

Sposób wytwarzania autolizatów drożdżowych

- 5 Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania autolizatów drożdżowych pozwalający na otrzymywanie autolizatów o unikalnym składzie aminokwasowym, o zwiększonej zawartości hydroksyproliny.

Autolizaty drożdżowe ze względu na swój skład chemiczny znajdują zastosowanie w me-
10 dycynie, przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Są one źródłem m.in. wolnych aminokwasów, w tym aminokwasów egzogennych, stanowiących substraty do biosyntezy hormonów, koenzymów czy też niektórych neuroprzekaźników.

Autolizaty otrzymuje się z drożdży z rodzaju *Saccharomyces* uprzednio do tego celu
15 namnożonych lub drożdży pofermentacyjnych po produkcji piwa lub wina, w wyniku powolnej autolizy naturalnej lub przebiegającej znacznie szybciej autolizy indukowanej. Autoliza indukowana jest wywołana celowo poprzez działanie induktorów fizycznych: temperatury, homogenizacji, ciśnienia osmotycznego oraz induktorów chemicznych: enzymów, detergentów, soli. Skład chemiczny uzyskiwanych autolizatów zależy od spo-
20 sobu prowadzenia procesu autolizy oraz od rodzaju/gatunku zastosowanych drożdży [Berłowska i in., 2017; Jacob i in., 2019]. Najczęściej do autolizy stosuje się drożdże klasyczne z rodzaju *Saccharomyces*, rzadziej inne drożdże przemysłowe z rodzajów *Kluyveromyces*, *Scheffersomyces*, lub *Pichia*.

25 Drożdże z rodzaju *Metschnikowia* to saprofityczne drożdże niekonwencjonalne, które coraz częściej znajdują zastosowanie w różnych procesach biotechnologicznych. W publikacji opracowanej przez największe światowe jednostki opiniotwórcze i przemysłowe, laboratoria i stowarzyszenia sektora spożywczego, drożdże *M. pulcherrima* znalazły się na liście mikroorganizmów biotechnologicznie przydatnych [Bourdichon i in., 2012].
30 *Metschnikowia* sp. znajdują zastosowanie jako naturalne biopestycydy które skutecznie zwalczają patogeny roślin uprawnych, zwłaszcza pleśni z rodzajów: *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus* i *Aspergillus* rozwijających się na truskawkach, jabłkach, owocach cytrusowych

i winogronach [Janisiewicz i in., 2001; Pawlikowska i in., 2019a]. *Metschnikowia* sp. znalazły zastosowanie także w produkcji win niskoalkoholowych [Contreras i in., 2015] oraz znany jest ich potencjał do odtleniania brzeczek fermentacyjnych [Pawlikowska i in., 2019b].

5

Celem wynalazku jest dostarczenie autolizatów drożdży o unikalnym składzie aminokwasowym, zwłaszcza o zwiększonej zawartości hydroksyproliny, będącej głównym składnikiem kolagenu (13,5%) u ssaków, która ma decydujące znaczenie dla wytrzymałości mechanicznej kolagenu.

10

Sposób wytwarzania autolizatów drożdżowych na drodze autolizy indukowanej, według wynalazku polega na tym, że stosuje się zawiesinę komórkową drożdży *Metschnikowia* sp. w wodzie o koncentracji komórek $10^7 - 10^{10}$ jtk/ml, przy czym jako induktory autolizy stosuje się induktory chemiczne w postaci soli NaCl lub innych soli nieorganicznych o stężeniu 1-5% w/v lub organiczne detergenty w stężeniu 0,005-1% w/v.

15

Korzystnie stosuje się zawiesinę otrzymaną z pochodowlanej lub pofermentacyjnej biomasy drożdży *Metschnikowia* sp.

20 Korzystnie jako organiczne detergenty stosuje się czystą saponinę *Quillaja saponaria*, korzystnie w ilości 0,008 % wagowych.

Korzystnie jako chemiczny induktor autolizy w postaci soli stosuje się NaCl.

25 Korzystnie się proces autolizy prowadzi w czasie od 12 godzin do 48 godzin w temperaturze od 40 do 60°C.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

30 **Przykład 1**

W celu otrzymania autolizatów drożdżowych przygotowano dwie zawiesiny komórkowe drożdży browarniczych: (1) *Saccharomyces cerevisiae* rasy TT oraz (2) drożdży *Metschni-*

kowia sinensis, o gęstości 10^9 komórek/ml. Wykorzystano komórki pochodzące z hodowli tlenowych. Jako induktor procesu autolizy komórkowej zastosowano NaCl w ilości 5 % wagowych w stosunku do masy komórek drożdży. Proces prowadzono 48 godzin w temperaturze 50 ± 2 °C. Po odwirowaniu biomasy, w otrzymanych autolizatach oznaczono białko, stosując analizę spektrometryczną IR w systemie Direct Detect®, wolny azot amonowy FAN wykorzystując reakcję barwną z ninhydriną oraz wyznaczono chromatograficznie profile aminokwasowe. Wyniki oznaczeń zawartości białka, wolnego azotu amonowego FAN oraz profile aminokwasowe w otrzymanych autolizatach drożdżowych przedstawiono w tabeli 1.

10

Tabela 1. Porównanie składu chemicznego autolizatów drożdży otrzymanych w wyniku działania soli NaCl

Oznaczenie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Metschnikowia sinensis</i>
Białko [mg/mL]	3,38	2,53
FAN [mg/mL]	1654,01	1029,34
Aminokwasy [pmol]		
Asp	562,984	17,149
Glu	1034,588	591,600
HPro	0,723	3,026
Ser	778,927	218,143
Gly	1019,285	450,335
His	477,457	495,312
Arg	760,038	770,449
Thr	1160,429	238,916
Ala	2301,046	1496,341
Pro	967,044	435,272
Tyr	341,466	202,310
Val	2336,985	1067,713
Met	535,856	79,814
	27,216	22,349

Cys-Cys	1975,911	676,317
Ile	2719,502	1067,706
Leu	1294,308	265,492
Phe	477,270	736,019
Lys		

Uzyskane wyniki wskazują, że autolizaty drożdży *Metschnikowia* sp. uzyskane po działaniu induktora NaCl wykazują odmienny profil chemiczny, zwłaszcza profil wolnych aminokwasów. Pula poszczególnych aminokwasów w autolizatach tych drożdży była podobna lub niższa w porównaniu do autolizatów *S. cerevisiae*, jednak zawartość dwóch ważnych aminokwasów: hydroksyproliny oraz lizyny w autolizatach *M. sinensis* była 2-4 krotnie wyższa. Hydroksyprolina jest głównym składnikiem kolagenu (13,5%) u ssaków. Obok proliny, hydroksyprolina ma decydujące znaczenie dla wytrzymałości mechanicznej kolagenu. Lizyna z kolei uczestniczy w procesach odnowy tkanek, tworzenia przeciwciał, stymulacji wzrostu, a także wytwarzania hormonów i enzymów.

Przykład 2

W celu otrzymania autolizatów drożdżowych przygotowano dwie zawiesiny komórkowe: (1) drożdży browarniczych *Saccharomyces cerevisiae* rasy TT oraz (2) szczepu *Metschnikowia sinensis*, o gęstości 10^8 - 10^9 komórek/ml. Wykorzystano komórki pochodzące z hodowli tlenowych. Jako induktor procesu autolizy komórkowej zastosowano czystą saponinę *Quillaja saponaria* w ilości 0,008 % wagowych w stosunku do masy komórek drożdży. Proces prowadzono 48 godzin w temperaturze $50 \pm 2^\circ\text{C}$. Po odwirowaniu biomasy, w otrzymanych autolizatach oznaczono białko, stosując analizę spektrometryczną IR w systemie Direct Detect®, wolny azot amonowy FAN wykorzystując reakcję barwną z ninhydriną oraz wyznaczono chromatograficznie profile aminokwasowe. Wyniki oznaczeń zawartości białka, wolnego azotu amonowego FAN oraz profile aminokwasowe w otrzymanych autolizatach drożdżowych przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Porównanie składu chemicznego autolizatów drożdży otrzymanych w wyniku działania saponiny

Oznaczenie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Metschnikowia sinensis</i>
Białko [mg/mL]	7,87	5,48
FAN [mg/mL]	2102,33	1127,34
Aminokwasy [pmol]		
Asp	587,116	141,110
Glu	1077,040	1624,442
HPro	0,796	4,256
Ser	797,930	49,006
Gly	1057,360	410,372
His	497,641	391,872
Arg	731,864	4,448
Thr	1060,617	84,581
Ala	2298,626	1075,784
Pro	1011,167	133,284
Tyr	340,773	88,714
Val	2432,030	752,298
Met	557,208	65,968
Cys-Cys	28,028	36,404
Ile	2054,942	413,970
Leu	2831,512	708,523
Phe	1310,796	116,841
Lys	497,510	183,868

Uzyskane wyniki wskazują, że autolizaty drożdży *Metschnikowia* sp. uzyskane po działaniu induktora - saponiny wykazują odmienny profil chemiczny, zwłaszcza profil wolnych aminokwasów. Pula poszczególnych aminokwasów w autolizatach tych drożdży była niższa w porównaniu do autolizatów *S. cerevisiae*, jednak zawartość hydroksyproliny a także innych ważnych aminokwasów: kwasu glutaminowego oraz cysteiny była 0,5-5 krotnie wyższa. Kwas glutaminowy jest ważnym neuroprzekaznikiem. Cysteina jest także aminokwasem endogennym, niezbędnym w biosyntezie kwasów tłuszczowych, a także licznych estrów i amidów oraz w przemianach katabolicznych.

Przedstawione wyniki dowodzą, że autolizaty drożdży *Metschnikowia* sp. mogą być stosowane w postaci mono-autolizatów lub mogą wzbogacać autolizaty klasycznych drożdży *S. cerevisiae* w deficytowe aminokwasy, zwłaszcza hydroksyprolinę, lizynę, cysteinę oraz kwas glutaminowy.