

## **Sposób otrzymywania biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* o zwiększonej odporności na stres osmotyczny i zastosowanie biomasy**

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania biomasy drożdży szlachetnych *Saccharomyces cerevisiae* o zwiększonej odporności na stres osmotyczny i zastosowanie biomasy do produkcji odpornej na niekorzystne warunki osmotyczne biomasy fermentacyjnej, dodatku spożywczego i suplementu diety.

W procesie fermentacji drożdże utylizują cukry proste przetwarzając je w warunkach beztlenowych na alkohol oraz energię. W wyniku tych procesów zmieniają się warunki fizykochemiczne panujące w brzeczce nastawnej, wraz ze zmniejszeniem stężenia cukrów prostych rośnie zawartość etanolu oraz ubocznych produktów procesu fermentacji. Dynamika tych procesów jest zróżnicowana i zależy głównie od typu drożdży oraz stężenia początkowego cukrów. Każdy szczep drożdży ma swoje warunki optymalne, których przekroczenie powoduje obniżenie dynamiki oraz wydajności procesu ze względu na niekorzystne ciśnienie osmotyczne.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* znane są już od czasów starożytnych i obecnie są szeroko wykorzystywane w przemyśle spożywczym, a także do produkcji bioetanolu. Drożdże te dostarczane są w kilku postaciach: prasowanej, wysuszonej lub liofilizowanej. Używać je do produkcji można dopiero po zalaniu wodą, gdy powstaje tzw. mleczko drożdżowe i kiedy to po jej wchłonięciu komórki drożdży odzyskują aktywność biologiczną. *Saccharomyces cerevisiae* jest szczepem kandydatem odpowiednim do długoterminowej hodowli drobnoustrojów na dużą skalę i jest uważany za najbardziej potencjalny szczep do produkcji na dużą skalę. *Saccharomyces cerevisiae* ma zalety krótkiego cyklu wzrostu, silnej zdolności fermentacyjnej i łatwej hodowli na dużą skalę. Od zawsze był głównym przedmiotem badań podstawowych i stosowanych i jest szeroko stosowany w żywności, medycynie i innych dziedzinach. *Saccharomyces cerevisiae* jest również używany do fermentacji innych ważnych przemysłowo metabolitów.

W ostatnich latach zwraca się coraz większą uwagę na dobór drożdży wykazujących dużą odporność na niekorzystne warunki środowiskowe.

Jak wynika z publikacji autorstwa dr inż. Moniki CIOCH-SKONECZNY, inż. Agnieszki PITEK, dr. hab. inż. Pawła SATORY, prof. UR i mgr inż. Anety PATER pt. Rehydratacja drożdży piwowarskich (w: Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, 2018, Tom nr 2, str. 79-83, <http://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-d470b232-c3d7-48b7-a15b-29ba364cb0fb>) celem rehydratacji jest przywrócenie materiałowi poddanemu suszeniu, poprzez jego kontakt z wodą, właściwości jakie miał przed tym zbiegiem. W trakcie procesu tkanki wysuszonego materiału chłoną wodę, co skutkuje zwiększeniem jego masy i objętości oraz wypłukiwaniem substancji, m.in. cukrów, kwasów, minerałów i witamin, z rehydratowanego surowca. Ubytek rozpuszczalnych składników suchej substancji podczas ponownego uwodnienia uzależniony jest przede wszystkim od składu chemicznego i struktury materiału. Proces ponownego uwodnienia drożdży jest kluczowy, aby mogły one odzyskać aktywność metaboliczną i przeprowadzić fermentację. Przeżywalność komórek podczas suszenia uzależniona jest od stanu w jakim były przed rozpoczęciem procesu. Istotny jest dobór odpowiednich parametrów rehydratacji, które w dużym stopniu uzależnione są od rodzaju użytego szczepu. Aktywne suszone drożdże zawierają około 8% wody. Jest to ilość niewystarczająca, aby komórki mogły odzyskać aktywność metaboliczną. Rehydratacja jest więc koniecznym procesem przed wprowadzeniem ich do brzeczki. Istnieje wiele czynników, które wywierają wpływ na żywotność drożdży podczas tego procesu. To m.in. wewnątrzkomórkowe stężenie trehalozy, długość i temperatura uwadniania, pH pożywki, obecność składników pokarmowych, mineralnych oraz dostępność ergosterolu. Wymienione czynniki mają wpływ na strukturę membrany przez modyfikację przepuszczalności, powodując zmiany w przepływie cząsteczek i jonów, które determinują stopień żywotności nawodnionych komórek drożdży. Temperatura rehydratacji aktywnych suszonych drożdży mieści się w zakresie 35-40°C.

Aby komórki zostały uwodnione w bezpiecznych warunkach wymagane jest by woda, w której przeprowadza się proces rehydratacji miała około 25 ppm zawartości minerałów. Gdy ich stężenie wewnątrz komórki drożdży jest wyższe niż w otaczającym środowisku, zgodnie z prawem osmozy, woda będzie napływać do jej środka, powodując rozerwanie. Z tego powodu, woda destylowana nie jest dobrym medium nawadniającym aktywne suszone

drożdże. Jony wapnia i glukoza mogą przeciwdziałać nadmiernemu wypływowi substancji wewnątrzkomórkowych z rehydratowanych komórek. Pierwsze zwiększają sztywność konstrukcji membranowej, oddziałując na naprawę uszkodzonych błon cytoplazmatycznych. Glukoza natomiast przenikając do wnętrza komórki, stymuluje tworzenie się żeli białkowych, których obecność zapobiega dyfuzji substancji wewnątrzkomórkowych.

W procesie odwadniania, suszenia drożdży, utrata wody jest oczywistym i znaczącym stresem dla drożdży, a niektóre badania określają ją jako kluczowy czynnik, odpowiedzialny za zmniejszenie ich żywotności. Istnieje również wiele niekorzystnych czynników, takich jak stres oksydacyjny i osmotyczny. Wypływ i napływ wody z komórki podczas odwadniania i rehydratacji, może powodować jej uszkodzenia i niszczyć samą strukturę błony komórkowej. Uważa się, że obkurczanie komórek może powodować ich rozerwanie w czasie stresu osmotycznego. Ponadto, prowadzi również do niepożądanych interakcji molekularnych w komórce. Istnieją mechanizmy u drożdży, które podnoszą ich odporność na stres osmotyczny. Błona komórkowa zawiera białka błonowe, tj. akwaporyny, które w pewnych okolicznościach mogą ułatwiać napędzany osmotycznie wypływ wody, zmniejszając uszkodzenie membrany. Pod wpływem szoku osmotycznego indukowany jest szlak kinaz MAP-HOG. Ma to na celu akumulację glicerolu w komórce, co skutkuje wyrównaniem osmolarności wewnątrz i na jej zewnątrz. Chroni to komórkę przed potencjalnymi uszkodzeniami związanymi ze zwiększonym ciśnieniem osmotycznym.

Jak wynika z publikacji Włodzimierza Grajka i Darii Szymanowskiej, pt. Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej, w: Prace przeglądowe, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań, 2008, str. 46-63, jednym z głównych metabolitów drożdży gromadzonych w komórce w sytuacjach stresowych jest trehaloza, a rolą tego cukru jest ochrona stabilności uwodnionych związków chemicznych oraz uszczelnianie błon, co zapobiega utracie elektrolitów i rozpuszczalnych składników komórkowych. Dodatkowo w procesie fermentacji na potrzeby produkcji alkoholu stosuje się w celu zmniejszenia stresu osmotycznego dwustopniową hydrolizę skrobi lub proces jednoczesnej hydrolizy skrobi i fermentacji etanolowej. Prowadzone są próby zmniejszania ciśnienia osmotycznego wywołanego przez etanol, polegające na ciągłym usuwaniu etanolu z fermentującego zacieru. Komórki ograniczają działanie stresu osmotycznego poprzez redukcję objętości komórek, co ma negatywny wpływ na żywotność komórek. Pod wpływem

stresu osmotycznego, obok zmniejszenia powierzchni komórki, mogą wystąpić także uszkodzenia błony cytoplazmatycznej. Dotyczy to szczególnie zmian w białkach błonowych, które, przy silnym odwodnieniu wywołanym przez wiązanie wody przez zewnątrzkomórkową substancję osmogenną, ulegają denaturacji lub agregacji. Zmiany te można obserwować stosując spektroskopię transformacji Fouriera w podczerwieni. Substancje osmogenne, a szczególnie cukry i alkohole, wykazują działanie ochronne, stabilizujące cząsteczki białek. Innym efektem zmian w ciśnieniu osmotycznym są poprzeczne przemieszczenia kwasów tłuszczowych w dwuwarstwie fosfolipidowej.

W celu zmniejszenia stresu osmotycznego wytwarzane są zmodyfikowane genetycznie szczepy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* o wysokiej odporności na stres osmotyczny.

Z opisu zgłoszeniowego CN112941119 znany jest sposób otrzymywania zmodyfikowanego szczepu *Saccharomyces cerevisiae* wytwarzającego ester etylowy kwasu tłuszczowego, który poprawia produkcję estrów etylowych kwasu tłuszczowego w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, obejmujący m.in. etap fermentacji i hodowli *Saccharomyces cerevisiae* w czasie 30-40 godzin, w trakcie którego dodaje się 1-3% oleju rzepakowego oraz etanol z szybkością przepływu 6-10 ml/h; gdy stężenie glukozy jest niższe niż 4-6 g/L, rozpoczyna się suplementacja glukozą, a stężenie glukozy w fermentorze jest utrzymywane na poziomie 5-10 g/L. Po fermentacji otrzymuje się bulion fermentacyjny zawierający ester etylowy kwasu tłuszczowego. Podczas procesu fermentacji i hodowli pH utrzymuje się na poziomie 5-6, prędkość obrotowa 180-220 obr./min przez 30-40 godzin przed fermentacją, przepływ powietrza 2-3 vvm, prędkość obrotowa po 30-40 h wynosi 350-450 obr./min, a przepływ powietrza wynosi 4-6 vvm. Jako pożywkę fermentacyjną stosuje się: glukozę 50-70, YNB 6-7, proszek drożdżowy 15-20, pepton 2-4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7-8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9-10, kwas octowy 2-4.

Celem wynalazku ujawnionego w opisie zgłoszeniowym CN1944657A jest rozwiązanie problemu tolerancji alkoholu przez *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji zacieru zagęszczającego alkohol oraz zmniejszenie toksycznego wpływu alkoholu o wysokim stężeniu na *Saccharomyces cerevisiae*, zapewniając w ten sposób sposób poprawy tolerancji *Saccharomyces cerevisiae* na alkohol. Obecność kwasów tłuszczowych, zwłaszcza długołańcuchowych, w błonie komórkowej, może osłabiać wpływ etanolu na

przepuszczalność błony komórkowej i zmniejszać wysięk lizatów wewnątrzkomórkowych. Tolerancja bakterii na alkohol wzrasta wraz ze wzrostem nienasyceń błon komórkowych kwasami tłuszczowymi. W wynalazku tym stosuje się proszek sojowy jako promotor fermentacji w fermentacji alkoholowej. Z jednej strony soja bogata w białko i kwasy tłuszczowe może sprawić, że *Saccharomyces* będą opierać się zwiększonej płynności błony spowodowanej przez alkohol i utrzymać stabilność błony komórkowej.

W opisie zgłoszeniowym JPS6460370A ujawniono sposób hodowli drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, w którym do pożywki modyfikowanego szczepu dodaje się lipid – kwas tłuszczowy o 10-26 atomach węgla lub jego sól, korzystnie kwas mirystynowy, kwas palmitynowy, kwas palmitoleinowy, kwas oleinowy, kwas t-wacenowy, kwas linolowy i kwas arachidonowy i/lub regulator ciśnienia osmotycznego, np. sorbitol. Korzystnie lipid łączy się z regulatorem ciśnienia osmotycznego. Kwas tłuszczowy dodaje się do pożywki w stężeniu około 0,005-0,4% (wag./obj.), korzystnie 0,01-0,2%. Gdy doda się go w stężeniu mniejszym niż 0,005%, nie można uzyskać pożądaných efektów, a gdy zostanie dodany w stężeniu większym niż 0,4%, produkcja może się zmniejszyć. Chociaż kwas tłuszczowy na ogół dodaje się do pożywki w odpowiedniej ilości przed rozpoczęciem inkubacji, można go dodać na początkowym etapie inkubacji.

Z opisu patentowego PL218665 znany jest sposób otrzymywania mlecza drożdżowego na bazie drożdży, wody i substancji odżywczych, znamienny tym, że do zbiornika wlewa się wodę o temperaturze 20 - 35°C w ilości 50 -70% ogólnej masy przygotowywanego mlecza i wrzuca się drożdże w ilości 30 - 50% ogólnej masy, po czym uruchamia się proces mieszania w czasie 1 do 2,5 godziny, a następnie w czasie 3 do 5 godzin dodaje się w ratach substancję odżywczą w ilości 0 - 15%, a do zbiornika poprzez przewody napowietrzające doprowadza się tlen.

Brak jest obecnie sposobów, które w sposób inny niż w drodze modyfikacji szczepu drożdży *S. cerevisiae*, pozwalają na wytworzenie biomasy charakteryzującej się znaczną akumulacją wielonienasyconych kwasów tłuszczowych: kwasu linolowego C18:2 n-6 oraz kwasu linolenowego C18:3 n-3 (ALA) w ścianie komórkowej drożdży *S. cerevisiae* oraz odpornością na stres osmotyczny.

Celem wynalazku jest rozwiązanie problemu technicznego dotyczącego biomasy drożdży *S. cerevisiae* polegającego na zwiększeniu odporności komórek drożdży *S. cerevisiae* na stres osmotyczny panujący w medium fermentacyjnym i zwiększeniu akumulacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych kwasu linolowego C18:2 n-6 oraz kwasu linolenowego C18:3 n-3 (ALA) w ścianie komórkowej drożdży *S. cerevisiae*.

Sposób otrzymywania biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* o zwiększonej odporności na stres osmotyczny, w którym prowadzi się proces rehydratacji suchej masy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w wodzie o temperaturze 20<sup>0</sup>C z dodatkiem substancji odżywczych i doprowadzaniem tlenu charakteryzuje się według wynalazku tym, że do suchej masy drożdży w ilości 0,98%-2,65% ogólnej masy przygotowywanej biomasy wlewa się wodę demineralizowaną w ilości 88,21-97,69% ogólnej masy przygotowywanej biomasy, zawierającą rozpuszczone jony wapnia w ilości 144 - 180mg/dm<sup>3</sup>, potasu w ilości 286 - 716mg/dm<sup>3</sup>, magnezu w ilości 100 - 160mg/dm<sup>3</sup>, azotu amonowego w ilości 106 - 360mg/dm<sup>3</sup>, cynku w ilości 45 - 68mg/dm<sup>3</sup> oraz glukozę w ilości 9,80 - 35,30g/dm<sup>3</sup>, miesza się przez 5 godzin z prędkością 130 obr./min w temperaturze 20<sup>0</sup>C, a następnie po 5 godzinach dodaje się do mieszaniny estry etylowe kwasów tłuszczowych w ilości od 0,1% do 5% na 1dm<sup>3</sup> wody, a następnie kondycjonuje się biomasę mieszając składniki z prędkością 130 obr./min w ciśnieniu atmosferycznym od 300 do 800 mbar z udziałem tlenu.

Korzystnie stosuje się drożdże *Saccharomyces cerevisiae* SafSpirit M-1.

Korzystnie stosuje się estry etylowe kwasów tłuszczowych z oleju lnianego.

Korzystnie biomasę odwirowuje się, po czym mrozi się w temperaturze od -40<sup>0</sup>C do -75<sup>0</sup>C i następnie poddaje się procesowi liofilizacji przez 24 h w temperaturze 20<sup>0</sup>C i przy ciśnieniu 0,8-0,08 mbar.

Korzystnie biomasę odwirowuje się, po czym mrozi się w temperaturze od -40<sup>0</sup>C do -75<sup>0</sup>C i następnie poddaje się procesowi liofilizacji przez 24 h w temperaturze 35<sup>0</sup>C i przy ciśnieniu 0,08-0,03 mbar.

Korzystnie uzyskuje się biomasę drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci mlecza albo w postaci suchej.

Istotą wynalazku jest także zastosowanie biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako dodatku spożywczego.

Istotą wynalazku jest także zastosowanie biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako suplementu diety.

Istotą wynalazku jest także zastosowanie biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako prekursora do otrzymywania biomasy fermentacyjnej o zwiększonych parametrach fermentacyjnych.

Sposób według wynalazku pozwala na znaczną akumulację kwasów tłuszczowych C18:2 n-6 oraz C18:3 n-3 (ALA) w komórkach drożdżowych, w taki sposób że:

- otrzymana biomasa w postaci mlecza może mieć zastosowanie jako prekursor do produkcji odpornej na niekorzystne warunki osmotyczne biomasy fermentacyjnej, jako dodatek spożywczy – w tym dodatek piekarski oraz jako suplement diety;
- otrzymana biomasa po procesie liofilizacji, tj. w postaci suchej, może pełnić funkcje zarówno jako środek spożywczy cechujący się wysoką zawartością łatwo-przyswajalnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych lub suplement diety, jak również jako osmoaktywna biomasa z zastosowaniem do fermentacji brzeczek o wysokiej zawartości cukrów.

Dzięki sposobowi według wynalazku pozwalającemu na kondycjonowanie drożdży *S. cerevisiae* w pożywce bogatej w estry etylowe kwasów tłuszczowych z oleju lnianego oraz cukry proste powstaje biomasa, która akumuluje w swojej ścianie komórkowej nienasycone kwasy tłuszczowe C18:2 n-6 oraz C18:3 n-3 (ALA). Akumulacja ta wpływa pozytywnie na zachowanie turgoru komórki - komórki nie odwadniają się w warunkach silnego stresu osmotycznego, zwiększenie dynamiki procesu - ilość gramów etanolu uzyskana ze 100ml podłoża w trakcie 1 godziny.

Wynalazek został bliżej przedstawiony w przykładach realizacji:

### **Przykład 1a**

Tabela 1 przedstawia kompozycję biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci mlecza drożdżowego, w której składniki zostały połączone z zastosowaniem minimalnego dozowania poszczególnych bioaktywnych substancji. Składniki mlecza przy zachowaniu odpowiednich warunków procesowania pozwalają na uzyskanie biomasy o wysokiej

tolerancji na stresy osmotyczne. W zależności od celu produkcji biomasy można stosować różne dawkowanie estrów etylowych kwasów tłuszczowych oleju lnianego.

Tabela 1. Kompozycja biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci mlecza drożdżowego z zastosowaniem minimalnych dawek składników

<b>Składnik</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udział %</b>
<b>Drożdże <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	10,0	0,98
<b>Woda demineralizowana</b>	1000,0	97,69
<b>Chlorek wapnia</b>	0,4	0,04
<b>Wodorofosforan (V) potasu KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,0	0,10
<b>Siarczan (VI) Amonu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,5	0,05
<b>Siedmiowodny Siarczan (VI) Cynku 7 H<sub>2</sub>O x ZnSO<sub>4</sub></b>	0,2	0,02
<b>Siarczan (VI) Magnezu MgSO<sub>4</sub></b>	0,5	0,05
<b>Glukoza</b>	10,0	0,98
<b>Estry etylowe kwasów tłuszczowych oleju lnianego</b>	1,0	0,10
<b>Suma</b>	1023,6	100,00

Drożdże szlachetne *Saccharomyces cerevisiae* SafSpirit M-1 przygotowuje się poprzez odważenie 10g suchej masy. Suchą masę drożdży umieszcza się w bioreaktorze z mieszadłem (130 obr./min), dodaje się 1dm<sup>3</sup> wody demineralizowanej o temperaturze 20°C, zawierającej rozpuszczone jony: wapnia w ilości 144mg/dm<sup>3</sup>, potasu w ilości 286mg/dm<sup>3</sup>, magnezu w ilości 100 mg/dm<sup>3</sup>, azotu amonowego w ilości 106 mg/dm<sup>3</sup>, cynku w ilości 45mg/dm<sup>3</sup> oraz glukozę w ilości 9,80 g/dm<sup>3</sup>.

Prowadzi się proces rehydratacji drożdży przez 5 godzin zachowując stałą temperaturę płaszczu bioreaktora 20°C. Po wskazanym czasie dodaje się do mieszaniny estry etylowe kwasów tłuszczowych oleju lnianego w ilości 1g estrów na 1dm<sup>3</sup> wody demineralizowanej, co stanowi stężenie 0,1%.

Następnie prowadzi się proces zgodnie z wytycznymi z Tabeli 2. Przez cały czas miesza się z częstotliwością 130 obr./min.

Tabela 2. Wytyczne dla procesu kondycjonowania biomasy drożdżowej

<b>Czas trwania procesu</b>	<b>Próżnia</b>	<b>Napowietrzanie</b>
<b>2h</b>	Ciśnienie atmosferyczne	2 dm <sup>3</sup> /min
<b>2h</b>	Próżnia 300 mbar	0 dm <sup>3</sup> /min
<b>2h</b>	Ciśnienie atmosferyczne	2 dm <sup>3</sup> /min
<b>2h</b>	Próżnia 300 mbar	0 dm <sup>3</sup> /min

Napowietrzanie biomasy prowadzi się przez odpowiedni króciec, powietrzem podanym przez pompkę lub z butli przy zachowaniu odpowiedniej czystości - bezpośrednio przed wlotem powietrza do bioreaktora, filtr 0,14µm.

### **Przykład 1b**

Uzyskaną w Przykładzie 1a biomasę drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci mlecza drożdżowego wykorzystuje się bezpośrednio lub prowadzi się przetwarzanie celem uzyskania suchych drożdży.

Mleczko poddaje się rozdziałowi w rozdzielaczu. Faza niepolarna zbiera w górnej warstwie, natomiast faza wodna zawierająca komórki drożdżowe w dolnej warstwie rozdzielacza. Po rozdzieleniu faz płyn niezwłocznie poddaje się rozdzieleniu w baktofudze.

Do baktofugi pracującej przy obrotach 5000 obr./min podaje się strumień mlecza z natężeniem objętościowym 30ml/min. Uzyskaną w ten sposób odwirowaną biomasę rozkłada się na tackach i mrozi szokowo w temperaturze -40°C przez 24h.

Po tym czasie tacki umieszcza się w komorze liofilizatora. Liofilizację prowadzi się w temperaturze tacy 20°C, ciśnieniu 0,8mbar, przez 24h.

W wariantcie wykonania odwirowaną biomasę rozkłada się na tackach i mrozi szokowo w temperaturze -75°C przez 24h, a po tym czasie liofilizację prowadzi się w temperaturze tacy 20°C, ciśnieniu 0,08mbar, przez 24h.

Uzyskany po liofilizacji proszek pakuje się próżniowo stosując próżnię rzędu 30mbar.

**Przykład 2a:**

Tabela 3 przedstawia kompozycję biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci mlecza drożdżowego, gdzie składniki zostały połączone z zastosowaniem maksymalnych dawek poszczególnych substancji. Składniki mlecza przy zachowaniu odpowiednich warunków procesowania pozwalają na uzyskanie biomasy o wysokiej tolerancji na stropy osmotyczne. W zależności od celu produkcji biomasy można stosować różne dawkowanie estrów etylowych kwasów tłuszczowych oleju lnianego.

Tabela 3. Kompozycja biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci mlecza drożdżowego z zastosowaniem maksymalnych dawek składników

<b>Składnik</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udział %</b>
<b>Drożdże <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	30,0	2,65
<b>Woda demineralizowana</b>	1000,0	88,21
<b>Chlorek wapnia</b>	0,6	0,05
<b>Wodorofosforan (V) potasu KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	3,0	0,26
<b>Siarczan (VI) Amonu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	2,0	0,18
<b>Siedmiowodny Siarczan (VI) Cynku 7 H<sub>2</sub>O x ZnSO<sub>4</sub></b>	0,4	0,04
<b>Siarczan (VI) Magnezu MgSO<sub>4</sub></b>	0,9	0,08
<b>Glukoza</b>	40,0	3,53
<b>Estry etylowe kwasów tłuszczowych oleju lnianego</b>	56,7	5,00
<b>Suma</b>	1176,9	100,00

Drożdże szlachetne *Saccharomyces cerevisiae* SafSpirit M-1 przygotowuje się poprzez odważenie 30g suchej biomasy. Suchą masę drożdży umieszcza się w bioreaktorze z mieszadłem (130 obr./min), dodaje się 1dm<sup>3</sup> wody demineralizowanej o temperaturze 20°C, zawierającej rozpuszczone jony: wapnia w ilości 180mg/dm<sup>3</sup>, potasu w ilości 716mg/dm<sup>3</sup>,

magnezu w ilości 160mg/dm<sup>3</sup>, azotu amonowego w ilości 360mg/dm<sup>3</sup>, cynku w ilości 68mg/dm<sup>3</sup> oraz glukozę w ilości 35,30g/dm<sup>3</sup>.

Prowadzi się proces rehydratacji drożdży przez 5 godzin zachowując stałą temperaturę płaszczu bioreaktora 20°C. Po wskazanym czasie dodaje się do mieszaniny estry etylowe kwasów tłuszczowych oleju lnianego w ilości 56,7g estrów na 1dm<sup>3</sup> wody demineralizowanej, co stanowi stężenie 5,0%.

Następnie prowadzi się proces zgodnie z wytycznymi z Tabeli 4. Przez cały czas miesza z częstotliwością 130 obr./min.

Tabela 4. Wytyczne dla procesu kondycjonowania biomasy drożdżowej

Czas trwania procesu	Próżnia	Napowietrzanie
2h	Ciśnienie atmosferyczne	6 dm <sup>3</sup> /min
2h	Próżnia 800 mbar	0 dm <sup>3</sup> /min
2h	Ciśnienie atmosferyczne	6 dm <sup>3</sup> /min
2h	Próżnia 800 mbar	0 dm <sup>3</sup> /min

Napowietrzanie biomasy prowadzi się przez odpowiedni króciec, powietrzem podanym przez pompkę lub z butli przy zachowaniu odpowiedniej czystości - bezpośrednio przed wlotem powietrza do bioreaktora, filtr 0,44µm.

### Przykład 2b:

Uzyskaną w Przykładzie 2a biomasę drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci mleczka drożdżowego wykorzystuje się bezpośrednio lub prowadzi się przetwarzanie celem uzyskania suchych drożdży.

Mleczko poddaje się rozdziałowi w rozdzielaczu. Faza niepolarna zbiera się będzie w górnej warstwie, natomiast faza wodna zawierająca komórki drożdżowe w dolnej warstwie rozdzielacza. Po rozdzieleniu faz płyn niezwłocznie poddaje się rozdzieleniu w baktofudze.

Do baktofugi pracującej przy obrotach 12000 obr/min podaje się strumień mleczka z natężeniem objętościowym 300ml/min. Uzyskaną w ten sposób odwirowaną biomasę rozkłada się na tackach i mrozi szokowo w temperaturze -40°C przez 24h.

Po tym czasie tacki umieszcza się w komorze liofilizatora. Liofilizację prowadzi się w temperaturze tacy 35°C, ciśnieniu 0,08 mbar, przez 24h.

W wariacie wykonania odwirowaną biomasę rozkłada się na tackach i mrozi szokowo w temperaturze -75°C przez 24h, a po tym czasie liofilizację prowadzi się w temperaturze tacy 35°C, ciśnieniu 0,03mbar, przez 24h.

Uzyskany po liofilizacji proszek pakuje się próżniowo stosując próżnię rzędu 30mbar.

W kompozycjach wskazanych w Przykładach 1a,1b,2a,2b użyte zostały *S.Cerevisiae* SafSpirit M-1 – jednakże z uwagi na to, że drożdże *S.Cerevisiae* mają podobne cechy i podobną budowę, a różnią się specyficznymi cechami gatunkowymi, wynalazek może mieć zastosowanie do innych niż SafSpirit M-1 drożdży *S.Cerevisiae*. Prawidłowość absorpcji kwasów C18:2 n-6 oraz C18:3 n-3 (ALA) będzie taką samą cechą wszystkich *S. Cerevisiae*.

### **Przykład 3 – zastosowanie biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako suplementu diety**

Wytworzono biomasę drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci mlecza drożdżowego zgodnie z procedurą opisaną w Przykładzie 1a albo 2a, stosując różne poziomy dozowania estrów etylowych kwasów tłuszczowych oleju lnianego, oznaczone BF0 – brak dodatku estrów do kompozycji mlecza, BF1,25 – 1,25% dodatek estrów, BF 2,50 – 2,50% dodatek estrów, BF3,75- 3,75% dodatek estrów oraz BF5,00- 5,00% dodatek estrów. Zaobserwowano istotne różnice pomiędzy zawartością kwasów C18:2 n-6 oraz C18:3 n-3 (ALA) oznaczonych w komórkach drożdży w zależności od poziomu dozowania estrów etylowych kwasów tłuszczowych z oleju lnianego do przygotowanych mleczek fermentacyjnych. Uzyskana biomasa po wysuszeniu była bogatym źródłem kwasów wielonienasyconych.

Na podstawie danych z Tabeli 5 można zaobserwować, że wraz ze wzrostem udziału estrów etylowych kwasów tłuszczowych pochodzących z oleju lnianego istotnie rósł w badanej biomacie poziom kwasów C18:2 n-6 oraz C18:3 n-3 (ALA) stanowiących frakcję wielonienasyconych niezbędnych kwasów tłuszczowych. Kwasy te pełnią istotną rolę dla prawidłowego funkcjonowania ludzkiego organizmu. Zastosowanie biomasy według wynalazku jako suplementu diety zawierającego wysoki udział tych kwasów tłuszczowych

w formie związanej w biomacie może powodować ich istotnie lepsze wchłanianie w przewodzie pokarmowym.

Tabela 5. Profil kwasów tłuszczowych odwirowanych komórek drożdżowych

	<b>BF0</b>	<b>BF1,25</b>	<b>BF2,50</b>	<b>BF3,75</b>	<b>BF5,00</b>
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
<b>C10:0</b>	4,24	2,25	0,39	0,43	0,43
<b>C16:0</b>	24,64	18,69	22,14	18,78	14,97
<b>C16:1</b>	26,67	9,61	7,11	6,88	5,81
<b>C18:0</b>	16,12	11,59	15,25	10,44	8,10
<b>C18:1</b>	28,33	22,90	21,92	20,63	18,72
<b>C18:2 n-6</b>	0,01	6,11	5,29	8,38	9,62
<b>C18:3 n-3 (ALA)</b>	0,01	28,84	27,91	34,46	42,35

#### **Przykład 4 – zastosowanie biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako dodatku spożywczego**

Przygotowana biomasa drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci suchej zawierająca wysoki udział kwasów C18:2 n-6 oraz C18:3 n-3 (ALA) może stanowić dobry dodatek spożywczy zarówno w formie aktywnej, tj. w produktach, gdzie aktywność drożdży nie pogarsza ich cech sensorycznych ani przydatności do spożycia – np. produkty piekarskie, jak i w formie nieaktywnej biomasy, tj. biomasy w postaci suchej.

Forma nieaktywnej biomasy może mieć znacznie szersze zastosowanie ze względu na brak negatywnego wpływu na pogorszenie cech sensorycznych produktu oraz na wystąpienie ewentualnej fermentacji, która mogłaby obniżyć termin przydatności. Forma nieaktywna jest biologicznym nośnikiem kwasów C18:2 n-6 oraz C18:3 n-3 pozwalając na zwiększenie wartości żywieniowej produktu przy jednoczesnym braku negatywnego posmaku jełkości związanego z obecnością wolnych kwasów tłuszczowych. Nieaktywne drożdże wzbogacone w kwasy C18:2 n-6 oraz C18:3 n-3 mogą być korzystnie stosowane jako dodatek do:

- jogurtów owocowych (0,1 – 1%),
- serów dojrzewających (0,5 – 1%),

- pieczywa pszennego i pszenno-żytniego (1 – 2%),
- pieczywa żytniego (0,5 – 1%),
- pasztetów (0,5 – 2%),
- wędlin dojrzewających (0,1 – 3%),
- przetworów owocowych i owocowo-warzywnych (0,1 – 1%).

### **Przykład 5 – zastosowanie biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako prekursora do otrzymywania biomasy fermentacyjnej o ulepszonych parametrach fermentacyjnych**

Przygotowana biomasa drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci mlecza drożdżowego zawierająca wysoki udział kwasów C18:2 n-6 oraz C18:3 n-3 (ALA) może stanowić prekursor do otrzymywania biomasy fermentacyjnej o ulepszonych parametrach fermentacyjnych.

Fermentacje okresowe przygotowano w następujący sposób:

Do kolb 300ml przeniesiono ilościowo po 10ml inokulum w postaci biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci mlecza drożdżowego otrzymanego w Przykładzie 2 inkubowanego 24h w temp. 20°C. Następnie dodano do każdej próbki fermentacji okresowej BF (Batch Fermentation) estrów etylowych kwasów tłuszczowych z oleju lnianego w ilości: BF0 (0,00%), BF1,25 (1,25%), BF2,50 (2,50%), BF3,75 (3,75%) oraz BF5,00 (5,00%).

Fig. 1 przedstawia dynamikę fermentacji dla procesów okresowych. Można zaobserwować znacznie niższą dynamikę procesu w przypadku nastawu BF0, który był przygotowany z inokulum drożdży nie suplementowanych estrami kwasów tłuszczowych. Dla nastawów suplementowanych estrami notowano znacznie wyższą dynamikę fermentacji, maksimum notowano w 47 godzinie procesu dla nastawu BF3,75.

Tabela 6 przedstawia wpływ suplementacji estrami etylowymi kwasów tłuszczowych na poprawę akumulacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych: kwasu linolowego C18:2 n-6 oraz kwasu linolenowego C18:3 n-3 (ALA) w ścianie komórkowej drożdży *S. cerevisiae* oraz poprawę odporności na stres osmotyczny. Oznaczono znacznie wyższe stężenie alkoholu etylowego (11,39%) w nastawie BF5,00 zawierającym 5% dodatek estrów do biomasy niż BF0 (10,39%), komórki suplementowane istotnie w większym stopniu akumulowały glicerol

jako czynnik osmoprotekcyjny. Również średnica komórek drożdżowych w nastawach suplementowanych znacznie różniła się od wartości uzyskanych w próbie zerowej.

Tabela 6. Efekty fermentacji dla nastawów suplementowanych estrami etylowymi kwasów tłuszczowych z oleju lnianego

	<b>BF0</b>	<b>BF1,25</b>	<b>BF2,50</b>	<b>BF3,75</b>	<b>BF5,00</b>
<b>Etanol [% v/v]</b>	10,39 ± 0,20	10,97 ± 0,24	11,17 ± 0,31	11,21 ± 0,14	11,39 ± 0,18
<b>Glicerol [g · dm<sup>-3</sup>]</b>	8,11 ± 0,07	8,40 ± 0,10	8,69 ± 0,09	8,66 ± 0,14	9,03 ± 0,11
<b>Rozmiar komórek [μm]</b>	5,17 ± 0,11	5,30 ± 0,06	5,40 ± 0,16	5,37 ± 0,21	5,80 ± 0,24