



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

267 134

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/18

(21) PV 8938-87.G

(22) Přihlášeno 08 12 87

(40) Zveřejněno 12 05 89

(45) Vydáno 27.7.1990

(75)
Autor vynálezu

PÁSKOVÁ JIŘINA ing. CSc.,
ŠPAČEK BOHUMIL ing. CSc.,
HRADEC VLADIMÍR ing., PRAHA

(54)

Způsob zpracování kvasničné biomasy na buněčný
koncentrát k izolaci ergosterolu

(57) Řešení spadá do oblasti biotechnologie s využitím prvního produktu - ergosterolu ve farmaceutickém průmyslu a druhého produktu - kvasničného autolyzátu - kvasničného extraktu v potravinářském průmyslu. Předmětem řešení je způsob získání dalšího produktu z kvasničné biomasy - kvasničného extraktu vedle doposud vyráběného ergosterolu působením etylalkoholu nebo octanu etylnatého, které vyvolávají plasmolýzu buněk a urychlují enzymatický rozklad buněčných proteinů a dalších makromolekul. Výhoda postupu spočívá v tom, že se získá buněčný extrakt bez předchozího mechanického drcení buněk a na rozdíl od autolýzy buněk zůstává ergosterol pevně vázán na buněčné struktury. Suspenze kvasničných buněk se napřed inkubuje po dobu 2 až 6 hodin ve směsi s etylalkoholem nebo s octanem etylnatým při teplotě okolo 50 °C, pak se oddělí tekutý podíl od extrahovaných buněk centrifugací nebo filtrací, z kapalného podílu se napřed oddestiluje organické činidlo a buněčný extrakt se zahustí na odparce nebo usuší. Ve zbylém pevném podílu za těchto podmínek zůstává veškerý ergosterol ve vazbě s buněčnými strukturami. Ergosterol se pak izoluje obvyklým postupem.

Vynález se týká zpracování kvasničné biomasy na buněčný koncentrát k izolaci ergosterolu pro farmaceutické účely a současně na kvasničný extrakt pro použití v potravinářském průmyslu jako chuťový a nutriční doplněk potravinářských výrobků.

V ČSSR se již asi 40 let vyrábí pro farmaceutické účely především na export do nesocialistických zemí protikřivíčný vitamin D_2 - kalciferol z ergosterolu, který se do roku 1987 převážně dovážel z Japonska nebo z NSR a jen v omezené míře se vyráběl z tuzemského pekařského droždí. Výrobní postup pro izolaci ergosterolu v zahraničí nám není znám, protože je výrobním tajemstvím a není publikován. V ČSSR se ergosterol vyrábí od počátku roku 1988 výhradně z tuzemského pekařského droždí v ročním objemu 4 až 5 tun tím způsobem, že se suspenze kvasničných buněk napřed hydrolyzuje varem s louhem sodným nebo draselným, aby se zmýdelnil lipidický podíl buněčné sušiny. Nezmydlitelný podíl, který obsahuje uvolněný ergosterol, se extrahuje nepolárními rozpouštědly a dále čistí až na krystalický ergosterol. Zbytek sušiny kvasničné biomasy, který se skládá převážně z denaturovaných proteinů a polysacharidů buněčných stěn a představuje asi 98 až 99 % hmot. sušiny kvasničné biomasy, je odváděn jako nevyužitelný odpad do čistírny odpadních vod. Při tom zejména produkty enzymatického štěpení proteinů - peptidy a aminokyseliny jsou komerčně využitelnou substancí, která se používá jako chuťový a nutriční doplněk při výrobě sušených polévek, omáček a celé řady dalších potravinářských produktů. Potřeba sušeného kvasničného extraktu pro tento účel je takřka výhradně kryta dovozem z nesocialistických zemí.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že při zpracování kvasničné biomasy na ergosterolový koncentrát jsou současně využity proteinové složky biomasy k výrobě kvasničného extraktu bez nutnosti napřed mechanicky drtit kvasničné buňky, a to s použitím efektu plazmolýzy buněk.

Suspenze kvasničných buněk o obsahu sušiny 10 až 20 % hmot. se inkubuje po dobu 2 až 8 hodin při teplotě 35 až 55°C ve směsi s látkami, které mění osmotický tlak vnějšího prostředí buněk, a způsobují tak plazmolýzu buněk, jako je například octan etylnatý nebo etylalkohol. Přitom čím je vyšší reakční teplota nebo čím je vyšší koncentrace plazmolyzačního činidla, tím je reakční doba kratší. Působením octanu etylnatého nebo etylalkoholu na suspenzi kvasničných buněk v množství 3 až 8 litrů plazmolyzačního agens na 100 litrů kvasničné suspenze dojde k oddělení plazmatické membrány od buněčné stěny a následkem snížení obsahu vnitrobuněčné vody se objem buněk podstatně zmenší. Vnitřní buněčný obsah se svraští, přičemž dojde k dezorganizaci a destrukci vnitřních buněčných struktur a zahájí se desolubilizační činnost vnitrobuněčných enzymů. Přitom spolu s odcházející vnitrobuněčnou vodou difundují buněčnou stěnou do vnějšího prostředí i menší molekuly, vznikající enzymatickou degradací molekul proteinů, nukleoproteinů, lipoproteinů, molekuly vitaminů skupiny B, ionty minerálních solí a ve vodě rozpustné štěpy dalších enzymaticky přeměněných látek. Nepřesáhne-li inkubační doba optimální hodnotu 3 až 5 hodin při teplotě 50°C, zůstává ergosterol pevně vázán na membránové struktury plazmolyzovaných buněk, kdežto více než polovina veškerých dusíkatých látek a více než jedna třetina sušiny kvasničné biomasy se enzymaticky přemění na ve vodě rozpustné štěpy, které prōdifundují buněčnou stěnou do vnějšího prostředí buněk. Prodloužením inkubační doby přes optimální hodnotu dochází k enzymatickému rozrušení buněčných membránových struktur a ergosterol se uvolňuje do vnějšího prostředí - extraktu, který se zakaluje a získává nepříjemné senzorické vlastnosti. Plazmolyzované buňky se pak odseparují centrifugací nebo filtrací a vzniká buněčný substrát se zkoncentrovaným obsahem ergosterolu, vhodný jako surovina pro zpracování na ergosterol.

Čirý filtrát, který obsahuje enzymatické štěpy buněčných makromolekul, může být po oddestilování plazmolyzačního agens zahuštěn nebo usušen na kvasničný extrakt příjemné masové vůně a chuti pro použití v potravinářském průmyslu.

Výhodou vynálezu je možnost získat další cenný produkt - kvasničný extrakt z biomasy vedle ergosterolu, bez nutnosti mechanického rozdrcení kvasničných buněk.

Příklad 1

Suspense buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* o obsahu sušiny 15 % hmot. a s obsahem dusíku v přepočtu na hrubý protein 57,6 g proteinu v 100 g sušiny byla rozdělena do konických baněk po 100 ml, předeřáta na vodní lázni na teplotu 50°C a promíchána s 6 ml, 7 ml nebo 8 ml absolutního etylalkoholu. Jednotlivé baňky pak byly umístěny do vodní lázně a drženy při teplotě 50°C. Za 4,5 a 6 hodin po smíchání buněčné suspence a etylalkoholem byl u odebraných vzorků suspence oddělen buněčný podíl centrifugací a vážkovou metodou stanoveno množství sušiny extraktu po usušení do konstantní hmotnosti a Kjehldalovou metodou stanoven obsah dusíkatých látek v extraktu.

Tabulka

koncentrace etylalkoholu	hodin inkubace při 50°C	g extraktu ze 100 g sušiny biomasy	g hrubého proteinu ze 100 g sušiny biomasy
6 % obj.	4	23,5	33,3
	5	32,7	46,6
	6	39,8	53,3
7 % obj.	4	37,6	49,7
	5	41,3	58,2
	6	42,1	59,4
8 % obj.	4	36,7	55,5
	5	41,2	57,5
	6	40,7	56,0

Maximální výtěžek kvasničného extraktu byl v podmínkách pokusu docílen při inkubaci buněčné suspenze se 7 % obj. absolutního etylalkoholu při teplotě 50°C a době expozice 5 až 6 hodin.

Příklad 2

100 litrů kvasničného mléka pekařské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* D₇ (CCY 21-4-85) o obsahu 15 % hmot. sušiny biomasy, s obsahem 1,25 % hmot. ergosterolu v sušině a 42,4 % hmot. hrubého proteinu v sušině, bylo smíseno se 4 litry octanu etylnatého v nádobě z nerezavějící oceli, opatřené pomaloběžným míchadlem a zahřívacím vodním pláštěm. Směs byla zahřáta na 50°C a za mírného míchání inkubována po dobu 3 hodin. Pak byl oddělen centrifugací na průtokové odstředivce pevný podíl (plazmolizované buňky) od supernatantu (kvasničný extrakt). Získaný extrakt byl zahřátím na 80°C po dobu 5 minut zbaven většiny octanu etylnatého, smíchán s 2,8 kg chloridu sodného, sušen na rozprašovací sušárně, kde byla teplota na vstupu 250°C a na výstupu 85°C. Bylo získáno 9,35 kg sušeného práškového produktu žlutavě bílé barvy, dobře rozpustného ve vodě, příjemné masové vůně a chuti. Obsah dusíkatých látek, přepočtený na hrubý protein, byl 361 g v 1 kg práškového produktu. Buněčné zbytky po plazmolýze s octanem etylnatým obsahovaly 2,11 % hmot. ergosterolu v sušině.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob zpracování kvasničné biomasy na buněčný koncentrát k izolaci ergosterolu a na kvasničný extrakt pro použití v potravinářství účinkem etylalkoholu nebo octanu etylnatého, vyznačující se tím, že se vodní suspenze buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* inkubuje při teplotě 45 až 55°C buď 4 až 6 hodin ve směsi s 6 až 8 % obj. etylalkoholu, nebo po dobu 3 až 4 hodin ve směsi s 3 až 5 % obj. octanu etylnatého a pak se oddělí pevný buněčný podíl pro izolaci ergosterolu od čirého buněčného extraktu, který se zahustí nebo usuší.