

## PRÍPRAVA KVASNIČNÉHO POLYSACHARIDU ZYMOZÁNU

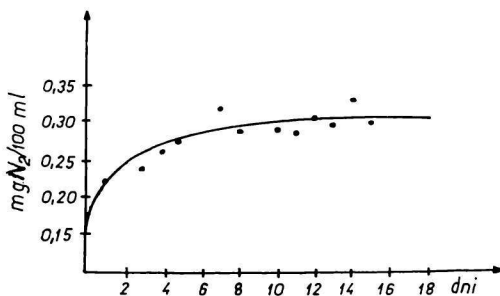
A. GINTEROVÁ, E. MITTERHAUSZEROVÁ, M. GRODOVSKÝ

Ústredný výskumný ústav potravinárskeho priemyslu v Bratislave

Tým, že kvasničný polysacharid zymozán našiel svoje upotrebenie v medicíne, stúpil i jeho význam a zvýšil sa dopyt po ňom. V Československu sa doteraz zymozán nevyrába a pracovníci ústavov, ktorí ho pri svojej práci potrebujú, obyčajne si ho pripravujú sami. Tým sa však stáva, že takéto prípravky nemá štandardnú kvalitu, a výsledky, ktoré sa s jednotlivými prípravkami získajú, nie sú navzájom dobre porovnateľné. Keďže sa uvažuje o výrobe zymozánu aj v našej republike, preverili sme si niektoré etapy jeho prípravy v spolupráci s pracovníkmi droždiarne, kde sa má výroba zymozánu zaviesť. Táto práca mala teda prispieť k vypracovaniu technologického postupu výroby zymozánu u nás a pre tento účel boli aj jednotlivé pokusy zamerané.

### Experimentálna časť

Vychádzali sme z postupu prípravy, ktorý vypracoval L. Pillemer [1]. Zamerali sme sa predovšetkým na tieto úseky: spôsob natravovania bielkovín, udržiavanie sterility, separácia a spôsob premývania, sušenie výrobku, uchovávanie hotového výrobku, prípadné odstraňovanie bielkovín fenolom.



Obr. 1. Narastanie hladiny rozpustného dusíka v priebehu proteolýzy.

### Spôsob natravovania

Natravovanie bielkovín trypsínom je podľa Pillemera značne zdĺhavé (16 dní), pričom niektorí ďalší autori [2, 3], ktorí pripravovali zymozán podľa tejto metódy, uvádzajú potrebu 20 i viac dní. Trypsín sa 1., 3., 6. a 10. deň natravovania pridáva v rovnakých množstvách. Ako ukazujú výsledky na obr. 1, intenzita natravovania s časom klesá, pretože ubúda substrát. Na obrázku sú vynášané stúpajúce koncentrácie rozpustného dusíka v závislosti od času. Modifikovali sme preto pridávanie trypsínu tak, ako je to uvedené v návode výroby na konci tejto práce. Podstatnú časť trypsínu sme presunuli do prvých fáz natravovania. Pri intenzívnejšej proteolýze však veľmi klesá pH, a preto ho

treba upravovať dvakrát denne. Pri takto upravenom spôsobe sa proteolýza skončí za 10 i menej dní, čo má značný význam s ohľadom na to, že v zmesi treba udržiavať sterilitu a teplotu za sústavnej kontroly pH po celý čas natravovania. Sledovali sme i vplyv materiálu nádoby, v ktorej prebieha varenie a proteolýza, na kvalitu konečného výrobku. Ukázalo sa, že najvhodnejším materiálom na varenie je sklo, keďže sa získali preparáty najlepšej farby, ale vyhovuje i nehrdzavejúca oceľ. Hliník dáva prípravky značne šedé, čo je pochopteľné vzhľadom na pH, pri ktorom sa zmes varí.

#### *Udržiavanie sterility*

Pri zavedení výroby zymozánu by bolo potrebné zaviesť automatickú reguláciu pH, čím by sa problém sterility značne znížil. Treba dbať na to, aby toluén, ktorým sa zalieva povrch zmesi pri natravovaní, tvoril na povrchu kompaktný film. Preto sa množstvo toluénu riadi veľkosťou povrchu. Zistili sme ďalej, že v prípade kontaminácie, ak táto veľmi nepokročila (k čomu nemôže dôjsť, ak sa denne kontroluje sterilita), stačí zmes znovu sterilizovať povarením a po vychladnutí pridať novú dávku trypsínu.

#### *Separácia a premývanie*

Pri zavedení výroby zymozánu bude treba uvažovať o výkonných separátoroch. Domnievame sa, že na tento účel by sa veľmi hodili malé hydrocyklóny, ktoré by mohli premývať zymozán v studenej a teplej obyčajnej vode, prípadne i v destilovanej vode. Pretože nemáme potrebné zariadenie, separovali sme zymozán iba na laboratórnej odstredivke. Odstredovaním možno zymozán zahustiť na 10—13 % sušiny. Za použitia hydrocyklónu by bolo vhodnejšie zymozánové mlieko zahusťovať vákuovou filtráciou. Z našich pokusov vyplýva, že dlhý čas premývania, ktorý navrhuje Pillemer, možno veľmi skrátiť a nahradiť ho zvýšeným množstvom premývacích kvapalín. Koniec premývania sa podľa Pillemera deteguje neprítomnosťou voľných cukrov. Pretože sme zistili, že i po odstránení voľných cukrov (za medzu postrehu) dáva ešte premývaciu kvapalina pozitívny test na aminokyseliny, testovali sme koniec premývania vo vodovodnej vode spot-testom s ninhydrínom.

#### *Sušenie*

Sušením rozumíme všetky práce spojené s prípravou od tej doby, keď sa skončilo premývanie v destilovanej vode. Zistili sme, že dávky bezvodého alkoholu, uvedené v návode prípravy podľa Pillemera, sú veľmi vysoké. Ekonomickejšie je používať menšie dávky alkoholu a zasunúť do prípravy viac stupňov dehydratácie. Dehydratácia mokrého zymozánu, teda toho, ktorý sa získa po separovaní z destilovanej vody, môže sa robiť i 96 % etanolom. Absolútnym alkoholom začíname premývať až vtedy, keď supernatant z 96 % alkoholu neznížil koncentráciu. V návode, uvedenom na konci tejto zprávy, uvádzame množstvá alkoholu, ktoré sme v našich pokusoch použili. Pred sušením vo vákuu je výhodné zymozán filtrovať vákuovým filtrom. Na filtri sa vysuší na prášok, ktorého dosušenie netrvá ani tretinu času potrebného na sušenie zymozánu po centrifugovaní. Podobne sme postupovali i pri sušení zymozánu po horúcej extrakcii alkoholom pod refluxom. Ak bol supernatant po tejto extrakcii žltý, opakovali sme extrakciu.

#### *Uchovávanie hotového prípravku*

Niektorí autori uvádzajú, že pripravený zymozán treba uchovávať vo vákuu, aby nestratil aktivitu. Porovnávali sme uchovávanie vo vákuu s uchovávaním v zábrusových prachovničkách. Po troch mesiacoch biologický test neukazoval zhoršenie kvality ani jedného prípravku. Ak sme však bez vákuu uchovávané preparáty znovu podrobili

horúcej extrakcii bezvodým alkoholom, zdá sa, že sa ich kvalita mierne zvýšila. Preto by snád pre výrobné podmienky bolo vhodné skladovať zymozán v tom štádiu, keď sa končí prvá dehydratácia a precipitát sa vysuší (bod 9), a až pred expedíciou uskutočniť extrakciu za horúca a potom vysušené prípravky expedovať. Nedomnievame sa však, že uchovávanie bez vakuá by znížilo kvalitu zymozánu. Podobné výsledky získali aj E. N. Voluskaja a spolupracovníci [2].

#### *Odstraňovanie bielkovín fenolom*

V literatúre sú uvedené aj iné metódy prípravy polysacharidov z mikroorganizmov než odbúranie bielkovín enzymatickou cestou. Vyskúšali sme jeden spôsob rozpúšťania bielkovín fenolom, kde sme v podstate použili metódu O. Westfala a spolupracovníkov [4]. Používali sme extrakčný systém fenol—voda. Predestilovaný fenol, zriedený vodou na 90 %, sme pridávali do droždia s obsahom ca 25 % sušiny v pomere 1 : 1. Zmes sme nechali na pieskovom kúpeli pri 50 °C asi 20 hodín. Potom sme odstredovali a premývali podobne ako predtým, kým sa neodstránili zvyšky fenolu. Premývanie trvalo oveľa dlhšie než po tryptickej digescii, a keď test na fenol bol negatívny (s  $\text{Fe}^{3+}$ ), boli negatívne i testy na voľné cukry a aminokyseliny. Zvyšky fenolu sa na konci premývania odstraňovali extrakciou éterom. Prípravky získané fenolizáciou boli na vzhľad krajšie, mali však vysoký obsah dusíka. Tento nedostatok možno odstrániť opakovanou fenolizáciou. Takáto príprava zymozánu je oveľa kratšia, pretože odpadá dlhé enzymatické natravovanie bielkovín a prípravky majú priemernú kvalitu. Zvážením všetkých okolností však vedie k tomu, že táto cesta výroby zymozánu by pre droždiareň nebola vhodná z viacerých dôvodov. Ide o látku jedovatú, pomerne drahú, s nákladnou regeneráciou, pričom odpad by sa musel vyhadzovať. Po natravovaní kvasiniek trypsinom a po odseparovaní zymozánu sa získajú lúhy bohaté na fosfor a voľné aminokyseliny, teda ideálne substráty, ktoré sa môžu využiť vo výrobe droždia.

#### Charakteristika našich prípravkov

V obsahu fosforu sa naše prípravky úplne zhodujú s údajmi v literatúre. Iba fenolizovaný zymozán má enormne nízky obsah fosforu. V obsahu dusíka máme výsledky vyššie, než sa uvádza v literatúre. Je však možné, že rozdiely sú len relatívne vysoké, pretože sme sa v literatúre nestretli s udávaním sušiny zymozánu. I tie najlepšie vysušené vzorky totiž pri 105 °C strácajú ešte na váhe asi 10 %.

V tab. 1 sú uvedené vzorky s veľmi rôznym obsahom dusíka a fosforu. Ak porovnáваме tieto údaje s údajmi pre kvalitu, vidíme, že tu niet nijakého vzťahu. Kvalitu v tabuľke označujeme len troma pojmami: dobrý, stredný a slabý, pretože pri všetkých vzorkách sa nerobili všetky variácie biologického testu (properdín-zymozánový komplex, hemolytická reakcia, väzba C'3, porovnanie so štandardným zymozánom). Z tabuľky i tak vidieť, že v hodnotení zymozánu sa autori vždy nezhodujú. Z toho vyplýva, že sa nedá vyčleniť ukazovateľ, podľa ktorého by sa dala predbežne hodnotiť kvalita zymozánu

Tabuľka 1

Vzorka číslo	Dusík v %		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> v %		Fosfor v sušine	Sušina	K v a l i t a	
	vo vzorke	v sušine	vo vzorke	v sušine			v 1. laboratóriu	v 2. laboratóriu
<i>Ia</i>	4,11	4,64	4,64	5,24	1,128	88,62	stredný	stredný
<i>Ib</i>	4,49	5,03	4,70	5,26	1,150	89,31	dobry	dobry
<i>2</i>	4,81	5,40	2,91	3,26	0,713	89,03	dobry	stredný
<i>3</i>	4,26	4,73	5,23	5,80	1,266	90,16	slabý	dobry
<i>I</i>	4,49	4,97	2,22	2,46	0,532	89,79	dobry	dobry
<i>II</i>	5,10	5,64	1,56	1,73	0,377	90,40	dobry	stredný
<i>III</i>	4,49	5,03	4,70	5,27	1,150	89,31	dobry	dobry
fenolizo- vaný	8,50	9,43	0,557	0,518	0,135	90,10	stredný	stredný

bez biologických testov. Skutočnosť, že naše zymozány, i keď mali obsah dusíka vysoký, mali podobnú kvalitu ako zahraničné, nás oprávňuje tvrdiť, že chemické zloženie zymozánu nie je pre jeho aktivitu rozhodujúce. Toto tvrdenie by podporovalo i to, že mnohí autori sa pokúšali nájsť nejaký vzťah medzi chemickým zložením zymozánu a jeho biologickou aktivitou bez kladných výsledkov. Výťažnosť v našich pokusoch sa pohybovala okolo 4 %, čo je dvojnásobok výťažnosti, ktorú udáva Pillemer. Čiastočne to zdôvodňujeme vysokým obsahom dusíka, teda balastných látok.

Pod mikroskopom sa zymozán javí ako drobné telieska, zvrátené bunky, zbavené vnútorného obsahu, u ktorých je ešte zrejma bunková štruktúra. Skutočnosť, že od začiatku boli bunky vedené v silne hypertonickej roztoku a tak fixované povarením, svedčí o tom, že pre aktivitu zymozánu bude rozhodujúca jeho povrchová štruktúra a adsorpčná schopnosť.

### Návrh na spôsob výroby

Uvádzame len dávky prepočítané na 1 kg droždia, pretože naše zariadenie nám nedovoľovalo použiť vyššie dávky. Predpokladáme, že v prevádzkových podmienkach sa môžu pomery trochu pozmeniť:

1. 1 kg droždia suspendovať v 4 l 0,5 M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (716,3 g) a variť 3 hodiny v nádobe s vmontovaným miešadlom.

2. Po vychladnutí na 37 °C upraviť pH na 7,8–8,0 a pridať 0,5 g trypsínu (Lachema 1 75) prvý deň, 0,3 g tretí deň, 0,2 g šiesty deň. pH upravovať lúhom na 7,8–8,0 prvý až tretí deň dvakrát denne, potom raz denne. Hladinu zmesi zaliť toluénom, aby vytváral na povrchu kompaktný film. Podľa možnosti, i keď veľmi pomaly, stále miešať vmontovaným miešadlom. Zmes udržiavať pri 37 °C.

3. Po 9—11 dňoch (podľa biuretovej skúšky) odstrediť, zachytiť usadeninu, supernatant inaktivovať varom a využiť vo výrobe droždia.

4. Sediment premývať vodovodnou vodou. Najlepšie by bolo premývať protiprúdnym systémom, aby sa zrazenina dostala dobre do styku s vodou. Kvapaliny pre protiprúdne premývanie použiť aspoň osemnásobok objemu pôvodnej zmesi. Odstrediť na mliečnu konzistenciu.

5. Premývanie opakovať horúcou vodou a testovať na cukry, prípadne aminokyseliny, čo je jednoduchšie. Ak sú reakcie pozitívne, premývanie opakovať.

6. Premývanie opakovať destilovanou vodou za použitia asi štvornásobku objemu pôvodnej zmesi. Sediment odstrediť čo možno do sucha.

7. Sediment suspendovať v 1 l 96 % etanolu a centrifugovať alebo filtrovať s podtlakom. Dvakrát opakovať.

8. Sediment suspendovať v 1 l absolútneho alkoholu, miešať pol hodiny, centrifugovať alebo filtrovať. Premývanie opakovať, kým supernatant nie je 99,8 %.

9. Sediment odfiltrovať do sucha a sušiť vo vákuu.

10. Suchý prášok suspendovať v 500 ml absolútneho alkoholu, 2 hodiny variť pod refluxom, centrifugovať alebo filtrovať. V prípade, že je supernatant žltý, opakovať horúcu extrakciu. Sediment predsušiť na filtri a dosušiť vo vákuu.

11. Hotový prípravok netreba uskladňovať vo vákuu, ale v zábrusových nádobách.

Prípadná obmena bodu 9: Vysušený prášok uskladňovať v prachovniciach, časť premyť horúcim alkoholom, ako je uvedené pod bodom 10, a nechať urobiť biologický test. Pred expedíciou uskutočniť postup, uvedený pod bodom 10, s ostatným prípravkom.

Pre zvýšenie aktivity výrobku je potrebné suchý prášok rozotrieť a preosiať cez jemné sito.

*Biologické testy sa vykonali na Ústave hematológie a krvnej transfúzie a na Ústave epidemiológie a mikrobiológie v Prahe.*

## Súhrn

Preverovali sa jednotlivé fázy prípravy kvasničného polysacharidu zymozánu s ohľadom na jeho predpokladanú výrobu v našej republike. Experimentálne sa študoval predovšetkým spôsob natravovania, udržiavanie sterility, premývanie zymozánu, sušenie a uchovávanie hotového prípravku. Skúšala sa aj metóda prípravy zymozánu za odstraňovania bielkovín systémom fenol—voda. Na základe výsledkov pokusov autori podávajú návrh na spôsob výroby zymozánu.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ДРОЖЖЕВОГО ПОЛИСАХАРИДА  
ЗИМОЗАНА

А. ГИНТЕРОВА, Л. МИТТЕРХАУЗЕРОВА, М. ГРОДОВСКИ

Центральный исследовательский институт пищевой промышленности  
в Братиславе

## Выводы

Были проверены отдельные фазы приготовления дрожжевого полисахарида зимозана в отношении предполагаемого производства его в нашей республике. Экспериментально был изучен способ переваривания, удерживание стерильности, промывание зимозана, сушение и хранение готового препарата. Также был испытан метод приготовления зимозана способом удаления белков системой фенол—вода. На основании результатов испытаний авторы предлагают способ для производства зимозана.

Поступило в редакцию 27. 3. 1961 г.

## HERSTELLUNG DES HEFEPOLYSACCHARIDS ZYMOZAN

A. GINTEROVÁ, L. MITTERHAUSZEROVÁ, M. GRODOVSKÝ

Zentrales Forschungsinstitut für die Nahrungsmittelindustrie  
in Bratislava

## Zusammenfassung

Die Autoren untersuchten die einzelnen Phasen der Herstellung des Hefepolysaccharids Zymosan im Hinblick auf dessen voraussichtliche Erzeugung in der ČSSR. Experimentell wurden besonders das Verfahren des Abbaus, der Erhaltung der Sterilität, das Durchwaschen des Zymosans, das Trocknen und das Aufbewahren des fertigen Präparats studiert. Es wurde auch die Methode der Herstellung des Zymosans unter Beseitigung der Eiweißstoffe mittels des Systems Phenol—Wasser geprüft. Auf der Grundlage der gewonnenen Versuchsergebnisse unterbreiten die Autoren einen Vorschlag für ein Verfahren zur Herstellung des Zymosans.

In die Redaktion eingelangt den 27. 3. 1961

## LITERATÚRA

1. Pillemer L., Lepow I. H., Blum L., J. Immunol. 71, 339 (1953). — 2. Voluskaja E. N., Čeburkina N. V., Tovarnickij V. I., Nikolskaja I. N., Voprosy med. chimii 5, 143 (1959). — 3. Rutberg R. A., Dokl. Akad. nauk SSSR 125, 931 (1959). — 4. Westfal O., Lüderitz O., Bister F., Z. Naturforschung 7B, 148 (1952).

Došlo do redakcie 27. 3. 1961

*Adresa autorov:**Anastázia Ginterová, C. Sc., inž. Ludmila Mitterhauszerová, inž. Michal Grodovský, Bratislava, Miletičova 14B, Ústredný výskumný ústav potravinárskeho priemyslu.*