



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900496516
Data Deposito	09/02/1996
Data Pubblicazione	09/08/1997

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

PROCESSO PER L'ADATTAMENTO AEROBICO DI LIEVITI ANAEROBICI
--

TITOLARE: ASCLEPIO COMMUNICATIONS S.A.

* * *

DESCRIZIONE

Nel suo aspetto più generale la presente invenzione si riferisce ad un processo per l'adattamento aerobico di lieviti anaerobici.

In particolare, l'invenzione riguarda un processo per adattare aerobicamente i lieviti di birra utilizzati nella fermentazione anaerobica alcolica.

Il lievito di birra, definito nella letteratura internazionale come "brewers' yeast", è costituito da lieviti del genere *Saccharomyces* ed è utilizzato per preparare la birra mediante fermentazione alcolica di fonti di carbonio, quali ad esempio amidi di cereali, in particolare orzo.

Il processo di produzione della birra comporta la formazione di ingenti quantità di una biomassa costituita da lieviti, che, al termine del processo, sono separati per sedimentazione.

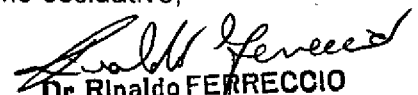
Questa biomassa, essiccata, viene utilizzata quale integratore per mangimi nell'industria zootecnica o quale integratore dietetico per alimentazione umana, in virtù del suo contenuto in proteine, sali minerali e vitamine, soprattutto del gruppo B.

Durante il processo di produzione della birra il lievito segue un metabolismo anaerobico ed è di conseguenza carente di cofattori enzimatici e di attività catalitiche proprie del metabolismo aerobico, e, in generale, è carente di metaboliti ridotti recanti gruppi attivi allo stato ridotto, quali, ad esempio glutatione e S-adenosil metionina.

Risultano inoltre assenti gli enzimi terminali del metabolismo ossidativo,

09 FEB. 1996

2


Dr. Rinaldo FERRECCIO
N. iscriz. ALBO 828
(in proprio e per gli altri)

MI 96 A 0251

con un concomitante accumulo di acidi organici appartenenti al ciclo degli acidi tricarbossilici localizzati nella particella mitocondriale e di notevole spicco nel metabolismo adattativo e nella sintesi di quelle componenti della membrana mitocondriale che, attraverso il gradiente protonico di Mitchell, contribuiscono alla sintesi intramitocondriale di ATP ed alla riduzione di NAD e NADP a NADH e NADPH.

Risultano inoltre assenti gli enzimi coinvolti nella sintesi di DNA e RNA e dei loro precursori, propri e specifici del compartimento mitocondriale.

Le carenze sopra citate sono essenzialmente dovute alla mancata funzionalità delle strutture mitocondriali del lievito di birra.

Da tali carenze deriva un valore nutrizionale complessivo del lievito di birra decisamente inferiore a quello presentato da lieviti aerobici, quali ad esempio il lievito da pane (o "bakers' yeast"), che, disponendo di strutture mitocondriali perfettamente funzionanti, risulta particolarmente ricco dei suddetti cofattori, amminoacidi ed enzimi, come confermato dall'incremento del 50-80% del tempo di divisione del lievito anaerobico rispetto alla sua velocità di divisione in condizioni aerobiche.

D'altra parte, il lievito da pane ha un costo circa 10-20 volte superiore a quello del lievito di birra, ciò che rende improponibile l'utilizzo del lievito di pane in settori quali l'alimentazione zootecnica.

Il problema che sta alla base della presente invenzione è quello di mettere a disposizione un lievito di birra che presenti un valore nutrizionale simile a quello del lievito da pane ad un costo notevolmente inferiore.

Un tale problema è risolto, secondo l'invenzione, da un processo per l'adattamento aerobico del lievito di birra, che comprende le fasi di:

- i) prelevare dal fondo di vasche di fermentazione della birra, al termine di detta fermentazione, una sospensione di lievito di birra contenente dal 10 al 15% di sostanza secca,
- ii) lasciar sedimentare detta sospensione, con ottenimento di un primo sedimento e di un primo surnatante, che viene eliminato,
- iii) risospendere detto primo sedimento in acqua e lasciar sedimentare, con ottenimento di un secondo sedimento e di un secondo surnatante, che viene eliminato,
- iv) risospendere detto secondo sedimento in un appropriato terreno liquido di coltura e mantenerlo ad una temperatura di 20-32°C e ad un pH di 2,5-5,0, insufflando aria sterile in misura pari a circa 0,5-1,0 VVM, per un tempo sufficiente ad ottenere la comparsa di un'attività respiratoria nel lievito di birra corrispondente ad un consumo di ossigeno maggiore o uguale a 30 $\mu\text{O}_2/\text{h}/\text{mg}$ di cellule di lievito (peso secco),
- v) recuperare il lievito mediante centrifugazione della sospensione finale.

Il tempo necessario per ottenere la comparsa della suddetta attività respiratoria nel lievito di birra varia generalmente da 15 a 40 ore.

Preferibilmente, quali terreni di coltura si utilizzano quelli scelti dal gruppo comprendente:

- a) soluzioni acquose contenenti 0,3-1,5% p/v di estratto di lievito
- b) soluzioni acquose contenenti 0,3-1,5% p/v di estratto di lievito e 0,1-1,5% di peptone
- c) terreno minimo minerale.

Un terreno minimo minerale particolarmente adatto ai fini della presente invenzione è il terreno minimo minerale/40 secondo Magni e Von Borstel

(Genetics, Vol. 47, p.1097, 1962).

Secondo una modalità di realizzazione preferita dell'invenzione nella suddetta fase iv) si procede ad aggiunte successive di glucosio a detto terreno di coltura in maniera tale da mantenere la concentrazione dello stesso costantemente ad un valore di 0,5-1% p/v.

La temperatura a cui viene eseguita la fase iv) del processo è di preferenza compresa fra 24 e 29°C.

La comparsa dell'attività respiratoria nel lievito di birra viene rivelata prelevando ad intervalli regolari campioni della biomassa di lievito sottoposta alla fase iv) del processo e valutando per ciascun campione i seguenti due parametri:

- a) l'attività respiratoria, espressa in μl di O_2 consumati per ora per mg di cellule (peso secco) (QO_2);
- b) la comparsa delle bande di assorbimento dei citocromi c, b e aa_3 nell'intervallo 540-620 nm.

La velocità respiratoria viene misurata mediante un ossigrafo a membrana Rank Brothers, secondo la seguente metodologia.

Un campione della biomassa viene centrifugato a 1500 x g per 10 minuti primi a 4°C, dopodiché si rimuove il surnatante e si risospende il sedimento in acqua distillata a 4°C in modo da ottenere una concentrazione di 5×10^9 cellule/ml.

50 microlitri della suddetta sospensione vengono introdotti in una cella termostata a 30°C dell'ossigrafo insieme a 2,9 ml di tampone italato 0,1M a pH 5 ed a 5 microlitri di una soluzione di glucosio ad una concentrazione compresa fra 100 e 300 mM quale substrato respiratorio.

La misurazione del consumo di O_2 per ora per mg di peso secco viene effettuata introducendo nella cella termostata l'apposita sonda dell'ossigrafo, che è sostanzialmente un elettrodo a membrana di Clark.

La comparsa delle bande di assorbimento dei citocromi c, b e aa_3 viene rilevata mediante uno spettrofotometro a doppio raggio Cary 219 nell'intervallo di lunghezze d'onda da 540 a 620 nm, utilizzando come standard una soluzione di cromofori avente un assorbimento dello stesso ordine di grandezza della sospensione cellulare, ma senza picchi di assorbimento nell'intervallo sopra citato.

La metodologia impiegata per la suddetta rilevazione prevede la centrifugazione del campione prelevato a temperatura ambiente (10-20°C) a 1500 x g per 10 minuti primi, seguita dall'allontanamento del supernatante e dalla risospensione del sedimento in acqua in modo da ottenere una concentrazione cellulare variabile tra 1×10^9 e 5×10^9 cellule/ml.

Per determinare la presenza dei citocromi si esegue uno "scanning" tra 620 e 540 nm per individuare i picchi di assorbimento dei citocromi aa_3 , b, c, che cadono rispettivamente a 550, 560 e 602 nm.

Per misurare il picco aa_3 la linea di base viene tracciata tra 620 e 590 nm; per misurare i picchi b e c, la suddetta linea viene tracciata fra 570 e 540 nm.

Le altezze dei picchi così individuate forniscono l'indicazione della cinetica del processo di riadattamento aerobico e dell'acquisizione delle sue basi strutturali (citocromi c, b e aa_3 secondo la formula :

$$\text{mmoli/g di cellule} = \frac{k \times UA}{\text{coefficiente estinzione} \times \text{g peso secco}}$$

in cui UA è l'assorbimento determinato dall'altezza dei picchi e k è un coefficiente funzione dell'intervallo utilizzato.

La rilevazione della comparsa delle suddette bande di assorbimento viene utilizzata quale strumento di screening per valutare i ceppi di lievito di birra più idonei ad essere adattati aerobicamente e per definire la sequenza strutturale della comparsa delle righe dei citocromi respiratori.

La conferma dell'avvenuto adattamento aerobico deve comunque essere fornita dalla rilevazione del parametro "consumo di ossigeno", che valuta direttamente ed in modo unico l'avvenuto adattamento respiratorio.

La presente invenzione riguarda altresì un lievito di birra adattato aerobicamente caratterizzato dal presentare una velocità respiratoria maggiore od uguale a $30 \mu\text{l O}_2/\text{h/mg}$ di peso secco di cellule di lievito.

Un tale lievito può trovare impiego come integratore dietetico nell'alimentazione umana o come componente di mangimi per l'industria zootecnica.

Rispetto al lievito di birra attualmente utilizzato quale integratore dietetico o quale componente di mangimi per l'industria zootecnica, il lievito di birra secondo l'invenzione presenta considerevoli vantaggi dal punto di vista nutrizionale.

Innanzitutto esso è molto ricco di cofattori enzimatici, quali il NADH ed il NADPH, e di amminoacidi solforati in forma ridotta (ad esempio cisteina), nonché di glutazione in forma ridotta. Ciò è di fondamentale importanza nella prevenzione di patologie e fenomeni degenerativi causati da processi ossidativi

in cui sono coinvolti radicali liberi.

Inoltre il lievito secondo l'invenzione è particolarmente ricco di enzimi specifici del metabolismo ossidativo terminale, i quali a livello intestinale favoriscono ed aumentano l'assimilazione di fonti di carbonio prodotte dalla flora probiotica e/o presenti nelle formulazioni mangimistiche.

Il processo secondo la presente invenzione sarà ulteriormente descritto mediante gli esempi di attuazione forniti qui di seguito a titolo puramente illustrativo e non limitativo.

ESEMPIO 1

Una sospensione di lievito di birra L 48 della Interbreu Italia, con un contenuto di sostanza secca del 10%, venne prelevata dal fondo di una vasca di fermentazione del mosto per la produzione di birra, al termine della suddetta fermentazione.

La sospensione venne lasciata sedimentare ed il surnatante fu eliminato.

Il sedimento fu risospeso in un uguale volume di acqua. Si lasciò risedimentare la sospensione così ottenuta e si eliminò il surnatante.

Il sedimento venne quindi risospeso in un uguale volume di un terreno di coltura costituito da una soluzione acquosa all'1% di estratto di lievito. 8 litri della sospensione così ottenuta furono introdotti in un fermentatore CHEMAP avente un volume di 12 litri.

La temperatura all'interno del fermentatore era regolata attorno ai 25°C. Il pH della sospensione era mantenuto ad un valore di circa 4,5 mediante un sistema di regolazione automatico basato sull'impiego di sensori di pH

accoppiati ad un sistema di pompe di immissione di soluzioni di idrossido di sodio o di acido cloridrico a seconda delle necessità.

Durante l'intero periodo di permanenza della sospensione all'interno del fermentatore veniva insufflata aria sterile con una velocità di aerazione pari a 1 VVM (volume d'aria per volume di sospensione per minuto).

Si prelevarono campioni della biomassa in sospensione nel fermentatore ad intervalli di 4 ore e per ciascuno di essi si eseguirono spettri dei citocromi respiratori secondo la metodica più sopra esposta.

Gli assorbimenti corrispondenti ai citocromi aa₃, b e c comparvero già dopo 12 ore e raggiunsero un massimo dopo 24 ore.

Una determinazione dell'attività respiratoria eseguita dopo 24 ore dall'inizio del processo secondo il metodo più sopra riportato confermò l'avvenuto adattamento aerobico, fornendo un valore di consumo di ossigeno pari a 38 $\mu\text{l O}_2/\text{h/mg}$ di cellule di lievito (peso secco).

Il trattamento del lievito nel fermentatore venne pertanto interrotto, mediante sospensione dell'insufflazione di aria e la biomassa di lievito di birra adattato aerobicamente venne prelevata dal fermentatore e sottoposta a centrifugazione a 1500 x g per 15 minuti a 4°C.

La resa del processo risultò pari a 100%.

ESEMPIO 2

Una sospensione di lievito di birra L68 della ditta Poretti con un contenuto di sostanza secca del 15% venne prelevata dal fondo di una vasca di fermentazione del mosto per la produzione di birra, al termine della suddetta

fermentazione.

La sospensione venne lasciata sedimentare ed il surnatante fu eliminato.

Il sedimento fu risospeso in un uguale volume di acqua. Si lasciò risedimentare la sospensione così ottenuta e si eliminò il surnatante.

Il sedimento venne quindi risospeso in un uguale volume di un terreno di coltura costituito da un terreno minimo minerale secondo Magni e Von Borstel.

8 litri della sospensione così ottenuta furono introdotti in un fermentatore identico a quello usato nell'esempio 1.

La temperatura all'interno del fermentatore era regolata attorno ai 29°C ed il pH della sospensione era mantenuto ad un valore di circa 4.

Durante l'intero periodo di permanenza della sospensione all'interno del fermentatore veniva insufflata aria sterile con una velocità di aerazione pari a 0,8 VVM (volume d'aria per volume di sospensione per minuto).

Si prelevarono campioni della biomassa in sospensione nel fermentatore ad intervalli di 4 ore e per ciascuno di essi si eseguirono spettri dei citocromi respiratori secondo la metodica più sopra esposta.

Si procedette ad aggiunte successive di soluzioni di glucosio alla sospensione in modo da mantenere la concentrazione dello stesso a valori compresi fra 0,5 e 1% durante l'intero processo.

Gli assorbimenti corrispondenti ai citocromi aa₃, b e c comparvero già dopo 12 ore e raggiunsero un massimo dopo 36 ore.

Una determinazione dell'attività respiratoria eseguita dopo 24 dall'inizio

del processo secondo il metodo più sopra riportato confermò l'avvenuto adattamento aerobico, fornendo un valore di consumo di ossigeno pari a $35 \mu\text{l O}_2/\text{h/mg}$ di cellule di lievito (peso secco).

Il trattamento del lievito nel fermentatore venne pertanto interrotto, mediante sospensione dell'insufflazione di aria e la biomassa di lievito di birra adattato aerobicamente venne prelevata dal fermentatore e sottoposta a centrifugazione a $1500 \times g$ per 15 minuti a 4°C .

La resa del processo risultò pari a 100%.

* * *

RIVENDICAZIONI

1. Processo per l'adattamento aerobico del lievito di birra, che comprende le fasi di:

- i) prelevare dal fondo di vasche di fermentazione della birra, al termine di detta fermentazione, una sospensione di lievito di birra contenente dal 10 al 15% di sostanza secca,
- ii) lasciar sedimentare detta sospensione, con ottenimento di un primo sedimento e di un primo surnatante, che viene eliminato,
- iii) risospendere detto primo sedimento in acqua e lasciar sedimentare, con ottenimento di un secondo sedimento e di un secondo surnatante, che viene eliminato,
- iv) risospendere detto secondo sedimento in un appropriato terreno liquido di coltura e mantenerlo ad una temperatura di 20-32°C e ad un pH di 2,5-5,0, insufflando aria sterile in misura pari a circa 0,5-1,0 VVM, per un tempo sufficiente ad ottenere la comparsa di un'attività respiratoria nel lievito di birra corrispondente ad un consumo di ossigeno maggiore o uguale a 30 $\mu\text{O}_2/\text{h/mg}$ di cellule di lievito (peso secco),
- v) recuperare il lievito mediante centrifugazione della sospensione finale.

2. Processo secondo la rivendicazione 1, in cui detto tempo varia da 15 a 40 ore.

3. Processo secondo la rivendicazione 1, in cui detto terreno di coltura è scelto dal gruppo comprendente:

- a) soluzioni acquose contenenti 0,3-1,5% p/v di estratto di lievito,

b) soluzioni acquose contenenti 0,3-1,5% p/v di estratto di lievito e 0,1-1,5% di peptone,

c) terreno minimo minerale.

4. Processo secondo la rivendicazione 3, in cui in detta fase iv) si procede ad aggiunte successive di glucosio a detto terreno di coltura in maniera tale da mantenere la concentrazione del glucosio costantemente ad un valore di 0,5-1% p/v.

5. Lievito di birra caratterizzato dal presentare una attività respiratoria corrispondente ad un consumo di ossigeno maggiore o uguale a 30 $\mu\text{l/h/mg}$ di cellule di lievito (peso secco).

6. Lievito di birra adattato aerobicamente mediante il processo di una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 4.

7. Uso di un lievito di birra secondo una qualunque delle rivendicazioni 5 e 6 quale integratore dietetico nell'alimentazione umana.

8. Uso di un lievito di birra secondo una qualunque delle rivendicazioni 5 e 6 quale componente di mangimi per l'industria zootecnica.

9. Mangime per l'industria zootecnica comprendente un lievito di birra secondo una qualunque delle rivendicazioni 5 e 6.

10. Composizione di integratore dietetico per alimentazione umana caratterizzata dal fatto di comprendere un lievito di birra secondo una qualunque delle rivendicazioni 5 e 6.


Dr. Rinaldo FERRECCIO
N. Iscriz. ALBO 525
(In proprio o per gli altri)

