1,5
5	0,9	7,1	55	63	2,8	2,3
6	0,9	7,0	60	64	3,4	4,0
7	0,9	7,2	65	62	1,2	1,4
8	0,8	6,8	50	68	1,4	0,4
9	0,8	6,5	45	67	1,8	0,7
10	0,9	6,5	30	78	1,1	0,5
11	0,9	6,5	85	79	1,3	0,8

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob snížení obsahu lipidů a nukleových kyselin v mikrobiální buněčné hmotě, vyznačující se tím, že se buněčná hmota extrahuje směsí amoniaku nebo hydroxidu amonného v organickém rozpouštědle obecného vzorce I



kde

R_1 a R_2 znamená atom vodíku a

n znamená celé číslo 1, 2 nebo 3 nebo

R_1 znamená hydroxyskupinu a

R_2 znamená atom vodíku, methyl nebo ethyl, a

n znamená celé číslo 2 nebo 3,

přičemž celkový obsah vody činí 0 až 30 % hmotnostních a obsah amoniaku 1 až 10 % hmotnostních, vztaženo na celkovou hmotnost rozpouštědla, a po oddělení buněčné hmoty z extrakční směsi se buněčná hmota promyje vodou, vodná fáze se oddělí a po případné extrakci organickým rozpouště-

dlem obecného vzorce I se buněčná hmota usuší.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že celkový obsah vody v průběhu štěpení je 0 až 20 % hmotnostních, zejména 0 až 10 % hmotnostních, vztaženo na množství užitého rozpouštědla.

3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že obsah plynného amoniaku v průběhu štěpení je 2 až 8 % hmotnostních, zvláště 3 až 5 % hmotnostních, vztaženo na množství užitého rozpouštědla.

4. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že se jako organické rozpouštědlo užije methanol, ethanol, glykolmonomethyl-ether nebo isopropanol.

5. Způsob podle bodů 1 až 4, vyznačující se tím, že se užije hmotnostního poměru buněčné hmoty a rozpouštědla v rozmezí 1:3 až 1:6 při použití methanolu nebo ethanolu a v rozmezí 1:8 až 1:12 při použití propanolu, glykolu a monoglykolethe-ru.