

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238886**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **427925**

(22) Data zgłoszenia: **29.11.2018**

(51) Int.Cl.

A23K 10/30 (2016.01)

A23K 10/37 (2016.01)

C12N 1/16 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania drożdży paszowych z surowca ligninocelulozowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
01.06.2020 BUP 12/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
18.10.2021 WUP 29/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

PIOTR PATELSKI, Luciejów, PL
URSZULA DZIEKOŃSKA-KUBCZAK,
Leonów, PL
MARIA BALCEREK, Łódź, PL
KATARZYNA PIELECH-PRZYBYLSKA,
Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska

PL 238886 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania drożdży paszowych z surowca ligninocelulozowego.

Znane są sposoby otrzymywania biomasy drożdży paszowych z surowców ligninocelulozowych, takich jak zrębki i wióry biomasy drzew liściastych i iglastych, odpady po przerobieniu trzciny cukrowej, wysłodki, liście buraków cukrowych, kiszonka kukurydziana, słomy zbożowe, ługi siarczynowe, odpady ligninocelulozowe oddzielane ze ścieków, polegające na wstępnej obróbce ciśnieniowo-termicznej lub/i chemicznej surowca ligninocelulozowego, następnie hydrolizie enzymatycznej uzyskanej w ten sposób rozpuszczalnej biomasy surowca ligninocelulozowego z użyciem mieszaniny enzymów celulolitycznych tj. endo-beta-1,4-glukanazy, egzo-beta-1,4-glukanazy oraz beta-glukozydazy (celobiaz) (preparat komercyjny), oddzieleniu frakcji ciekłej hydrolizy, dodaniu do tej frakcji substancji mineralnych w postaci soli azotu, fosforu i magnezu stanowiących pożywkę do hodowli drożdży, dodaniu komórek drożdży, jak *Candida* sp., *Trichosporon* sp., *Pichia* sp., *Kluyveromyces* sp., *Yarrowia* sp., *Saccharomyces* sp. i prowadzeniu hodowli drożdży, a po zakończeniu hodowli wydzieleniu biomasy drożdży z cieczy pohodowlanej. Ciecz pozostałą po separacji drożdży, zawierającą m.in. celulazę dodaną w procesie hydrolizy enzymatycznej, kieruje się do oczyszczalni ścieków.

Konopie siewne są dotychczas stosowane do otrzymywania ekologicznych włókien naturalnych, biomateriałów izolacyjnych oraz preparatów farmaceutycznych.

Sposób otrzymywania drożdży paszowych z surowca ligninocelulozowego, polegający na wytworzeniu rozpuszczalnej biomasy surowca ligninocelulozowego w drodze obróbki termicznej wysuszonego i zmielonego materiału ligninocelulozowego, następnie hydrolizie enzymatycznej rozpuszczalnej biomasy tego materiału, oddzieleniu frakcji ciekłej hydrolizy, wzbogaceniu jej w sole mineralne stanowiące pożywkę do hodowli bakterii, zaszczepieniu komórkami drożdży paszowych, prowadzeniu napowietrzanej hodowli drożdży i po zakończeniu hodowli wydzieleniu biomasy drożdży z cieczy pohodowlanej, z wykorzystaniem mieszaniny enzymów celulolitycznych – endo-beta-1,4-glukanazy, egzo-beta-1,4-glukanazy oraz beta-glukozydazy, **według wynalazku** charakteryzuje się tym, że jako rozpuszczoną biomasę surowca ligninocelulozowego stosuje się rozpuszczoną biomasę konopi siewnych (*Cannabis sativa* L.), którą wytwarza się z wysuszonej i zmielonej słomy tych konopi w wyniku zmieszania z wodą użytą w ilości 10 części wagowych/ 1 część wagową słomy, poddania tej mieszaniny obróbce termicznej w temperaturze 121°C w czasie 60 minut, ochłodzenia do temperatury 55°C i ustalenia jej pH na poziomie 5,0–5,5. Najpierw wytwarza się źródło enzymów celulolitycznych przeznaczonych do procesu hydrolizy rozpuszczalnej biomasy konopi jako fazę ciekłą hydrolizy enzymatycznej tej biomasy prowadzonej przy użyciu mieszaniny endo-beta-1,4-glukanazy, egzo-beta-1,4-glukanazy oraz beta-glukozydazy użytej w ilości $5 \pm 0,5$ jednostek FPU/ g celulozy zawartej w biomasie konopi poddanej tej hydrolizie, w temperaturze 50–55°C przez okres 48 godzin. Następnie odrębną porcją otrzymanej uprzednio rozpuszczalnej biomasy konopi poddaje się hydrolizie enzymatycznej stosując fazę ciekłą uprzednio prowadzonej hydrolizy enzymatycznej jako źródło enzymów celulolitycznych, w ilości 20 cm³ otrzymanej uprzednio fazy ciekłej hydrolizy/1 g celulozy zawartej w biomasie, w temperaturze 50–55°C przez okres 48 godzin, a ciecz oddzieloną po tej hydrolizie enzymatycznej, wzbogaconą nieorganicznymi solami azotu, fosforu i magnezu, zaszczepia mieszaniną szczepów drożdży z gatunku *Pichia stipitis* i *Candida guilliermondii* użytą w ilości 10 g/dm³ cieczy po hydrolizie i prowadzi hodowlę napowietrzaną drożdży w temperaturze 27–34°C w czasie 24 godzin, oddziela ciecz pohodowlaną zawierającą namnożone komórki drożdży, które odfiltrowuje się i suszy. W sposobie według wynalazku pH mieszaniny słomy konopi i wody ustala się korzystnie przy użyciu kwasu siarkowego. Do wzbogacenia cieczy do hodowli drożdży stosuje się nieorganiczne sole azotu i fosforu korzystnie w ilości 3 g/dm³ cieczy po hydrolizie i nieorganiczne sole magnezu o korzystnie w ilości 0,05 g/dm³ cieczy po hydrolizie.

Sposobem według wynalazku uzyskuje się biomasę drożdży paszowych z hydrolizatu słomy konopnej przy użyciu o 50% mniejszej ilości celulaz, w porównaniu ze znanym sposobem otrzymywania biomasy drożdży paszowych z surowców ligninocelulozowych. Wpływa to na znaczne obniżenie kosztów produkcji drożdży. Odpad powstający po hydrolizie enzymatycznej biomasy konopi siewnych znajduje zastosowanie do produkcji materiałów izolacyjnych lub osłonek do kwiatów, ulegających biodegradacji. Sposób według wynalazku ilustruje poniższy przykład.

Przykład

W celu otrzymania komórek drożdży paszowych z biomasy konopi siewnych, w pierwszym etapie 300 g wysuszonej i zmielonej słomy konopi siewnych wymieszano z 3000 cm³ wody wodociągowej, po czym mieszaninę tę poddano obróbce termicznej w temperaturze 121 ± 5°C przez czas 60 ± 5 minut, po czym schłodzono mieszaninę do temperatury 55 ± 1°C, skorygowano jej pH do zakresu 5,2 ± 0,2 przy użyciu 50 ± 0,2% kwasu siarkowego, po czym dodano mieszaninę endo-beta-1,4-glukanazy, egzo-beta-1,4-glukanazy oraz beta-glukozydazy w postaci preparatu celulolitycznego Cellic Ctec2 – Novozymes, w ilości 5 ± 0,5 jednostek aktywności FPU/g celulozy zawartej w naczyniu reakcyjnym i prowadzono hydrolizę enzymatyczną w temperaturze 55 ± 1°C przez okres 48 godzin. Po tym czasie usunięto, w drodze filtracji na filtrze ze stali kwasoodpornej o średnicy oczek 0,1 mm, stałe pozostałości hydrolizatu, uzyskując 2000 cm³ ciekłej fazy hydrolizatu. W etapie drugim 300 g wysuszonej i zmielonej słomy konopnej zmieszano z 3000 cm³ wody i mieszaninę tę poddano działaniu temperatury 121°C przez czas 60 minut, po czym ochłodzono do temperatury 55°C, skorygowano jej pH do wartości 5,2 ± 0,2 przy użyciu 50 ± 0,2% kwasu siarkowego, dodano 2000 cm³ ciekłego hydrolizatu otrzymanego w pierwszym etapie i prowadzono hydrolizę enzymatyczną w temperaturze 50–55°C przez okres 48 godzin. Po tym czasie na filtrze ze stali kwasoodpornej o średnicy oczek 0,1 mm oddzielono część płynną hydrolizatu uzyskując łącznie 4000 cm³ ciekłej fazy hydrolizatu, do której dodano fosforan dwuamonowy (NH₄)₂HPO₄ w ilości 3 g/dm³ tej fazy ciekłej oraz siarczan magnezu (MgSO₄ × 7H₂O) w ilości 0,05 g/dm³ tej fazy ciekłej, sporządzając tym samym pożywkę do namnażania drożdży, a następnie dodano mieszaninę żywych komórek drożdży *Pichia stipitis* LOCK0047 oraz *Candida guilliermondii* ATCC 6260 stosując łącznie 10 g suchej masy komórek drożdży na 1 dm³ fazy ciekłej hydrolizatu. Zaszczepioną fazę ciekłą hydrolizatu przeniesiono do fermentora o pojemności 10 dm³, w którym prowadzono przez 24 godziny hodowlę napowietrzaną z intensywnością 1 vvm w temperaturze 30 ± 1°C przy pH 4,5–4,9. Po zakończeniu hodowli zawiesina w fermentorze zawierała komórki drożdży w ilości 39 g suchej masy/1 dm³ zawiesiny. Biomase drożdży wydzielono w drodze 10-ciominutowego wirowania przy sile odśrodkowej równej 4000 × g, po czym biomase wysuszone w suszarce nawiewowej w temperaturze powietrza 110 ± 3°C.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania drożdży paszowych z surowca ligninocelulozowego, polegający na wytworzeniu rozpulchnionej biomasy surowca ligninocelulozowego w drodze obróbki termicznej wysuszonego i zmielonego materiału ligninocelulozowego, następnie hydrolizie enzymatycznej rozpulchnionej biomasy tego materiału, oddzieleniu frakcji ciekłej hydrolizy, wzbogaceniu jej w sole mineralne stanowiące pożywkę do hodowli bakterii, zaszczepieniu komórkami drożdży paszowych, prowadzeniu napowietrzanej hodowli drożdży i po zakończeniu hodowli wydzieleniu biomasy drożdży z cieczy pohodowlanej, z wykorzystaniem mieszaniny enzymów celulolitycznych – endo-beta-1,4-glukanazy, egzo-beta-1,4-glukanazy oraz beta-glukozydazy, **znamienny tym**, że jako rozpulchnioną biomasę surowca ligninocelulozowego stosuje się rozpulchnioną biomasę konopi siewnych (*Cannabis sativa* L.), którą wytwarza się z wysuszonej i zmielonej słomy tych konopi w wyniku zmieszania z wodą użytą w ilości 10 części wagowych/ 1 część wagową słomy, poddania tej mieszaniny obróbce termicznej w temperaturze 121°C w czasie 60 minut, ochłodzenia do temperatury 55°C i ustalenia jej pH na poziomie 5,0–5,5, przy czym najpierw wytwarza się źródło enzymów celulolitycznych przeznaczonych do procesu hydrolizy biomasy konopi jako fazę ciekłą hydrolizy enzymatycznej tej biomasy prowadzonej przy użyciu mieszaniny endo-beta-1,4-glukanazy, egzo-beta-1,4-glukanazy oraz beta-glukozydazy użytej w ilości 5 ± 0,5 jednostek FPU/ g celulozy zawartej w biomasie konopi poddanej tej hydrolizie, w temperaturze 50–55°C przez okres 48 godzin, po czym odrębną porcję otrzymanej uprzednio biomasy konopi poddaje się hydrolizie enzymatycznej stosując fazę ciekłą uprzednio prowadzonej hydrolizy enzymatycznej jako źródło enzymów celulolitycznych, w ilości 20 cm³ otrzymanej uprzednio fazy ciekłej hydrolizy/1 g celulozy zawartej w biomasie, w temperaturze 50–55°C przez okres 48 godzin, a ciecz oddzieloną po tej hydrolizie

enzymatycznej, wzbogaconą nieorganicznymi solami azotu, fosforu i magnezu, zaszcze-
pia mieszaniną szczepów drożdży z gatunku *Pichia stipitis* i *Candida guilliermondii* użytą
w ilości 10 g/dm^3 cieczy po hydrolizie i prowadzi hodowlę napowietrzaną drożdży w tem-
peraturze w temperaturze $27\text{--}34^\circ\text{C}$ w czasie 24 godzin, oddziela ciecz pohodowlaną za-
wierającą namnożone komórki drożdży, które odfiltrowuje się i suszy.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pH mieszaniny słomy konopi i wody ustala się korzystnie przy użyciu kwasu siarkowego.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do wzbogacenia cieczy do hodowli drożdży stosuje się korzystnie nieorganiczne sole azotu i fosforu w ilości 3 g/dm^3 cieczy po hydro-
lizie oraz nieorganiczne sole magnezu w ilości $0,05 \text{ g/dm}^3$ cieczy po hydrolizie.