

Frakcionácia biomasy kvasiniek

663.13
664.38

Ing. STANISLAV OHRABLO, Slovlik, n. p., Trenčín

Ing. ERNEST ŠTURDÍK, CSC., Chemickotechnologická fakulta, SVŠT Bratislava

Ing. STANISLAV KRČMAR, CSC., Výskumný ústav LIKO, Bratislava

Kľúčové slová: frakcionácia kvasiniek; dezintegrácia biomasy; autolýza *S. cerevisiae*; separácia bunkových stien; proteínov, nukleových kyselín a lipidov; komplexné preparáty z kvasiniek; izolácia nízkomolekulových látok

Úvod

Všeobecný nedostatok bielkovín stupňuje snahy získať ich z rôznych netradičných zdrojov a upraviť ich senzorické, nutričné a funkčné vlastnosti pre použitie v celom rade potravinárskych výrobkov. Jednou z reálnych možností je využitie proteínov obsiahnutých v biomase kvasiniek. Okrem proteínov však kvasničná biomasa obsahuje ďalšie hodnotné zložky, izolácia ktorých podstatne zefektívňuje celkové využitie kvasničnej biomasy. Jedná sa o enzýmy, koezýmy, vitamíny, aminokyseliny, lipidy, nukleové kyseliny, polysacharidy, atď. Tieto látky sú využiteľné ako biochemikálie pre analytiku, ochucovadlá v potravinárstve, preparáty vhodné na použitie v kozmetike a farmácii atď. Cieľom tejto práce bolo zosumariť dostupné poznatky o získavaní a využití jednotlivých komponentov biomasy kvasiniek.

Dezintegrácia kvasničnej biomasy

Závažným problémom na ceste ku komplexnému využitiu biomasy kvasiniek je rigidita ich bunkovej steny. Podľa údajov Cooneyho et al. [1] a Kinsella a Shettyho [2] je kvasničná bunková stena približne 70 ± 10 nm hrubá a obsahuje 30–40 % mananov, 30–60 % glukánov, 5–10 % proteínov a 1 % chitínu. Z celkovej sušiny bunky tvorí asi 15 %.

Na rozrušenie bunkovej steny a tým sprístupnenie jednotlivých zložiek biomasy sa používajú rôzne metódy dezintegrácie, ktoré podľa princípu môžeme rozdeliť na fyzikálne, chemické a biochemické, pričom požadovaného stupňa dezintegrácie sa v mnohých prípadoch dosahuje ich kombináciou [3, 4, 5, 6].

Mechanická dezintegrácia je drvenie alebo mletie suchej alebo vlhkej biomasy v zariadeniach plnených vhodnými abrazívnymi telieskami, napr. zo skla alebo Al_2O_3 . Používa sa tiež rozotieranie buniek v diskových mlynoch, drvenie zmrazených suspenzií, prípadne mletie v prostredí organického rozpúšťadla. Mogren et al. [7] popisuje mechanický dezintegrátor Dyno-Mühle. Zariadenie obsahuje 5 rotačných diskov v horizontálne postavenom valci plnenom sklenenými telieskami. Iné usporiadanie rotačných diskov uvádzajú Rehacek a Schaefer [8] a Currie et al. [9]. Dezintegrácia ultrasonikáciou je založená na princípe kavitácie. James et al. [11] popisuje kontinuálny systém na ultrasonikáciu suspenzie kvasiniek pri frekvencii 20 kHz a uvádza matematický popis tohto procesu. Vzhľadom na vysokú energetickú náročnosť sa tento spôsob dezintegrácie kvasiniek takmer nepoužíva [1]. Dezintegrácia vysokým tlakom spočíva v pretláčaní suspenzie kvasiniek cez trysky pomocou vysokého tlaku. Optimálny tlak pre kvasinky je $7,1 \cdot 10^7$ Pa (725 kp \cdot cm $^{-2}$) [1]. Tento typ dezintegrácie popisuje Brookman [12, 13, 14], Engler a Robinson [15] a Lee et al. [16]. Ak suspenziu buniek mikroorganizmov nasýtime vhodným plynom pri zvýšenom tlaku a tento tlak potom rýchlo znížime, dochádza k rozrušeniu bunkových stien následkom vyrovnávania tlakového rozdielu vo vnútri bunky a mimo nej. Jedná sa o dezintegráciu explozívnu dekompresiou. Ne-

sterov [17] a Rakitin et al. [18] používajú ako plyn na nasýtenie suspenzie skvapalnený vzduch v 3–9násobnom nadbytku a tlak 2–10 MPa (20–100 atm). Zníženie tlaku musí byť uskutočnené v optimálnom časovom intervale, pretože príliš rýchle alebo pomalé zníženie tlaku negatívne vplyva na rozsah rozrušenia buniek. Ako vhodná doba sa uvádza 10–15 s. Zariadenie pre kontinuálnu dezintegráciu biomasy založenú na princípe explozívnej dekompresie uvádzajú sovietske patenty č. 477 742 a č. 602 551. Oba sú v inovovanej forme zahrnuté v československom autorskom osvedčení č. 191 551.

Chemické metódy dezintegrácie sú založené na pôsobení chemikálií na niektoré zložky bunkovej steny, čím sa štruktúra bunkovej steny labilizuje. Ako takého zlúčeniny môžu byť použité tioly napr. monotioglycerol, 2-merkaptotanol a ditiotreitol [19].

Biochemické metódy využívajú enzymatické pôsobenie na bunkovú stenu, pričom môže byť využitý cudzí alebo vlastný lytický aparát. Zvlášť široké je použitie exogénnych lytických enzýmov. Arnold [20] uvádza použitie lyofilizovanej tráviacej šťavy slimáka *Helix pomatia*, pri použití ktorej sú bunkové steny atakované len do určitého rozsahu. Tento systém sa používa najmä pri cytologických štúdiách. Ďalší používaný preparát je zymolyáza. Pripravuje sa z *Arthrobacter luteus* a obsahuje β -1,2-; β -1,4-; β -1,6-glukanázy, ktoré optimálne pôsobia na kvasinky pri pH 7,0–7,5. Lytické enzýmy z *Arthrobacter luteus* sú vo väčšom množstve produkované pri kultivácii v médiu s prídavkom β -1,3-glukanu [21, 22]. Enzýmy lyzujúce kvasničnú bunkovú stenu obsahuje aj *Arthrobacter globiformis*. Lytický systém možno získať vyzrážaním homogenátu s $(NH_4)_2SO_4$, s následnou dialýzou a lyofilizáciou. Ďalšími možnými zdrojmi lytických enzýmov sú mikroorganizmy rodov *Oerskovia*, *Albus Chromogenes*, *Flavus*, *Globisporus*, *Lavendulae*, *Coprinus* a *Thermoactinomyces*. Účinok enzýmov môže byť stimulovaný vhodnou voľbou prostredia, napr. prídavkom Na_2SO_3 alebo KCl [23, 24]. Sovietsky patent č. 542 502 využíva pôsobenie lytických enzýmov až po opracovaní suspenzie kvasiniek alkoholom alebo acetónom (odvodnenie a odtučnenie biomasy). Jančevskij et al. [25, 26] použili na opracovanie bunkových stien termolýzu, autolýzu a lýzu enzymatickými preparátmi získanými z *Bacillus subtilis*. Asenjo a Dunill [27, 28] uvádzajú pre produkciu lytických enzýmov použitie baktérií *Cytophaga*. Účinnejšiu labilizáciu je možné dosiahnuť spoločným pôsobením exogénnych lytických enzýmov rôzneho pôvodu. Napríklad Knorr et al. [29] popisujú spoločné pôsobenie zymolýazy a lyzozýmu. Samostatnú oblasť možností rozrušenia bunkových stien tvorí využitie endogénneho lytického aparátu kvasiniek. Za určitých podmienok sú totiž niektoré enzýmy kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* schopné pôsobiť na vlastnú bunkovú stenu. Tento lytický systém je popísaný v prácach Phaffa [30], Wolfa a Holzera [31] a Villaneuvu et al. [32]. Tvoria ho 2 endopeptidázy A a B, 2 karboxypeptidázy Y a S, minimálne 3 aminopeptidázy a ďalej kyslá fosfatáza, invertáza a β -1,3-glukanáza [33]. Spustenie autolýzy možno uskutočniť viacerými spôsobmi. Tak napr.

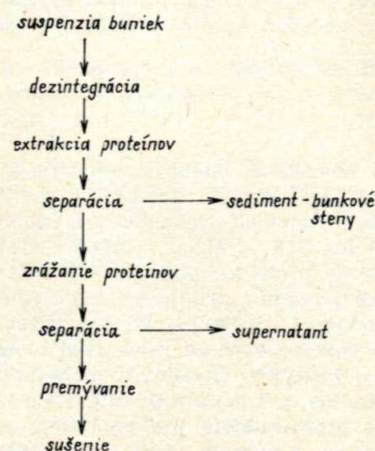
iniciácia autolýzy organickými rozpúšťadlami a teplotou je popísaná v prácach *Ischidu-Ichimasu* [34] a *Arnolda* [20]. Spomedzi organických rozpúšťadiel môže byť použitý prídavok chloroformu, etanolu, toluénu alebo etylacetátu. *Chrenova et al.* [35] skúmali vplyv iónov Mg^{2+} , Ca^{2+} a Zn^{2+} na autolýzu kvasiniek. Výsledkom bolo zistenie, že najúčinnějšíe sú ióny Zn^{2+} , potom Mg^{2+} . Poľský patent č. 106 653 popisuje ako iniciačný faktor prídavok 0,5–5,0 % NaCl pri pH 4,0–7,0. Autolýza ako prirodzený proces prebieha až do rozloženia buniek na základné zložky ako sú aminokyseliny, nukleotidy, polypeptidy, glykogén, trehalóza, cukry, vitamíny a ďalšie nízkomolekulové látky. Pri použití autolýzy pre dezintegráciu musí tento proces prebehnúť len do určitého plánovaného stupňa.

Izolácia kvasničných proteínov

Biomasa kvasiniek obsahuje spravidla 40–60 % proteínov a tento fakt zaraďuje kvasinky medzi potenciálne netradičné zdroje bielkovín pri riešení celosvetového problému ich nedostatku. Kvasničné proteíny so svojim aminokyselinovým zložením sú vhodné pre potravinárske účely. Zastúpenie jednotlivých aminokyselín ilustruje tab. 1. Popri proteínoch však kvasinky obsahujú aj nukleové kyseliny (NK), ktoré sú v proteínových preparátoch nežiadúce. Priamej aplikácii kvasiniek vo výžive sú na závädu aj fosfolipidy a antigénne látky lokalizované prevažne v bunkovej stene. Aby teda mohli byť kvasničné proteíny použité v potravinárstve, je potrebné vhodným spôsobom ich z biomasy izolovať a upraviť, t. j. odstrániť spomínané nežiadúce prímеси, ale aj vylepšiť niektoré ich funkčné vlastnosti. Problematika izolácie proteínov je prehľadne spracovaná v prácach *Cooneyho et al.* [1], *Shettyho* a *Kinsella* [2], *Tonniusa* [36] a *Nirrisa* [37]. Všeobecne proces izolácie znázorňuje schéma na obr. 1. V literatúre sú publikované viaceré postupy, ktoré sú modifikáciami základného postupu a ktoré umožňujú vyrobiť produkt posudzovaný podľa použitia rôznymi kritériami. Najčastejšie sa vyskytujú obmeny alkalického extrakcie proteínov, zrážania v izoelektrickom bode a použitia NH_3 na opracovanie biomasy.

Metódy alkalického extrakcie sú zamerané na také opracovanie dezintegrátu, pri ktorom sa dosahuje uvoľnenie zatiaľ nerozpusteného podielu proteínov z bunkových

stien. Patent NDR č. 128 043 uvádza nasledovné podmienky — pôsobenie roztoku NaOH o koncentrácii 300 mol. $.m^{-3}$ pri teplote 60 °C počas 15 min. Podľa čs. patentu č. 161 299 sa k suspenzii pridá NaOH tak, aby pH prostredia bolo v rozmedzí 9–14 a teplota v rozmedzí 0–40 °C. Potom sa pri pH 7–14 odstráni bunkové steny a proteíny sa vyzrážajú okyslením na pH 2–7. Zrážací



Obr. 1. Schéma izolácie proteínov z kvasiniek [1]

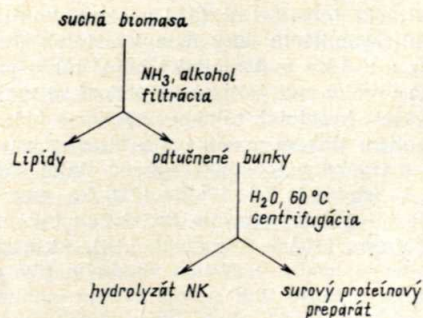
efekt sa zlepši prídavkom iónov Ca^{2+} , čím sa zároveň dosiahne obohatenie preparátu vápnikom. Vyzrážané proteíny sa oddelia filtráciou alebo centrifugáciou a v kvapalnej fáze zostanú štepy NK, aminokyseliny, peptidy a rastové látky. Kvapalná fáza sa môže ďalej spracúvať a používať ako zdroj chuťových a aromatických látok v potravinárstve, ako zdroj aminokyselín, nukleotidov, resp. ako vitamínový koncentrát. Podľa *Schlingmanna* a *Práveho* [38] je na vytvorenie alkalického prostredia pre extrakciu proteínov vhodný amoniak. Suchá biomasa sa rozsuspenderuje v amoniaku pri –40 °C a za krátky čas dôjde k silnému rozrušeniu buniek. Amoniak sa oddelí extrakciou metanolom alebo etanolom. Celý postup znázorňuje schéma na obr. 2. Podobný postup je podstatou čs. vynálezu č. 188 575, podľa ktorého sa biomasa zahrieva 10–60 min pri 70–95 °C. K termolýzátu sa pridá amoniak a inkubuje sa 20–60 min pri 40–85 °C. Potom sa bunky odstredia a vysušia.

Existuje niekoľko látok, ktoré sa môžu použiť na modifikáciu špecifických funkčných skupín proteínov. Jedna možnosť je acylácia voľných aminoskupín v proteínoch anhydridmi organických kyselín. *Vananuvat* a *Kinsella* [39] a *Shetty* a *Kinsella* [40, 41, 42] popísali sukcinyláciu

Tab. 1. Obsah aminokyselín v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* v g/16 g N

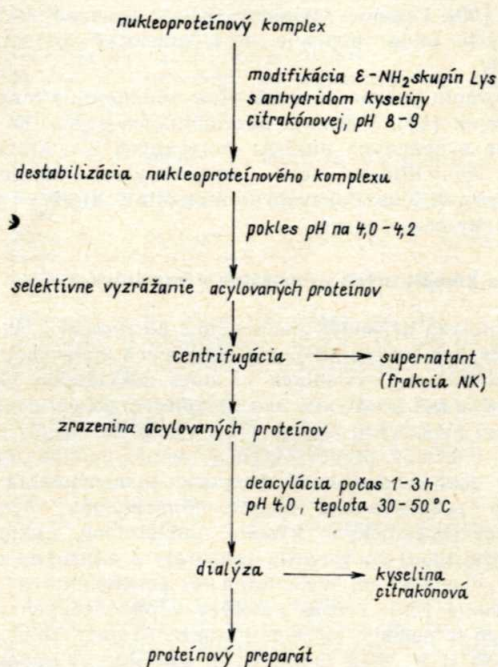
Aminokys.	podľa [60]	podľa [73]	podľa [74]	podľa [75]	podľa [75]
Lys	8,3	5,72	6,7	8,8	5,5
Thr	5,0	3,81	4,1	4,6	4,0
Val	5,6	4,96	4,6	6,1	5,0
Met	1,4	1,82	1,4	2,4	3,5
Cys	—	—	—		
Ile	4,7	4,46	4,1	5,1	4,0
Leu	7,2	6,59	6,0	6,7	7,0
Phe	4,3	4,02	3,7	8,1	6,0
Tyr	3,9	3,20	3,2		
His	2,1	1,94	1,6	2,0	—
Arg	4,9	4,17	3,7	2,2	—
Asp	9,9	7,98	8,0	—	—
Glu	11,1	10,81	10,8	—	—
Ser	5,4	3,74	4,2	—	—
Pro	3,6	4,50	3,1	—	—
Gly	4,5	3,08	3,7	—	—
Ala	6,0	4,43	4,7	—	—

* Údaje FAO/WHO pre aminokyselinové zloženie „ideálnej bielkoviny“.



Obr. 2. Izolácia proteínov pomocou NH_3 a alkoholu [38]

kvasničných proteínov. Pri 88% sukcinylácii klesol obsah NK z 12,5 na 5,3 %. Sukcinylácia pôsobí aj na rozpustnosť proteínov a posúva pH ich izoelektrického bodu z hodnoty 4,5 na hodnotu 4,0. Pri izolácii proteínov dochádza k spoluvyzrážaniu NK, ktoré sú v homogenátoch vo forme nukleoproteínových komplexov, ktoré sukcinylácia destabilizuje a zapríčiňuje ich disociáciu. Nevýhodou sukcinylácie je fakt, že konečný produkt je sukcinylovaný proteín, čo môže prekážať pri použití v potravinárstve. Na miesto sukcinylanhydridu je treba použiť napr. anhydrid kyseliny citrakovnej (cis forma kyseliny metylbuténdiovej) alebo anhydrid kyseliny maleínovej, ktoré je možné vráťe odstrániť okyslením na pH 3–6. Deacylované proteíny si udržiava vysoký stupeň pôvodnej štruktúry a dobré vlastnosti. Popísaný postup znázorňuje schéma na obr. 3.



Obr. 3. Schéma acylácie a deacylácie proteínov anhydridom kyseliny citrakovnej [41]

Pre možnosť porovnávania získaných produktov sa uvádzajú ako dôležité tieto vlastnosti izolovaných proteínov: molekulová hmotnosť, dĺžka reťazcov, primárna až kvartérna štruktúra, rozpustnosť, suspendovateľnosť, pohlčovanie vody, gélovateľnosť, viskozita, tepelná kapacita, hydrofilnosť a lipofilnosť, povrchová absorpcia a adsorpcia [43, 44]. Niekedy medzi požadované vlastnosti patrí aj odstránenie typickej kvasničnej arómy alebo pachute. Najbežnejším postupom ako odstrániť uvedený nedostatok je pôsobenie horúceho rastlinného oleja na biomasu alebo hotový preparát [45]. Sovietsky patent č. 306 602 popisuje postup, pri ktorom sa proteíny z buniek neizolujú. Podstata je v intenzívnom miešaní kvasiniek s olejom pri teplote 150–210 °C dovtedy, kým obsah vody v produkte nie je menší ako 1 %. Podobné opracovanie biomasy je podstatou anglického patentu č. 263 923. Podľa patentu NDR č. 150 394 sa za účelom odstránenia aromatických látok z kvasiniek zavádza do suspenzie prúd vodnej pary. Na zlepšenie niektorých funkčných vlastností bolo použité miešanie proteínového preparátu s kazeínom [46]. Zlepšila sa tým hlavne rozpustnosť a emulgačné vlastnosti preparátu.

Znižovanie obsahu nukleových kyselín

Už pri prvých pokusoch o náhradu časti bielkovín v ľudskej výžive proteínmi z kvasiniek bolo zistené, že okrem niektorých subjektívnych a objektívnych zábran je hlavnou prekážkou nepriaznivý vplyv prítomnosti NK. Pri klinických pokusoch sa zistilo, že denná dávka NK vyššia ako 2 g môže vyvolať značné zvýšenie obsahu kyseliny močovej v krvi a moči. Obsah NK v proteínových preparátoch musí byť znížený z pôvodných asi 10 % na menej ako 2 %. Zníženie obsahu NK sa môže uskutočniť aj počas rastu biomasy — vhodnou úpravou kultivačných podmienok. Takáto úprava však takmer vždy obmedzuje rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov, čo je pri výrobe mikrobiálnej biomasy nežiadúce. Navyše zníženie obsahu NK pri týchto postupoch je dosť nevýrazné.

Metódy založené na tepelnom opracovaní suspenzie kvasiniek používajú tepelný šok, ktorý má za úlohu dezorganizovať regulačný systém bunky a narušiť jej membrány. V jednej alebo viacerých inkubačných periódach potom prebieha enzymatické odbúranie NK až na monoméry. Neodvratná je súčasne čiastočná degradácia proteínov, avšak rozsah a rýchlosť týchto rozkladných reakcií sa dajú regulovať zmenou vonkajších podmienok. El-Ashwah *et al.* [47] popisuje tepelný šok trvajúci 15 až 17 s, za ktorým nasleduje inkubácia počas 2 h pri 45–50 °C a 1 h pri 55–60 °C. Takto bolo dosiahnuté zníženie obsahu NK z 10,5 na 2,2 %. Strata na surových proteínoch bola 17,6 %. Tonnius [48] uvádza odbúranie NK dvojstupňovým tepelným opracovaním. Najprv sa realizuje tepelný šok trvajúci niekoľko sekúnd a potom nasleduje inkubačná fáza pri 50 °C trvajúca niekoľko minút až hodín. Vo svojej ďalšej publikácii uvádza Tonnius trojstupňové opracovanie suspenzie [17 s pri 68 °C, 2 h pri 45 °C a 1 h pri 55 °C [49]]. Podobný postup je uvedený vo vynáleze NSR č. 503 868. Krátka doba trvania tepelného šoku je veľmi dôležitá, pretože dlhotrvajúce tepelné pôsobenie môže smerovať proti pôvodnému zámeru [50]. Už v laboratórnych podmienkach sa však ukázalo problematickým uskutočnenie krátkodobého tepelného šoku. Z toho je zrejmé, že jeho uskutočnenie vo výrobnom rozsahu je ešte obťažnejšie. Podľa Alvarez Fontela je tepelný šok zbytočný, ba aj škodlivý [51]. Odstránenie NK pomocou ionomeničov sa javí ako metóda, ktorá nemá nežiadúce účinky na proteíny a ani na iné zložky biomasy [52]. Medzi proteínmi a NK sú určité elektrostatické príťažlivé sily, ktoré je treba pred operáciou likvidovať pridaním vhodného chelatačného činidla, napr. kyseliny citrakovnej. Použitie ionomeničov na odstránenie NK je chránené americkým patentom č. 330 464. Suspenzia preteká cez anex, ktorý selektívne sorbuje NK. Ako anex sa môže použiť DEAE alebo ECTOLA celulóza. NK nie sú pritom štiepené a môžu sa ďalej spracovávať.

Postupy, pri ktorých sa obsah NK znižuje použitím niektorých chemikálií, môžu byť aplikované na intaktné bunky alebo častejšie na dezintegrát biomasy. Rut *et al.* [50] uvádzajú, že najvhodnejším prostredím pre extrakciu NK z kvasiniek je amoniakálny roztok, v ktorom sa cez bunkovú stenu uvoľňujú nukleotidy, pričom proteíny z veľkej časti zostávajú neporušené v bunke. Podľa vynálezu NDR č. 150 394 sa proteínový preparát s nízkym obsahom NK získava zavedením kvasiniek do vriaceho roztoku fyziologicky nezávadných solí (CH₃COONa, NaCl) tak, aby teplota neklesla pod 80 °C. Nastáva koagulácia proteínov a NK sú čiastočne rozložené a zostávajú v roztoku. Koncentrácia NaCl je 5–20 % a pH je 6–7. Ďalší vynález NDR č. 150 982 popisuje opracovávanie dezintegrátu biomasy pri pH 13–14 a teplote 40–60 °C. Získa sa alkalický extrakt, z ktorého sa proteíny vylúčia vyzrážaním v izoelektrickom bode. Damodaran a Kinsella [53] sledovali vplyv niektorých solí na zníženie obsahu NK,

ktoré podľa účinnosti sú v poradí $\text{CCl}_3\text{COONa} > \text{NaClO}_4 > \text{NaBr} > \text{NaCl}$. Zníženie obsahu NK kombináciou zahrievania, pôsobenia alkálií a NaCl popisuje Piš [45], Lindblom [54], Petkov [55, 56, 57], Ilieva et al. [58], Hedenskog a Ebbinghaus [59] Hedenskog a Mogren [60].

Podľa Rottovej a Fencla [61] optimálnymi podmienkami pre činnosť nukleáz je zahriatie kvasničnej biomasy na 55 °C pri pH 6,5. Lindblom a Morgen [62] použili inkubáciu v prostredí NaCl. Ako najvhodnejšia sa javila teplota 50 °C, pH 5,6 a inkubácia 20 min s prídavkom 3 % NaCl. Za týchto podmienok bolo dosiahnuté zníženie NK o 85 %. Bolo zistené, že pri inkubácii bez NaCl, v alkalickom prostredí a pri teplote vyššej ako 65 °C sú nukleázy ireverzibilne inaktivované. V patente NDR č. 152 690 je rozpracovaný postup, podľa ktorého je suspenzia biomasy po krátkodobom tepelnom opracovaní za účelom inaktívácie proteináz zalkalizovaná na pH 5,5–8,0. Počas 1–3 h inkubácie pri 45–65 °C prebieha vlastný rozklad NK. Podľa vynálezu prebieha inkubácia v prítomnosti 0,01–5 % anionicky povrchovo aktívnej látky (Na-n-dodecylsulfát-1, Na-n-dodecylsulfonát-1, Na-3-etoxy-n-dodecyl-sulfonát-1) a 0,1–2 % anorganickej soli (NaCl, KCl, Na_2HPO_4). Patent NSR č. 2 622 982 uvádza aktiváciu endogénnych nukleáz zahriatím suspenzie na 63–67 °C pri pH 7–8,5. Použitie exogénnych enzýmov na štiepenie NK v kvasničnej biomase popisuje americký patent č. 3 867 255. Nukleáza bola získaná extrakciou zo sladových klíčkov.

Odstraňovanie lipidov z proteínových preparátov

Lipidy ako súčasť kvasničnej biomasy tvoria podľa údajov Ratledgeho [63] 8–14 % sušiny bunky, pričom toto množstvo varíruje v závislosti od kultivačných podmienok a rastovej fázy kvasiniek. Podľa Malchajana et al. [64] tvoria podstatnú časť kvasinkových lipidov triglyceridy (20–50 %) a fosfolipidy (15–60 %). Zostatok pripadá na voľné masťné kyseliny (1–20 %), nezmydliteľné látky (5–20 %) a mono- a diglyceridy (1–15 %). Pre zlepšenie chuťových vlastností proteínových preparátov určených pre potravinárstvo je treba lipidy odstrániť. Najčastejšie sa v tomto smere používa extrakcia organickými rozpúšťadlami, napr. etyléterom, benzénom, n-hexánom alebo tetrachlórmetánom. Patent NDR č. 141 610 poukazuje na možnosť odstránenia lipidov z proteínových izolátov extrakciou 2-propanolom. Podľa patentu ZSSR č. 592 844 je na oddelenie lipidov použiteľná protiprúdna extrakcia trojzložkovou zmesou voda + polárne rozpúšťadlo + nepochárne rozpúšťadlo. Ako polárne rozpúšťadlo sa používa etanol, propanol, butanol a ako nepochárne rozpúšťadlo hexán, extrakčný benzín alebo petroléter.

Využitie ostatných zložiek kvasničnej biomasy

Z hľadiska využiteľného obsahu kvasiniek sú okrem preferovaných proteínov zaujímavé i ďalšie komponenty biomasy. Predovšetkým sú to rezervné polysacharidy trehalóza a glykogén. Významný je tiež obsah vitamínov, hlavné skupiny B. Získavanie jednotlivých vitamínov z kvasiniek nie je hospodárne, ale sušené droždie, kvasničné extrakty a autolyzáty sú často používané ako komplexné preparáty pre vitamínovú terapiu. Z kvasničnej biomasy sa dá získať aj široké spektrum nízkomolekulárnych látok. Vzhľadom na rôznorodú podstatu sú tieto získavané z biomasy rôznymi odlišnými postupmi [65, 66]. V ďalšom uvedieme niektoré príklady.

Ergosterol je jeden z hlavných sterolov obsiahnutých v kvasinkách. Jeho obsah varíruje v rozsahu 0,1–2 %, pričom sa dá ovplyvniť zmenou kultivačných podmienok. Ožiareníím sa mení na ergokalciferol (vitamín D_2). Na tomto princípe je založený anglický patent č. 1 164 734 popisujúci zvýšenie obsahu vitamínu D_2 v kvasinkách.

Čs. patent č. 189 440 uvádza spôsob získania ergosterolu z oddelených bunkových stien, ktoré sa hydrolyzujú v prostredí KOH. Z hydrolyzáta sa ergosterol izoluje extrakciou benzénom, etanolom alebo acetónom. Podľa čs. patentu č. 171 087 sa ergosterol izoluje z frakcie lipidov. Postup je založený na hydrolyze lipidov alkoholom a alkáliami v prítomnosti antioxidačných činidiel. Používa sa napr. metanol v prostredí KOH. Ako antioxidačné činidlo môže byť použitý pyrogallol. Paralelne sa z biomasy získava ubichinón-9.

Zymozán je polysacharidický preparát získaný z kvasiniek pre použitie v imunológii. Jeho prípravu popisuje Holan et al. [67] a čs. patent č. 185 063. Podľa postupu Pillemiera et al. [68] sa zymozán komerčne vyrába v ČSSR na pracovisku VÚ LIKO v Trenčíne.

Glykany použiteľné v imunoterapii sa získavajú z bunkových stien oddelených po autolyze, ktorá prebiehala pri 40–60 °C a pH 5–8 počas 24–30 h s prídavkom etylacetátu [69]. Prípravu glykanov ako nerozpustnej frakcie bunkových stien popisuje tiež americký patent č. 4 122 196.

Pre terapiu pečene sú využiteľné 5-nukleotidy získané z kvasiniek [65]. Vznikajú enzymatickým štiepením NK pomocou exogénnych nukleáz izolovaných z mikroorganizmov *Penicillium* alebo *Streptomyces*. Alkalickou hydrolyzou NK sa získavajú 3-nukleotidy, ktoré sú farmaceuticky nezaujímavé.

Príprava komplexných preparátov z kvasiniek

Ak autolýzu kvasiniek neukončíme po narušení bunkovej steny, tak proces štiepenia bunkových makromolekúl ďalej pokračuje. Výsledkom je zmes základných látok, ktorá môže byť používaná ako komplexný preparát alebo ako zdroj niektorých zložiek [70]. Vhodným usmernením činnosti enzýmov, predovšetkým proteináz, nukleáz, lipáz atď., je možné dosiahnuť štiepenie makromolekúl do určitého požadovaného stupňa. Kombináciou rôznych prídavkov (organických kyselín, nukleotidov, nukleozidov, sacharidov) sa vytvoria preparáty s odlišnými chuťovými vlastnosťami využiteľné v potravinárstve ako ochucovadlá [69]. Proces autolýzy v prirodzených podmienkach je pomalý. Môžeme ho urýchliť napr. zahriatím na 40–60 °C, kedy už bunky hynú, ale aktivita endogénnych enzýmov je ešte vysoká. Pre vyvolanie autolýzy sa používajú aj niektoré plazmolytické látky ako NaCl, etylacetát, amylacetát, chloroform alebo etanol. Anglický patent č. 1 445 885 popisuje získanie kvasničného autolyzáta nasledovne. K suspenzii kvasiniek bol pridaný NaCl v množstve 2–10 % a etanol 1–9 %. Autolýza prebiehala pri 30–70 °C a pH 3–7 počas 4 h. Sovietsky patent č. 552 953 uvádza prídavok etylacetátu ako lytického činidla. Výhodným sa ukázalo filtrovanie autolyzáta cez vrstvu škrobového prášku, pri ktorom súčasne prebieha mechanické čistenie a adsorpcia nežiadúcich prímies. Filtračný koláč sa môže po vysušení použiť ako krmivo.

Z kvasiniek je možné získať preparáty s mäsovou, orechovou a inými chuťami. Bolo zistené, že prípravok s mäsovou chuťou môže byť získaný tak, že sa proteínový rozštiepi na zmes, ktorá obsahuje aminokyseliny, ale hlavne peptidy o dĺžke 4–5 jednotiek. Pridaním vhodných množstiev sacharidov, organických kyselín alebo ich solí, nukleotidov a nukleozidov a zahriatím sa vytvorí chuť mäsového extraktu [69]. Podľa amerického patentu č. 3 809 780 sú chuťové látky podobné zložkám mäsového extraktu produkované narušením buniek exogénnymi lytickými enzýmami získanými z mikroorganizmov rodov *Coprinus*, *Daedaleopsis* alebo *Iprex*. Rozrušenie buniek prebieha 5–48 h pri teplote 45–50 °C a pH 2,5–3,0. Americký patent č. 3 881 022 uvádza pridávanie enzýmov čerstvého mäsa ku zmesi kvasničného autolyzáta a hexózu.

Využitie autolýzátu ako ochucovadla popisuje aj anglický patent č. 1 561 202.

Záver

Je nesporné, že najväčší efekt možno dosiahnuť vtedy, ak sa kvasničná biomasa využije komplexne. Na základe postupu Mikrobiologického ústavu ČSAV [71] sa riešenie komplexného využitia kvasničných buniek rozvíja i u nás, a to v rámci riešenia úlohy štátneho plánu rozvoja vedy a techniky P-11-529-505 [72].

Literatúra

- [1] COONEY, C. L., RHA CHOKYUN, TANNENBAUM, S. R.: Adv. Food. Research, **26**, 1980, s. 1—52
- [2] KINSELLA, J. E., SHETTY, K. J.: Adv. Exp. Met. Biol., **105**, 1978, s. 797—825
- [3] SKRJABIN, G. K.: Dezintegrácia mikroorganizmov, Itogi nauki i tekhniki, Moskva 1978
- [4] WRONOWSKI, S.: Przem. Spoz., **32**, 1978, s. 289—293
- [5] TONNIUS, F.: Z. Lebensmit. Technol., **29**, 1978, s. 76—78
- [6] MOSQUEIRA, F. G., HIGGIUS, J. J., DUNILL, P., LILLY, M. D.: Biotechnol. Bioeng., **23**, 1981, s. 335—343
- [7] MOGREN, H., LINDBLOM, H., HEDENSKOG, G.: Biotechnol. Bioeng., **16**, 1974, s. 261—274
- [8] REHACEK, J., SCHAEFER, J.: Biotechnol. Bioeng., **19**, 1977, s. 1523—1534
- [9] CURRIE, J. A., DUNILL, P., LILLY, M. D.: Biotechnol. Bioeng., **14**, 1972, s. 725—736
- [10] MARFFY, F., KULA, M. R.: Biotechnol. Bioeng., **16**, 1974, s. 623 až 634
- [11] JAMES, C. J., COAKLEY, W. T., HUGHES, D. E.: Biotechnol. Bioeng., **14**, 1972, s. 33—42
- [12] BROOKMAN, J. S., DAVIES, M.: Biotechnol. Bioeng., **15**, 1973, s. 693—705
- [13] BROOKMAN, J. S.: Biotechnol. Bioeng., **16**, 1974, s. 371—383
- [14] BROOKMAN, J. S.: Biotechnol. Bioeng., **17**, 1975, s. 465—479
- [15] ENGLER, C. R., ROBINSON, C. W.: Biotechnol. Bioeng., **23**, 1981, s. 765—780
- [16] LEE, C., TSANG SHEK KWAN, URAKABE, R., RHA CHO KYUN: Biotechnol. Bioeng., **21**, 1979, s. 1—17
- [17] NESTEROV, A. I., STAVORITOVA, G. A.: Prikl. Biochim. Mikrobiol., **11**, 1975, s. 593—597
- [18] RAKITIN, V. V., MONOSOV, E. E., PROKOFJEVA, N. V., GRIGORJAN, A. N.: Prikl. Biochim. Mikrobiol., **12**, 1976, s. 278—282
- [19] SHETTY, K. J., KINSELLA, J. E.: Biotechnol. Bioeng., **20**, 1978, s. 755—766
- [20] ARNOLD, W. N.: Yeast Cell Envelopes: Biochemistry Biophysics and Ultrastructure, Vol. 1, CRC Press, Inc., 1981
- [21] KITAMURA KUMPEI, J.: Ferm. Technol., **60**, 1982, s. 253—256
- [22] KITAMURA KUMPEI, J.: Ferm. Technol., **60**, 1982, s. 257—260
- [23] KITAMURA KUMPEI, YAMAMOTO YASUSHI: Agric. Biol. Chem., **45**, 1981, s. 1761—1766
- [24] KITAMURA KUMPEI, YAMAMOTO YASUSHI, Agric. Biol. Chem., **46**, 1982, s. 2093—2099
- [25] JANČEVSKIJ, V. K., KOVALENKO, A. D., BABIN, N. A., LEVINA, L. S.: Ferm. Spirt. Prom., **7**, 1977, s. 15—18
- [26] JANČEVSKIJ, V. K., KOVALENKO, A. D., BABIN, N. A.: Ferm. Spirt. Prom., **7**, 1977, s. 27—29
- [27] ASENJO, J. A., DUNILL, P., LILLY, M. D.: Biotechnol. Bioeng., **23**, 1981, s. 97—109
- [28] ASENJO, J. A., DUNILL, P.: Biotechnol. Bioeng., **23**, 1981, s. 1045—1056
- [29] KNORR, D., SHETTY, K. J., HOOD L. F., KINSELLA, J. E.: J. Food. Science, **44**, 1979, s. 1362—1365
- [30] PHAFF, H. J.: Adv. Chem. Ser., **160**, 1977, s. 244—282
- [31] WOLF, D. H., HOLZER, H.: Microorganisms and Nitrogen Sources, Payne, J. W. Wiley: Chichester, UK, 1980, s. 431—458
- [32] VILLANEUVA, J. R., GACTO, M., DURAN, A.: Symp. Biol. Hung., **22**, 1979, s. 183—197
- [33] AL-SHAHWANI, M. F., BERRY, E. A., BERRY, D. R.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **15**, 1982, s. 153—155
- [34] ISCHIDA-ICHIMASA MICHIO, Agric. Biol. Chem., **42**, 1978, s. 247—251
- [35] CHRENOVA, N. M., BESRUKOV, M. G., KOGAN, A. S., SERGEJEV, W. A.: Nahrung, **25**, 1981, s. 837—844
- [36] TONNIUS, F.: Verfahren zum Herstellung von Nucleinsäurearmen Proteinkonzentraten aus Bäckerhefe, Dizert. práca, Karlsruhe, 1982
- [37] NORRIS, J. R.: Essays Appl. Microbiol., **6**, 1981, s. 1—31
- [38] SCHLINGMANN, M., PRÄVE, P.: Fette Seifen Anstrichm., **80**, 1978, s. 283—287
- [39] VANANUVAT, P., KINSELLA, J. E.: Biotechnol. Bioeng., **20**, 1978, s. 1329—1344
- [40] SHETTY, K. J., KINSELLA, J. E.: Biotechnol. Bioeng., **21**, 1979, s. 329—332
- [41] SHETTY, K. J., KINSELLA, J. E.: Adv. Chem. Ser., 1982, s. 169 až 198
- [42] SHETTY, K. J., KINSELLA, J. E.: J. Agric. Food. Chem., **30**, 1982, s. 1166—1171
- [43] SCHACHTEL, A. P., J. Food Science, **46**, 1981, s. 377—382
- [44] SCHWENKE, K. D., SEMIONOV, A., IZAAB, B., SERGEJEV, V. A.: Nahrung, **24**, 1980, s. 883—894
- [45] PIŠ, E.: Kvas. prům., **19**, 1973, s. 149—151
- [46] LUTHER, M., SCHUSTER, E.: Nahrung, **26**, 1982, s. 305—311
- [47] EL-ASHWAH, E. T., EID, N. M., SAID, A. K.: Egypt. J. Microbiol., **15**, 1980, s. 81—90
- [48] TONNIUS, F.: Chem. Ing. Tech., **53**, 1981, s. 279
- [49] TONNIUS, F.: UDI-Berichte, **409**, 1981, s. 369—380
- [50] RUT, M., ŠTROS, F., HLADEČEK, P.: Kvas. prům., **24**, 1978, s. 58—66
- [51] ALVAREZ FONTELA, R. M.: Methods of Treatment of yeast for Improving their Nutritional Quality, Dizert. práca, Bratislava 1983
- [52] LEWIS, P. N., LAWFORDE, M. G., KLIGERMAN, K.: Biotechnol. Letters, **4**, 1982, s. 441—446
- [53] DAMODARAN, S., KINSELLA, J. E.: Biotechnol. Bioeng., **25**, 1983, s. 761—770
- [54] LINDBLOM, M.: Biotechnol. Bioeng., **16**, 1974, s. 1495—1506
- [55] PETKOV, P., TULEVA, B., BALAŠEVA, M., PENCEVA, P.: Acta Microbiol. Bulg., **5**, 1981, s. 78—85
- [56] PETKOV, P., TULEVA, B., BALAŠEVA, M., GEBOVA, D.: Acta Microbiol. Bulg., **9**, 1981, s. 54—61
- [57] PETKOV, P., ŽOBRO, M., KOSTOV, V., BALAŠEVA, M.: Acta Microbiol. Bulg., **10**, 1982, s. 72—77
- [58] ILIEVA, M., BEŠKOV, M., GROGOROVA, D., FRENGOVA, G.: Načni Tr., Visš. Inst. Chranit. Vkusova Prom., **26**, 1979, s. 159—168
- [59] HEDENSKOG, G., EBBINGHAUS, L.: Biotechnol. Bioeng., **14**, 1972, s. 447—457
- [60] HEDENSKOG, G., MOGREN, H.: Biotechnol. Bioeng., **15**, 1973, s. 129—142
- [61] ROTOVÁ, J., FENCL, Z.: Prům. potr., **30**, 1979, s. 531—533
- [62] LINDBLOM, M., MOGREN, H.: Biotechnol. Bioeng., **16**, 1974, s. 1123—1133
- [63] RATLEDGE, C.: Progres Ind. Microbiol., **16**, 1982, s. 119—206
- [64] MALCHASJAN, S. S., NECHAJEV, A. P., GAVRILOVA, N. N.: Prikl. Biochim. Mikrobiol., **19**, 1983, s. 193—201
- [65] WOLTERS, B.: Deutsche Apoth. Z., **121**, 1981, s. 1493—1498
- [66] REED, G.: Food Technol., **35**, 1981, s. 89—94
- [67] HOLAN, Z., BERAN, K., MILER, I.: Folia Microbiol., **25**, 1980, s. 501—504
- [68] PILLEMER, L., BLOM, L.: J. Exp. Med., **1**, 1956, s. 103
- [69] JOHNSON, J. C.: Yeast for Food and other Purposes, Park Ridge, New Jersey, 1977, s. 1—344
- [70] SMITH, B. J.: Food Manuf. Ingred. Survey, **3**, 1968, s. 17—19
- [71] FENCL, Z., MACHEK, F., ŠILLINGER, V.: Studium způsobů aplikace izolovaných kvasničných bílkovin a optimalizace procesu jejich přípravy (Podklady pro zpracování procesní knihy), Správa MBÚ ČSAV Praha, 1981
- [72] KRČMÁŘ, S., HUNČIKOVÁ, S., MACHEK, F., ŠTURDIK, E.: Technicko-ekonomická štúdia úlohy P-11-529-505. Komplexné využitie kvasničných buniek, Bratislava 1983
- [73] SHETTY, K. J., KINSELLA, J. E.: J. Food Science, **44**, 1979, s. 633—638
- [74] GIERHARDT, D. L., POTTER, N. N.: J. Food Science, **43**, 1978, s. 1705—1713
- [75] EL-ASHWAH, E. T., EID, N. M., SAID, A. K.: Egypt. J. Microbiol., **15**, 1980, s. 91—98

Ohrablo, S. - Šturdík, E. - Krčmář, S.: Frakcionácia biomasy kvasiniek. Kvas. prům. **31**, 1984, č. 1, s. 11—16.

Článok obsahuje prehľad súasných poznatkov o získavaní a využití jednotlivých komponentov kvasničnej biomasy. Pojednáva sa predovšetkým o dezintegrácii kvasiniek, izolácii ich proteínov, znižovaní obsahu nukleových kyselín, extrakcii lipidov, o využití niektorých neproteínových zložiek biomasy a o príprave komplexných preparátov z kvasiniek.

Ограблo, С., Штурдик, Э., Крчмарж, С.: Фракционирование биомассы дрожжей. Квас. прум. **31**, 1985, № 1, стр. 11—16.

Статья приводит краткий обзор современных сведений по получению и использованию отдельных компонентов дрожжевой биомассы. Обсуждается прежде всего дезинтеграция дрожжей, изоляция их протеинов, понижение содержания нуклеиновых кислот, экстрагирование липидов, использование некоторых непротеиновых компонентов биомассы и получение комплексных препаратов из дрожжей.

Ohrablo, S. - Šturdík, E. - Krčmář, S.: Fractionation of Yeast Biomass. Kvas. prům. **31**, 1985, č. 1, pp. 11—16.

The article gives a review of temporary knowledges of the obtaining and utilization of the individual subcellular compounds. The desintegration of biomass, isolation of proteins, decrease of a content of nucleic acid, extraction of lipids, utilization of some non-protein compounds and preparation of complex compounds from yeast cells are described.

Ohrablo, S. - Šturdík, E. - Krčmář, S.: Fraktionierung der Hefebiomasse. Kvas. prům. **31**, 1985, Nr. 1, S. 11—16.

Der Artikel enthält eine Übersicht der gegenwärtigen Erkenntnisse über die Gewinnung und Ausnützung der einzelnen Hefebiomassekomponenten. Behandelt werden vor allem: Desintegration der Hefen, Isolation ihrer Proteine, Herabsetzung des Gehalts an Nukleinsäuren, Extraktion der Lipide, Ausnützung einiger Nichtproteinbestandteile der Biomasse und die Aufbereitung komplexer Hefepräparate.