

ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY V PRAZE

ČÍSLO 2 4 6 7 7 2

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY V PRAZE
UDĚLIL PODLE § 37, ODS. 1 ZÁKONA
Č. 84/1972 SB. AUTORSKÉ OSVĚDČENÍ
NA VYNÁLEZ, JEHOŽ POPIS JE PŘIPOJEN,
AUTOR VYNÁLEZU:

Podojil Miloslav PhMr.ing.CSc., Hostivice

Řezanka Tomáš RNDr.CSc., Praha

Votápek Václav ing., Třeboň



AUTORSKÉ OSVĚDČENÍ BYLO ZAPSÁNO
DO REJSTŘÍKU VYNÁLEZŮ POD SHORA
UVEDENÝM ČÍSLEM.
VYNÁLEZ JE NÁRODNÍM MAJETKEM.
STÁT MÁ PRÁVO VYUŽÍVAT A POVINNOST
PEČOVAT O CO NEJSÍRSÍ VYUŽÍVÁNÍ
VYNÁLEZU (§ 6 ZÁKONA Č. 84/1972 SB.).

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU PV 10004-84

PŘEDSEDA

V PRAZE 31. října 1988

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

246772
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 7/84

(22) Přihlášeno 19 12 84
(21) (PV 10004-84)

(40) Zveřejněno 17 04 88

(45) Vydáno 15 12 87

(75)

Autor vynálezu

PODOJIL MILOSLAV PhMr. Ing. CSc., HOSTIVICE,
ŘEZANKA TOMÁŠ RNDr. CSc., PRAHA, VOTÁPEK VÁCLAV Ing.,
TŘEBONĚ

(54) Způsob výroby mastných kyselin ze zelených sladkovodních řas

1

Předmětem vynálezu je způsob výroby mastných kyselin ze zelených sladkovodních řas po axenické kultivaci za heterotrofních nebo autotrofních podmínek. Podstatou je, že se řasová biomasa oddělí od kultivačního prostředí, desintegruje, načež se řasová pasta přímo hydrolyzuje 0,8 až 1,0 M NaOH. Získají se frakce lipidů, které se dále dělí extrakcí s vodou nemísitelnými organickými rozpouštědly typu aromatických uhlovodíků, jako např. benzen, nebo alicyklických alkoholů, např. cyklohexanol, nebo alifatických alkoholů, např. 2-methoxy- a 2-ethoxyethanol, nebo alkanolů C₄ a C₅, na dva podíly, a to nezmýdelnitelný a zmýdelnitelný. Ze zmýdelnitelného podílu se po okyselení s výhodou 1 M HCl na pH 1 až 2 extrahují stejnými organickými rozpouštědly mastné kyseliny, uvolněné ze sodných solí a dále analyzují plynovou chromatografií nebo plynovou chromatografií ve spojení s hmotovou spektrometrií.

Vynález se týká způsobu výroby mastných kyselin ze zelených sladkovodních řas, zejména rodu *Chlorella* a *Scenedesmus* po axenické kultivaci za heterotrofních nebo autotrofních podmínek.

V závislosti na rodu a druhu zelené řasy a způsobu kultivace se v buňkách ukládají mastné kyseliny o různém kvalitativním a kvantitativním zastoupení. Nabízí se možnost využití zelených řas k produkci mastných kyselin, resp. lipidů pro potravinářské (B. H. Lee a G. A. Picard, *Canad. Inst. Food Sci. Technol.* J. 15: 58, 1982) nebo medicínské účely (S. Aaronson a Z. Dubinsky, *Experientia* 38: 36, 1982; H. Ito et al., *Cancer Letters* 17: 197, 1982).

Izolace mastných kyselin je komplikována především interasociačními vlivy (schopnost jednotlivých skupin lipidů se navzájem rozpouštět). Známé jsou způsoby izolace směsí mastných kyselin ze zelených řas vycházející z oddělení komplexu lipidů od dalších buněčných složek (polysacharidy, bílkoviny, nukleové kyseliny) podle různých modifikací původní Folchovy metody (M. Kates: *Technika lipidologie, vydělení, analýza a identifikace*; Mir, Moskva 1975).

Protože podstatná část lipidů je vázána na polární vysokomolekulární látky, je nutno lipidy extrahovat dehydratačními činidly která přerušují nekovalentní vazby. Vzhledem k tomu, že většina lipidů není zcela rozpustná ve vysoce polárních rozpouštědlech volí se směs polárního a nepolárního rozpouštědla, např. chloroform-methanol v různém poměru. Po této extrakci se jednotlivé složky lipidů z lipidické frakce uvolní hydrolýzou (kyselou, alkalickou nebo enzymatickou).

Z reakční směsi, obsahující nezmýdelnitelný a zmýdelnitelný podíl, se nejdříve oddělí vytřepáním s vodou nemísitelným rozpouštědlem nezmýdelnitelný podíl, který se skládá většinou z látek, jako steroly, uhlovodíky, alkoholy, terpeny, karotenoidy. V reakční směsi pak zůstává zmýdelnitelný podíl, obsahující směs mastných kyselin, které lze extrahovat po okyselení (uvolnění kyselin ze solí) rozpouštědly s vodou nemísitelnými za současného odstranění všech ve vodě rozpustných složek (sacharidy, glycerol, degradační produkty chlorofylu).

Nevýhodou tohoto postupu je časová (extrakce lipidů trvá kolem 50 h) a z toho plynoucí energetická i aparaturní (dlouhodobý reflux) náročnost.

Zmíněné nedostatky dosud známých postupů se podařilo odstranit způsobem výroby mastných kyselin ze zelených sladkovodních řas podle vynálezu, jehož podstatou je to, že řasová biomasa ve formě dezintegrované pasty se přímo hydrolyzuje 0,8 až 1,0 M NaOH, načež se z reakční směsi nejdříve odstraní nezmýdelnitelný podíl extrakcí s vodou nemísitelnými organickými rozpouštědly, vybranými ze skupiny látek benzen, cyklohexanol, 2-ethoxy- nebo 2-methoxy-e-

thanol, 1-butanol, 1-pentanol a po následném okyselení s výhodou HCl na pH 1 až 2 se mastné kyseliny, uvolněné ze sodných solí, opět extrahují stejnými s vodou nemísitelnými rozpouštědly a potom se organický extrakt odpaří za vakua.

Výsledný produkt je směs mastných kyselin jako bílá, masťovitá hmota. Složení a zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve směsi — důležitého kritéria pro potravinářskou a medicínskou praxi — se určí fyzikálněchemickými metodami jako plynová chromatografie nebo plynová chromatografie — hmotová spektrometrie.

Výhodou postupu podle vynálezu je, že odstraněním jednoho extrakčního stupně se snižuje spotřeba organických rozpouštědel, nároky na kapacitu použitého strojního zařízení a zvyšuje se hospodárnost výroby. K ekonomizaci přispívá i vynechání sušicího stupně (šprejové sušení nebo lyofilizace).

Příklad 1

Dezintegrovaná řasová biomasa (1 000 g), připravená po axenické kultivaci řasy *Chlorella kessleri* za heterotrofních podmínek, byla hydrolyzována za varu 1 M NaOH (200 ml, 4 h). Nezmýdelnitelný podíl byl odstraněn vytřepáním do cyklohexanolu (3 × 3 000 ml). Vodná vrstva byla okyslena na pH 1 (1 M HCl) a směs volných mastných kyselin byla extrahována 2-ethoxyethanolem (3 × 3 000 ml).

Vakuovým odpařením rozpouštědla za teploty 40 až 50 °C byla získána směs mastných kyselin jako bílá hmota masťovité konzistence (64,2 g). Mastné kyseliny v této směsi byly děleny, identifikovány a kvantifikovány známým způsobem (T. Řezanka se spol., *J. Chromatography* 268: 71, 1983; T. Řezanka a M. Podojil, *Lipids* 19, 472, 1984).

Příklad 2

Při izolaci směsi mastných kyselin z dezintegrované řasy *Chlorella kessleri* (1 000 gramů) po axenické kultivaci za autotrofních podmínek se postupuje obdobně jako v příkladě 1, s použitím 2-ethoxymethanolu pro odstranění nezmýdelnitelného podílu a 2-methoxyethanolu pro extrakci směsi mastných kyselin, s výtěžkem 32,2 g o zastoupení mastných kyselin, uvedeném v práci T. Řezanka se spol., *J. Chromatography* 268: 71, 1983.

Příklad 3

Při izolaci směsi mastných kyselin z dezintegrované řasy *Scenedesmus acuminatus* (1 000 g) po axenické kultivaci za autotrofních podmínek se postupuje obdobně jako v příkladě 1, s použitím benzenu pro odstranění nezmýdelnitelného podílu a 1-pentanolu pro extrakci směsi mastných kyselin, s výtěžkem 13,9 g.

Všechny tyto frakce mastných kyselin se vyznačují příznivým účinkem v laboratorních kožních testech na zvířeti a lze perspektivně předpokládat, že mohou nalézt využití v dermatologii jako léčebný preparát pro řadu dermatos s poruchou rohovatění. Způsob výroby podle vynálezu je vhodný

pro průmyslové zpracování velkých množství řasové biomasy. Výtěžnost extrakce směsí mastných kyselin je prakticky kvantitativní na strojních zařízeních běžných při farmaceutické výrobě a odpadá řada důležitých technologických úkonů, nezbytných při klasickém způsobu izolace.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby mastných kyselin ze zelených slakovodních řas, vyznačující se tím, že řasová biomasa ve formě dezintegrované pasty se přímo hydrolyzuje 0,8 až 1,0 M NaOH, načež se z reakční směsi nejdříve odstraní nezmýdelnitelný podíl extrakcí s vodou nemísitelnými organickými rozpouštědly, vybranými ze skupiny látek benzen,

cyklohexanol, 2-ethoxy- nebo 2-methoxy-ethanol, 1-butanol, 1-pentanol a po následném okyselení s výhodou HCl na pH 1 až 2 se mastné kyseliny, uvolněné ze sodných solí, opět extrahují stejnými s vodou nemísitelnými organickými rozpouštědly a potom se extrakt odpaří za vakua.