



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

225 604

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 30 04 81
(21) PV 3202-81

(51) Int. Cl.³
A 23 J 1/18

(40) Zveřejněno 24 06 83
(45) Vydáno 01 07 85

(75)
Autor vynálezu RUT MILOSLAV ing., ŠTROS FRANTIŠEK ing. CSc., PRAHA
EDERER KAREL ing., ÚSTÍ NAD LABEM

(54) Způsob výroby kvasničného bílkovinného preparátu

1

Vynález se týká způsobu výroby kvasničného bílkovinného preparátu s nízkým obsahem nukleových kyselin, především způsobu kompenzace ztrát biomasy vznikajících při extrakci nukleových kyselin z kvasinek amoniakem.

Jedním ze základních požadavků na kvasničný bílkovinný preparát určený k použití v potravinářství je nízký obsah nukleových kyselin. Součástí nukleových kyselin jsou totiž purinové báze, které se v organismu odbourávají přes hypoxantin a xantin na kyselinu močovou. Primáti na rozdíl od jiných živočichů nemají enzym uratooxidázu, a proto u nich může dojít při vyšším používání nukleových kyselin ke zvýšení koncentrace kyseliny močové v moči a krvi. Kyselina močová se pak může vylučovat v kloubech, tkáni a v močovém traktu a vyvolávat řadu onemocnění. Klinicky stanovená maximální dávka nukleových kyselin v potravě je 2 g na den. Kvasinky obsahují v sušině obvykle 6 až 10 % nukleových kyselin a podíl kvasničných bílkovin s nesníženým obsahem nukleových kyselin v denní dávce potravin by byl omezen na 20 až 35 g.

Pro snižování obsahu nukleových kyselin v mikrobiální biomase byla navržena řada postupů, většinou na principu chemickém nebo enzymatickém. Z chemických metod je nejobvyklejší extrakce nukleotidů alkáliemi. Výhodná je především extrakce amoniakem, který při kultivacích mikroorganismů se používá jako dusíkatá živina a který může být vzhledem ke své těkavosti z výroby snadno odstraněn. USA patent č. 3 614 654 popisuje extrakci mikrobiálních buněk kapalným amoniakem při teplotě nižší než -33°C a při době styku kratší než 4 hodiny. Při postupu podle USA patentu č. 3 775 393 se kvasničný koncentrát obsahující 5 až 15 % sušiny

zalkalizuje čpavkovou vodou na pH 9,0 až 10,5 a extrahuje 5 až 10 minut při teplotě 90 až 120 °C. Podle patentu Velké Británie č. 1 400 691 se mikroorganismy vypěstované na uhlovodících extrahují nejprve organickým rozpouštědlem a potom hydroxidy alkalických kovů nebo amoniakem při pH 8,5 až 9,5 a při koncentraci činidel 0,01 až 0,1 N.

Velkou nevýhodou postupů snižování obsahu nukleových kyselin alkalickou extrakcí jsou vysoké ztráty buněčných složek včetně bílkovin, dosahující až 30 %. Postup podle čs. autorského osvědčení 188 575 navrhuje pro snížení těchto ztrát přidávat ke kvasinkovému koncentrátu zalkalizovanému amoniakem etanol a extrakt oddělený od opracované biomasy vracet do kultivace jako zdroj uhlíku a dusíku. Ztráty jsou při této metodě omezovány jednak zadržením vyššího podílu bílkovin v opracované biomase, jednak zvýšením výťažnosti při kultivaci stimulačním působením extraktu. Nevýhodou postupu však je, že nezajišťuje dokonalé oddělení štěpů nukleových kyselin od opracované biomasy a zhoršuje tak kvalitu konečného produktu. Zařadí-li se propírání extrahované biomasy vodou, stoupnou opět ztráty bílkovin a objem extraktu naroste natolik, že je nemožné vracet do kultivace veškerý odpad.

Uvedené nedostatky řeší způsob výroby kvasničného bílkovinného preparátu s nízkým obsahem nukleových kyselin extrakcí termolizovaných kvasinek amoniakem s vrácením extraktu do kultivace podle vynálezu, při němž se k přípravě kvasničného preparátu s nízkým obsahem nukleových kyselin použije 5 až 60 %, s výhodou 10 až 40 % biomasy produkované kultivací, přičemž úprava biomasy spočívá v tom, že se kvasinkový koncentrát obsahující 100 až 200 g.l⁻¹ kvasničné sušiny zahřeje na 5 až 60 minut na teplotu 60 až 90 °C, pak se k termolizátu přidá 5 až 30 g amoniaku na 100 g obsažené kvasničné sušiny, termolizát se udržuje po 20 až 60 minut při teplotě 40 až 85 °C, načež se opracovaná biomasa oddělí od extraktu, důkladně promyje vodou a usuší.

Spolu s amoniakálním extraktem se do kultivace vracejí i prací vody z promývání extrahované biomasy.

Upravený postup zajišťuje, že obsah nukleových kyselin ve vyrobeném bílkovinném preparátu nepřestoupí určenou maximální hranici /většinou 2 % hmot./, umožňuje vracet veškerý odpad z extrakce do kultivace a zajišťuje maximální využití stimulačního působení extraktu k kompenzaci ztrát vznikajících při opracování biomasy. Při vhodném poměru mezi výrobou potravinářského přípravku a celkovou produkcí biomasy mohou být tyto ztráty nejen plně kompenzovány, ale lze získat i určité množství kvasničné sušiny navíc.

Další výhodou je to, že nový postup je univerzálnější a není omezen jen na jedinou výchozí surovinu. K výrobě kvasničného bílkovinného preparátu lze použít kvasinky vypěstované aerobní kultivací na sacharidických surovinách, etanolu a dalších substrátech vyhovujících z potravinářského hlediska. Biomasa nezpracovávaná na potravinářský bílkovinný preparát se využije k jiným účelům např. jako krmné kvasnice, pekařské droždí, k izolaci enzymů apod.

Postup výroby bílkovinného preparátu podle vynálezu je objasněn v následujících příkladech.
Příklad 1

17 g kvasinkového koncentrátu se 16 % hmot. sušiny, získaného odstředěním zralého média z kultivace kvasinky *Torulopsis ethanolitolerans* RIFIS 235 na etanolu jako jediném zdroji uhlíku, se zahřálo na 90 °C, při této teplotě se koncentrát za míchání udržoval 15 minut, po ochlazení na 70 °C se k němu přidaly 3,3 l čpavkové vody /24 % hmot. NH₃/ a směs se

míchala dalších 30 minut. Po následujícím ochlazení se kvasinky oddělily od extraktu odstředěním. Kvasničná pasta se pak rozmíchala v 10 l vody, opět odstředila a získaná prací voda se spojila s extraktem. Výsledkem bylo 9,75 kg kvasničné pasty a 20 % sušiny a 20 kg supernatantu/ extrakt a promývací voda/. Opracované kvasinky obsahovaly v sušině 7,8 % dusíku, 2,5 % popela, 0,5 % nukleových kyselin a 48,1 % čistých bílkovin. Supernatant, který se použil v sérii kultivačních pokusů zaměřených na zjištění stimulačního působení amoniakálního extraktu na růst kvasinek a výtěžnost, obsahoval 4 % hmot. sušiny, 0,7 % popela a 2,7 % amoniakálního dusíku. Ztráty biomasy během extrakce nukleových kyselin byly 29,5 g sušiny ze 100 g výchozí sušiny kvasinek.

Příklad 2

Srovnávací přiživované vsádkové /fed-batch/ kultivace se prováděly v mechanicky míchaném skleněném laboratorním fermentoru s užitečným plněním 2,3 l, opatřeném automatickou regulací teploty, pH a pěny. Při 1 400 ot.min⁻¹ a průtoku vzduchu 1,2 VVM je v něm dosahován přenos kyslíku 150 mmol O₂-l⁻¹.h⁻¹.

Většina vody a minerální živiny se při všech pokusech přidávaly do fermentoru jednorázově na počátku kultivace. Pro předpokládaný přírůstek 44 g kvasničné sušiny se dávkovalo 44 ml roztoku obsahujícího v litru : 35 ml kyseliny fosforečné /85 % H₃PO₄/, 25 g hydroxidu draselného, 32 g síranu hořečnatého /7 H₂O /, 0,5 g síranu zinečnatého /7 H₂O/. Pro zajištění jednostranné regulace pH čpavkovou vodou a amoniakálním extraktem se k médiu na počátku kultivací přidávaly 2 g síranu amonného. Jako produkční mikroorganismus se používala *Torulopsis ethanolitolerans* RIFIS 231, počáteční koncentrace sušiny inokula 2 g.l⁻¹. Jako zdroj uhlíku se použil syntetický líh, který se do média dávkoval přístrojem měřícím koncentrací etanolu ve výdechu metodou tepelného zabarvení. Koncentrace etanolu v mediu se takto udržovala v rozmezí 1 až 2 g.l⁻¹. Při každém pokusu se do média nadávkovalo 50,8 g absolutního etanolu a po jeho spotřebování se kultivace ukončila. Kultivační teplota byla ve všech případech 35 °C a pH se udržovalo v rozmezí 3,9 až 4,1. Jednotlivé kultivace se lišily stupněm náhrady čpavkové vody, používané jako zdroj dusíku a k úpravě pH, amoniakálním extraktem. Používaná čpavková voda byla naředěna vodou tak, aby obsahovala stejnou koncentraci amonného dusíku jako amoniakální extrakt. Výsledky srovnávacích kultivací jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

| Zdroj dusíku | | | Vyrobená kvasničná sušina g | Vátěžnostní koeficient Y _{x/S} |
|---------------------|---------------|--------------|--------------------------------|--|
| čpavková voda ml | extrakt ml | náhrada % | | |
| 228 | 0 | 0 | 36,8 | 0,725 |
| 138 | 63 | 30 | 38,9 | 0,765 |
| 63 | 144 | 69 | 39,8 | 0,785 |
| 0 | 208 | 100 | 40,9 | 0,806 |

Z tabulky 1 je zřejmé, že náhrada čpavkové vody amoniakálním extraktem významně zvyšovala výtěžnostní koeficient. V tabulce 2 jsou pro větší názornost uvedeny hodnoty celkové produkce biomasy odpovídající postupné náhradě čpavkové vody amoniakálním extraktem, podíl produkováných kvasinek použitý pro výrobu potravinářského preparátu a kvasničná sušina vyprodukovaná navíc vlivem stimulačního působení amoniakálního extraktu. Při výpočtech se předpokládalo, že se na extrakci 100 g kvasničné sušiny použilo 26 g amoniaku /příklad 1/, že ztráty amoniaku v průběhu extrakce činí 10 %, že nově vyprodukovaná kvasničná biomasa bude obsahovat 9 % dusíku a že ve všech případech bude pro výrobu potravinářského preparátu použito 100 g biomasy.

Tabulka 2

| Náhrada čpavkové vody extraktem | Celková produkce sušiny biomasy | Podíl biomasy na potravinářský preparát z celkové prod. | Zvýšení celkové produkce biomasy vracením extraktu |
|---------------------------------|---------------------------------|---|--|
| % | g | % | g |
| 30 | 770 | 13,0 | 42,5 |
| 60 | 335 | 29,8 | 27,3 |
| 100 | 230 | 43,4 | 25,7 |

Z tabulky 2 je zřejmé, že za použitých podmínek extrakce /26 g NH_3 na 100 g kvasničné sušiny/ je nejvyšší podíl biomasy, který může být z celkové produkce zpracován na potravinářský bílkovinný preparát 43,4 %. Při snižování dávek extrakčního amoniaku může podíl potravinářských kvasnic stoupat. Při extrakci 100 g kvasničné biomasy se ztrácí 29,5 g sušiny. Při náhradě 30 % amoniaku extraktem, tj. v případě, kdy se na potravinářský výrobek zpracovává 13 % z celkové produkce biomasy, jsou zvýšeným přírůstkem kvasinek extrakční ztráty nejen plně kompenzovány, ale celková produkce kvasinek dokonce 9,7 % stoupne. Při náhradě 69 % čpavkové vody /29,8 % potravinářských kvasnic/ jsou extrakční ztráty kompenzovány z 91,5 % a při plné náhradě čpavkové vody extraktem z 87 %.

Příklad 3

Z lisovaného pekařského droždí bylo rozmícháním s vodou připraveno 400 ml kvasničného mléka, obsahujícího 150 g sušiny biomasy v litru a 7,5 % dusíku a 5,5 % nukleových kyselin v sušině. Kvasinkový koncentrát se zahřival 30 minut na 60 °C, potom se k němu přidalo 20 ml čpavkové vody /22 % NH_3 / a směs se za míchání udržovala dalších 30 minut při uvedené teplotě. Po zchlazení se opracovaná biomasa odstředila od extraktu a promyla dvakrát 200 ml vody. Promývací vody se připojily k amoniakálnímu extraktu. Bylo získáno 203 g kvasničné pasty, obsahující 42,6 g sušiny a 8,3 % N a 1,2 % nukleových kyselin v sušině. Extrakt spojený s promývacími vodami měl objem 610 ml a použil se jako náhrada části čpavkové vody při vsádkové kultivaci kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* RIFIB 104 na sacharóze. Ztráty sušiny při extrakci nukleových kyselin byly 17,4 g, tj. 29,0 g na 100 g výchozí kvasničné sušiny.

Kultivace byla vedena v laboratorním fermentoru popsaném v příkladu 2, při nezměněném užitečném plnění a za stejných aeračních podmínek. Kultivační teplota byla 30 °C a pH se udržovalo v rozmezí 4,6 až 4,8. Na počátku kultivace se do fermentoru nalilo 1,3 l vody, ve které bylo rozpuštěno 280 g sacharózy, pak se přidalo 160 ml roztoku minerálních živin /příklad 2/ a 2 g síranu amonného. V průběhu kultivace se pH upravovalo amoniakálním

extraktem a později čpavkovou vodou. Na konci kultivace bylo získáno 155 g kvasničné sušiny obsahující 8,4 % dusíku a 75 % nukleových kyselin.

Za stejných podmínek byla v témže fermentoru provedena srovnávací kultivace, při které se k úpravě pH a jako zdroj dusíku použila výhradně čpavková voda. Při této kultivaci se získalo pouze 138,5 g kvasničné sušiny se 7,9 % dusíku a 5,5 % nukleových kyselin.

První kultivací, při níž bylo 27,7 % čpavkové vody nahrazeno amoniakálním extraktem se získalo o 16,7 g kvasničné sušiny více než při kultivaci srovnávací, čím byly ztráty sušiny při extrakci nukleových kyselin vykompenzovány z 94,8 %. Při použitém % náhrady čpavkové vody amoniakálním extraktem je možno použít k výrobě potravinářského bílkovinného preparátu asi 39 % z celkové produkce biomasy.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob výroby kvasničného bílkovinného preparátu s nízkým obsahem nukleových kyselin extrakcí termolyzovaných kvasinek amoniakem s vracením extraktu do kultivace, vyznačený tím, že se k přípravě kvasničného preparátu s nízkým obsahem nukleových kyselin použije 5 až 60 %, s výhodou 10 až 40 % biomasy produkované kultivací a že úprava biomasy spočívá v tom, že se kvasinkový koncentrát obsahující 100 až 200 g/l kvasničné sušiny zahřeje na 5 až 60 minut na teplotu 60 až 90 °C, pak se k termolyzátu přidá 5 až 30 g amoniaku na 100 g obsažené kvasničné sušiny, termolyzát se udržuje po 20 až 60 minut při teplotě 40 až 85 °C, načež se opracovaná biomasa oddělí od extraktu, důkladně promyje vodou a usuší.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se spolu s amoniakálním extraktem vracejí do kultivace i prací vody z promývání extrahované biomasy.