

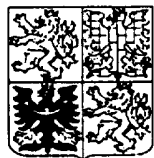
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 496

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **6304-89**

(22) Přihlášeno: 07. 11. 89

(40) Zveřejněno: 11. 08. 93

(47) Uděleno: 11. 12. 95

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 14. 02. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 1/16

C 12 N 1/18

(73) Majitel patentu:

Mikrobiologický ústav AVČR, Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Machek František ing. CSc., Praha, CZ;

Tomis Bořivoj ing. CSc., Frýdek-Místek, CZ;

Krumphanzl Vladimír akademik, Praha, CZ;

Bárta Jiří ing., Praha, CZ;

Kujan Petr ing., Praha, CZ;

Vavříčková Naděžda ing., Frýdek-Místek, CZ;

Běhalová Božena ing. CSc., Praha, CZ;

Šillingr Vladimír ing., Praha, CZ;

(54) Název vynálezu:

Způsob přípravy kvasničného extraktu

(57) Anotace:

Způsob, který spočívá v tom, že suspenze vyfermentovaných buněk se rozdělí na dvě frakce v objemovém poměru 1 : 1 až 1 : 10, přičemž frakce obsahující převážně rychleji sedimentující buňky se zvýšenou proteolitickou aktivitou se naředí na sušinu 5 až 16 % hmot., pH se upraví na hodnotu 4,5 až 7,5 a zahřeje na teplotu 45 až 65 °C po dobu 1 až 6 hodin a potom se odseparují tuhé nerozpustné částice, takto získaný roztok se stabilizuje nejlépe odstraněním vody.

CZ 280 496 B6

Způsob přípravy kvasničného extraktu

Oblast techniky

Kvasničný extrakt je surovina velmi důležitá nejen pro potravinářský průmysl, kde se používá jako přídatek do potravin místo masového výtažku, ale také pro průmysl fermentační, kde se uplatňuje obsah stopových látek, bez kterých některé kmeny mikroorganismů vůbec nerostou.

Doposud se jako zdroj těchto látek používal "yeast extract" (například Difco), ale způsob přípravy tohoto preparátu není nikde uveden. Předpokládá se, že se jedná o produkt získaný podobným způsobem jako uvádí čs. autorské osvědčení 189 440, tj. autolýzát kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, z něhož byly odstraněny nerozpustné částice (zbytky buněčných stěn a organel). Tímto způsobem řeší přípravu kvasničného extraktu (autolýzátu) mnoho autorů (přehled podává Babayan T.L., Bezrukov M.G., Acta Biotechnol. 5 (1985), 129). Rozdíl je pouze ve způsobu aktivace lytických enzymů, které štěpí vysokomolekulární látky na žádoucí nízkomolekulární složky. Tak například již zmíněné čs. autorské osvědčení 189 440 používá pro aktivaci lytického systému desintegraci buněk, jiní autoři (například Riemay K.H., Wiese M.Z., Allg. Mikrobiol. 19 (1979), 269) popsali tak zvaný tepelný šok, kde se buňky velmi rychle (v několika sekundách) ohřejí na teplotu okolo 70 °C a opět velmi rychle ochladí. Lytický systém lze také aktivizovat přidavkem soli (NaCl), rozpouštědel (etanol) a jiných látek (Babayan T.L., Bezrukov M.G., Acta Biotechnol. 5 (1985), 129), nebo již autolýzovanými kvasinkami (čs. autorské osvědčení č. 259 289). V každém případě je třeba buňky "opracovat" jak shora uvedeno před optimalizací podmínek pro lyzi buněčného obsahu. Jinak je proces lyze tak pomalý, že je technologicky obtížné použitelný.

Podstata vynálezu

Tuto nevýhodu odstraňuje způsob přípravy kvasničného extraktu podle vynálezu, jehož podstatou je, že suspenze vyfermentovaných buněk se rozdělí na dvě frakce v objemovém poměru 1 : 1 až 1 : 10, přičemž frakce obsahující převážně rychleji sedimentující buňky se zvýšenou proteolytickou aktivitou se naředí na sušinu 5 až 16 % hmot., pH se upraví na hodnotu 4,5 až 7,5 a zahřeje na teplotu 45 až 65 °C po dobu 1 až 6 hodin a potom se odseparují tuhé nerozpustné částice, takto získaný roztok se stabilizuje nejlépe odstraněním vody.

Vynález využívá skutečnosti, že suspenze buněk není homogenní pokud se týče lytické aktivity (část buněk má lytický systém již aktivovaný), a že lze tuto suspenzi rozdělit tak, aby v jedné frakci byly nakoncentrovány buňky, jejichž lytická aktivita je minimálně srovnatelná s aktivitou buněk "opracovaných" některým ze známých shora uvedených způsobů. Nevýhodou však je, že odpadá část buněk; to však lze změnit ve výhodu, pokud proces bude bezprostředně navazovat na fermentační přípravu buněk. Odpadající frakci růstově velmi aktivních buněk je možno totiž použít pro inokulaci fermentorů a i tam potom dochází ke značnému urychlení procesu.

Podstata vynálezu je objasněna v následující tabulce a v příkladech.

V tabulce je uvedena závislost rychlosti lyze buněk kvasinky *Candida utilis*, vyrostlých na sulfitových výluzích, na jejich rychlosti sedimentace. Rychlost lyze byla stanovena množstvím uvolněného α aminodusíku (formolovou titrací) za 2 h a vypočtena jako podíl rychlosti lyze kvasinek po desintegraci (100%). Množství rychle sedimentujících buněk bylo určováno podílem suché hmotnosti buněk, které dosáhly dna kyvety vzhledem k celkové suché hmotnosti buněk. Podíl byl měněn dobou separace a je uveden v % hmot.

Tabulka

Závislost rychlosti lyze buněk *Candida utilis* na jejich sedimentační rychlosti

Sedimentační rychlost % hmot.	Podíl rychlosti lyze % hmot.
0 ^X	100 ^X
10	88
20	85
30	82
40	80
50	72
60	60
70	50
80	44
90	38
100	33

^X V prvním řádku jsou uvedeny hodnoty platné pro neseparované desintegrované kvasinky. Celkový výtěžek nízkomolekulární frakce (kvasničního extraktu) byl v tomto případě, za podmínek experimentu, 32 % hmot. (po odečtení vnitrobuněčných nízkomolekulárních látek (buněčného poolu)).

Způsob aktivace lytických enzymů desintegrací byl volen proto, že je nejlépe popsán a definován a protože dává nejvyšší výtěžky. Jeho energetická náročnost však zatím zabránila většímu rozšíření v praxi.

Dále jsou uvedeny příklady způsobu výroby kvasničního extraktu podle vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Čerstvě vyrostlá suspenze kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* o sušině 1,6 % hmot. byla po dobu 5 min odstřeďována při 250 G na kyvetové odstředivce. Za tuto dobu se u dna 1 l kyvety nakoncentrovalo v 50 ml 6,1 g kvasinek tj. 38 % výchozího množství. Současně byla připravena suspenze buněk neseparovaných frakcionovaně o stejné koncentraci (12,2 % hmot.).

Obě tyto suspenze, jejichž hodnota pH byla přibližně stejná (5,4), byly zahřáty na 53 °C a při této teplotě udržovány 2 hodiny. Po separaci 10 min při 2 500 G byl v obou případech získán čirý supernatant: v případě frakcionovaně separovaných buněk sytější žluté barvy. Stanovením α aminodusíku bylo zjištěno, že supernatant frakcionovaně separovaných buněk obsahuje 1,4 mg α aminodusíku ml⁻¹, tj. asi 2,4 krát více aminodusíku než supernatant po inkubaci nedělených buněk, který obsahoval 0,6 mg α aminodusíku ml⁻¹ supernatantu.

Příklad 2

Čerstvě získaná dvakrát promytá a nakoncentrovaná suspenze buněk *Candida utilis* vyrostlých na sulfitových výluzích byla separována na tryskové laboratorní odstředivce s rychlostí nátoky volenou tak, aby při osazení dvěma tryskami o 0,4 mm došlo k rozdělení toku přibližně 1:4, (sediment:supernatant) přičemž suspenze procházející tryskami (sediment) obsahovala po ustálení toku 7 % hmot. suchých buněk. Koncentrace buněk v supernatantu byla 1,8 % hmot. K rozdělení hmoty buněk došlo přibližně v poměru 1:1. Současně byla připravena 7 % hmot. suspenze výchozích buněk. Obě suspenze, které měly přibližně stejnou hodnotu pH (5,1), byly zahřáty na teplotu 55 °C po dobu 2 hodin. Po oddělení buněk byla stanovena sušina obou supernatantů a vypočten výtěžek kvasničního extraktu. V případě buněk frakcionovaně separovaných bylo získáno ze 70 g suché hmotnosti kvasinek 14,8 g extraktu, tj. výtěžek přibližně 21 % hmot. V případě původní suspenze bylo získáno ze 70 g suché hmotnosti původních kvasinek 6,5 g extraktu, tj. výtěžek přibližně 10 % hmot. Je zřejmé, že zařazením frakcionované separace se zvýšil výtěžek procesu více než dvakrát.

Průmyslová využitelnost

Kvasničný extrakt získaný postupem podle vynálezu je použitelný v potravinářství jako ochucovadlo nebo ve fermentačním průmyslu jako přídavek do půd pro zvláštní náročné mikroorganismy.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Způsob přípravy kvasničného extraktu, v y z n a č e n ý t í m, že suspenze vyfermentovaných buněk se rozdělí na dvě frakce v objemovém poměru 1 : 1 až 1 : 10, přičemž frakce obsahující převážně rychleji sedimentující buňky se zvýšenou proteolytickou aktivitou se naředí na sušinu 5 až 16 % hmot., pH se upraví na hodnotu 4,5 až 7,5 a zahřeje na teplotu 45 až 65 °C po dobu 1 až 6 hodin a potom se odseparují tuhé nerozpustné částice, takto získaný roztok se stabilizuje nejlépe odstraněním vody.

Konec dokumentu
