



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

225 684

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 10 06 81
(21) PV 4337-81

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/06

(40) Zveřejněno 25 06 82
(45) Vydáno 01 07 85

(75)
Autor vynálezu

ŠILLINGER VLADIMÍR ing., PRAHA, GRIGORJAN ALFRED N. CSc., MOSKVA (SSSR)
FENCL ZDENĚK RNDr. DrSc., PRAHA (ČSSR), KOVALEV ANDREJ P., ing., MOSKVA (SSSR),
MACHEK FRANTIŠEK ing. CSc., PRAHA (ČSSR), LALOV VITALIJ V., CSc., LUŠČIK
TATJANA A. CSc., MOSKVA, (SSSR)

(54) Způsob uvolňování nativních frakcí z jednobuněčných mikroorganismů mechanickou dezintegrací

1

Vynález se týká způsobu uvolňování nativních frakcí z jednobuněčných mikroorganismů mechanickou dezintegrací, a to za účelem izolace jednotlivých frakcí nebo jejich směsí.

Např. při přípravě koncentrátů potravinářského proteinu z mikroorganismů je nutno uvolnit vnitrobuněčný protein rozrušením buněčné stěny, a to buď mechanickým, biochemickým nebo chemickým způsobem. Využívá se přitom účinku celulolytických enzymů nebo hydrolysy v silně kyselém či alkalickém prostředí, což však působí destruktivně na nativní bílkovinu. Alkalická hydrolysa umožňuje např. vznik toxických složených aminokyselin /lyzinoalaninu/, případně racemizovaných aminokyselin, čímž se hodnota bílkoviny z potravinářského hlediska podstatně snižuje.

Na enzymové rozrušení buňky je nutno předem připravit potřebné lytické enzymy či směs enzymů; vlastní proces je tak časově náročný a tedy i nevýhodný vzhledem k tomu, že izolace jednotlivých enzymů je nákladná a vesměs jsou přítomny i proteázy, které mohou štěpit bílkoviny / Vršanská M., Biely P. und Krátký Z.: Zechr. Allg. Mikr. 17, 465, 1977; Funatsu M., Aizono O.H. and Shinioda T.: Agr. Biol. Chem. 42, 1975, 1978/. Přestože v oboru enzymové degradace buněčných stěn bylo v posledním desetiletí patentováno několik postupů, tento způsob se v průmyslovém měřítku dosud nevyužívá /brit. patent č. 1, 281.618 /1972/, japonský patent č. 56.682 /1978/).

Použití mechanických způsobů rozrušení buněčných stěn umožní získat protein, vhodný

pro potravinářské účely (aut. osv. ČSSR Nr. 161299). Kromě toho odpadů při takové výrobě je možno využít k izolaci jiných, z biologického hlediska cenných komponent buněk, např. ergosterolu.

Z mechanických způsobů rozrušování buněk se jeví jako nej přijatelnější metoda extrusivní, balotinová dezintegrace a rozrušování cestou rychlé dekomprese.

Extrusivní dezintegrace je založena na protlačování suspenze buněk z oblasti vysokého tlaku přes mikro-štěrbinu dezintegračního zařízení do oblasti normálního tlaku. Základními faktory, podmiňujícími dezintegraci buněk, jsou - hodnota hydrostatického tlaku, její gradient a rychlost změny tlaku.

Ze zařízení na dezintegraci, ve kterých se využívá tohoto způsobu, jsou nejznámější hydraulické vysokotlaké homogenizátory firmy "Gaulin" (USA) ("Gaulin Technical Bulletin", 1968, 7; Hetherington P.J. et al. "Trans. Inst. Chem. Engrs.", 1971, 49, 2, 142). Proces rozrušování buněk v extrusivních homogenizátorech je charakterizován vysokými hodnotami pracovního tlaku (50 až 80 MPa) a poměrně nevysokou produktivitou (50 až 200 l.hod⁻¹). Pro získání vysokého stupně rozrušení buněk (80 až 90%) je třeba několikrát opakovat pracovní cyklus, což vede k získání fragmentů buněk nestejné velikosti a k potížím při dělení pevné a kapalně fáze získané suspenze; kromě toho vyšší teplota jako následek opakované komprese může působit částečnou nebo úplnou inaktivaci intracelulárních složek. Na podobném principu pracuje i upravené vysokotlaké čerpadlo (Brookman J.S., Davies M. "Biotechnol. Bioeng." 1973, 15, 693), s produktivitou suspenze 15 l.hod⁻¹ při pracovním tlaku do 310 MPa.

Při použití balotinových dezintegrátorů je možné v průmyslovém měřítku při kontinuální technologii dosáhnout libovolného žádaného stupně rozrušení buněk, ovšem při odpovídajícím prodloužení doby zpracování materiálu. Nedostatky tohoto způsobu jsou lokální přehřívání zpracovávané látky, což nutně vyžaduje intenzivní chlazení; opakované drcení již získaných buněčných fragmentů s vytvářením příliš drobných částic (od jednotek do setin mikrometru) navíc značně komplikuje následující rozdělení pevné a kapalně fáze. Toto vše dohromady, tj. zvýšená spotřeba vody na chlazení elektrické energie, delší doba zpracování biomasy prodražuje proces a odráží se na konečné ceně produktu.

Je znám rovněž způsob a zařízení kontinuální dezintegrace s využitím efektu dekomprese (aut. osv. SSSR Nr. 477742 /1973/; aut. osv. SSSR Nr. 492118 /1973/; aut. osv. SSSR Nr. 602550 /1974/; aut. osv. SSSR Nr. 602551 /1975/; patent USA Nr. 4084757; Franc.patent Nr. 7624795), jehož funkce spočívá na principu rychlé dekomprese. Suspenze mikroorganizmů je sycena plynem pod tlakem (dusíkem, vzduchem, kys. uhlíčitým), který nesmí reagovat s intracelulárními komponentami a také, nesmí inhibovat enzymy, zvláště endofenní nukleázu využitelnou pro degradaci nukleových kyselin v mikrobiální bílkovině. Přitom se plynem sytí i buňky až do vyrovnání parciálního tlaku z obou stran buněčné stěny, načež se suspenze náhle převede na úroveň atmosferického tlaku. Výsledkem je gradient tlaku plynu v buňce, směřovaný do vnějšího prostředí. Jelikož rychlost úniku plynu z buňky je vyšší než rychlost difuze buněčnou stěnou, dochází k roztržení stěny.

Dezintegrace způsobem rychlé dekomprese probíhá v zařízení, jehož podstatou je kom-

presor plynu, vysokotlaké dávkovací čerpadlo suspenze mikroorganismů a dva vysokotlakové válce na sycení a převádění suspenze. Nesporná výhoda dekompresní dezintegrace spočívá v tom, že buňky resp. buněčné stěny zůstávají po dezintegraci celé nebo vykazují jen malý stupeň rozdrčení a lze je tudíž snadno oddělit separací od protoplazmy.

Popsaný postup nevede k inaktivaci intracelulárních enzymů a umožňuje izolovat chemické komponenty buňky v nativním stavu. Energetická spotřeba při dekompresní dezintegraci je nízká a činí $0,06 \text{ kWh} \cdot \text{kg}^{-1}$, zatímco při extrusivním nebo balotinovém rozdrčení buně ke spotřebuje $0,2$ až $0,4 \text{ kWh} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Proces dekompresní dezintegrace sám o sobě však nezabezpečuje dostatečně vysoký stupeň uvolnění vnitrobuněčných komponent do vnějšího prostředí a protože je podstatně ovlivněn hodnotou pH zpracovávané suspenze, je třeba postup doplnit extrakcí biomasy dezintegrovanych buněk.

Toto je dokumentováno v Tab. č. 1, kde je udána hodnota pH suspenze kvasinek *Sacharomyces cerevisiae* v závislosti na uvolňování ve vodě rozpustných bílkovin do mimobuněčného prostředí (supernatantu) z buněk narušených dekompresním způsobem. Pro srovnání jsou uvedeny hodnoty pro jedno a šestinásobnou dezintegraci.

Množství vodorozpustné bílkoviny v neporušené buňce činí 20 % z celkového obsahu proteinu ($N \times 6,25$).

Tabulka 1.

Vliv hodnoty pH na stupeň extrakce vodorozpustné bílkoviny z buněk kvasinek *Sacharomyces cerevisiae*, rozrušených dekompresí.

hodnota pH	Stupeň extrakce vodorozpustné bílkoviny v %	
	jednonásob. dezintegrace	šestinásob. dezintegrace
4,5	8,0	51,0
7,0	12,0	68,3
9,0	18,1	96,5
11,0	24,9	124,0

Jak je zřejmé z tabulky, prakticky celé množství ve vodě rozpustné bílkoviny se uvolňuje z dezintegrovanych buněk jenom při $\text{pH} = 9,0$. Stupeň extrakce při $\text{pH} = 11,0$, převyšující 100% lze vysvětlit dodatečným rozpuštěním frakcí proteinu, rozpustných v alkáliích. Destrukční působení dekomprese na stěnu buňky trvá setiny sekundy. Poté buňka již není mechanicky namáhána, takže z ní vyteče jen část protoplazmy, obsahující protein. Při opakovaném dekompresním působení do mezibuněčného prostoru přechází další část bílkoviny, jejíž množství závisí na pH vnějšího prostředí a počtu dezintegrací. Buněčná stěna se však již více nenarušuje. Existuje tak proporcionalita mezi množstvím bílkoviny, uvolněným z buňky, a počtem jednotlivých operací dezintegrace, a rovněž hodnotou pH suspenze.

Nevýhodou tohoto způsobu je nízký výtěžek bílkovin z dezintegrace suspenzí při pH

okolo 7,0, eventuelně nutnost používání vyšších pH pro rychlejší uvolňování až extrakci bílkovin z narušených buněk a dále okolnost, že aktivní nukleáza potřebná pro degradaci nukleových kyselin se uvolňuje v menší míře než při dezintegraci balotinovými dezintegrátory.

Uvedené nevýhody odstraňuje předmět vynálezu, jehož podstatou je, že se mikrobiální suspenze o koncentraci 1 až 20 % hmotnostních při pH 4,5 až 9,5 a za teploty 0 až 70 °C nejprve podrobí dezintegraci dekompresí s pracovním přetlakem 3 až 30 MPa, načež se před drcením suspenze zpracovává mechanickým drcením a uvolněné nativní frakce se izolují obecně známým způsobem.

Cílem vynálezu je izolace intracelulárních chemických komponent v nativním stavu biomasy mikroorganismů za kratší dobu a při nižší spotřebě energie s vysokým výtěžkem a získání suspenze, obsahující dostatečně velké buněčné fragmenty, jejichž izolace na standardních separátorech nedělá potíže.

Toho se dosahuje použitím kombinované mechanické dezintegrace, kdy suspenze buněk mikroorganismů je jedenkrát nebo i vícekrát dezintegrována dekompresí při teplotě 0 až 70 °C, pH = 4,5 až 9,5, pracovním tlaku v systému 3 až 30 MPa, a poté zpracována v balotinovém dezintegrátoru, obsahujícím balotiny, (sypný objem balotiny je k objemu suspenze s výhodou v poměru 1,7 : 1).

Přitom mohou být podrobeny dezintegraci kvasinky např. rodu *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida torulopsis*, *Rhodotorula*, *Ovidium*, *Pichia*, *Hansenula*, bakterie rodu *Megaterium*, *Meditanomonas*, *Escherichia coli*, plísně a řasy.

Navrhovaný způsob spočívá v následujícím:

Izolace nativních frakcí z jednobuněčných mikroorganismů se provádí z jejich vodní suspenze s koncentrací buněk 1 až 20 % hmotností o teplotě 0 až 70 °C a pH = 4,5 až 9,5. Suspenze je zpracována jednou nebo několikrát v periodickém nebo kontinuálním dezintegrátoru. Jako pracovní plyn je používán vzduch, dusík nebo jakýkoliv jiný plyn chemicky inertní ve vztahu k buňkám. Do suspenze je přiváděn stlačený vzduch protlakem 3 až 30 MPa, je udržována pod tlakem 15 až 60 sek. a převedena do oblasti barometrického tlaku. Přitom probíhá dekompresní dezintegrace buněk mikroorganismů.

Dále je suspenze zpracovávána v balotinovém dezintegrátoru, obsahujícím balotiny o průměru 0,40 až 0,60 mm s výhodou při poměru sypného objemu suchých balotin k objemu suspenze buněk 1,7 : 1. Přitom za 5 až 10 min. dezintegrace přechází do roztoku 80 až 95 % ve vodě rozpustných buněčných frakcí v nativním stavu, které jsou izolovány a čištěny známými metodami.

Níže jsou uvedeny příklady využití způsobu dezintegrace pro izolaci nativní bílkoviny z buněk mikroorganismů podle vynálezu.

Příklad 1

Vodní suspenze kvasinek *Sacharomyces cerevisiae* s koncentrací buněk 9,8 hmotnostních % o teplotě 20 °C a pH = 8,4 byla jednorázově zpracována v laboratorním dekompresním dezintegrátoru s periodickým působením, sestávajícím z cylindrické komory - měniče vysokého tlaku o pracovním obsahu 35 ml, opatřené uzavíracím ventilem, z cyklonu-expanderu a

sběrné nádoby. Suspenze byla vpravena do komory, nasycena stlačeným dusíkem pod přetlakem 9 až 10 MPa, a po 25 sek. syčení plynem vystřelována přes uzavírací ventil do cyklonu-expanderu. Dezintegrovaná suspenze buněk byla jímána do sběrné nádoby a dále zpracována v jednodiskovém balotinovém vertikálním dezintegrátoru s rychlostí otáček disku 180 m-sek.⁻¹ a skleněnými balotinami o průměru 0,40 až 0,56 mm; poměr objemu suspenze sypného objemu suchých kuliček v dezintegrátoru činil 1 : 1,7. Efektivnost dezintegrace byla hodnocena dle rychlosti uvolňování vodorozpustné bílkoviny do mezibuněčného prostředí.

Pro srovnání byl prováděn pokus, ve kterém byla biomasa zpracovávána jenom v balotinovém dezintegrátoru.

Graf na obr. 1 znázorňuje výsledky dezintegrace na balotinovém mlýnu ve srovnání s postupem podle vynálezu v závislosti na čase. Křivka č. 1 zachycuje průběh kombinovaného drcení podle vynálezu s jedním předdrcením, křivka č. 2 s dvěma předdrceními a křivka č. 3 bez předdrcení.

(VRB = vodorozpustné bílkoviny a AKS = absolutní kvasničná sušina).

Jak je zřejmé z obr. 1, v pokuse s předběžnou dekompresní dezintegrací prakticky celá vodorozpustná bílkovina přechází do roztoku během 5 minut balotinové dezintegrace; při balotinové dezintegraci bez předběžného dekompresního zpracování je pro uvolnění téhož množství bílkoviny zapotřebí 24 min. Tak předběžná dekompresní dezintegrace umožňuje zkrátit dobu balotinové dezintegrace na 21 %.

Příklad 2

Pokus byl prováděn v téže suspenzi a v těchže podmínkách jako v Příkladě 1, ale předběžná dekompresní dezintegrace byla prováděna dvourázově. Časový průběh pokusu a výtěžnost jsou vyjádřeny křivkou č. 2 na obr. 1.

Příklad 3

Vodní suspenze *Sacharomyces cerevisiae* s koncentrací buněk 15 % hmotnostních o teplotě 50 °C a pH 7,5 byla jednorázově zpracována v dekompresním dezintegrátoru při tlaku 19 až 20 MPa. Ostatní podmínky jsou stejné jako v příkladu 1. Výtěžnost bílkoviny za totéž časové období činí 16 % na sušinu kvasinek (jako v příkladu 1).

Příklad 4

Místo suspenze kvasinek *Sacharomyces cerevisiae* byla dezintegrací podrobena suspenze bakterií *Methanomonas*. Podmínky dezintegrace byly stejné jako v příkladu 1. Výtěžnost bílkoviny za totéž časové období činila 19 % na sušinu bakterií.

Způsobu dezintegrace jednobuněčných mikroorganismů podle vynálezu lze používat v případech, kdy je zapotřebí efektivní dělení pevné a kapalně fáze vytvořené suspenze rozrušených buněk ve standardních odstředivkách nebo separátorech nebo izolovat v nativním stavu intracelulární chemické komponenty, které se deaktivují při vyšší teplotě či v příliš kyselém nebo alkalickém prostředí. Způsobu může být použito např. při získání potravinářských bílkovinných látek z biomasy jednobuněčných mikroorganismů, když současně s bílkovinami je nutno izolovat v aktivním stavu intracelulární nukleázy, využívané pro snížení obsahu nukleových kyselin v získaném produktu.

Využití navrhovaného způsobu ukazuje, že doba zpracování buněk v balotinovém dezinte-

grátoru se zkracuje 4 až 5 krát, jestliže suspenze byla předběžně podrobena dekompresní dezintegraci. Přitom se významně snižuje stupeň ohřevu suspenze, což přispívá ke zvýšení produktivity balotinového dezintegrátoru, úspoře chladicí vody a energie.

V případě izolace jakýchkoli termolabilních frakcí buněčného obsahu zvyšuje se jejich výtěžnost a uchovává aktivita. Použití způsobu podle vynálezu umožňuje izolovat buněčné enzymy v aktivním stavu, anpř. intracelulární nukleázu a dále ji využít na rozrušení nukleových kyselin, nacházejících se v buňkách mikroorganismů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob uvolňování nativních frakcí z jednobuněčných mikroorganismů mechanickou dezintegrací vyznačený tím, že se mikrobiální suspenze o koncentraci 1 až 20 % hmotnostních, při pH 4,5 až 9,5 a za teploty 0 až 70. °C nejprve podrobí dezintegraci dekompresí s pracovním přetlakem 3 až 30 MPa, načež se předdrcená suspenze zpracovává mechanickým drcením a uvolněné nativní frakce se izolují obecně známým způsobem.
2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že se mikrobiální suspenze podrobí dezintegraci dekompresní nejméně dvakrát.

1 výkres

