

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246470 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440018**

(22) Data zgłoszenia: **2021.12.29**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.07.03 BUP 27/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.02.03 WUP 05/2025**

(51) MKP:

A23P 10/30 (2016.01)

A23L 31/10 (2016.01)

A23D 9/00 (2006.01)

A23L 33/115 (2016.01)

A23L 3/44 (2006.01)

B01J 13/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU,
Poznań, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

PRZEMYSŁAW KOWALCZEWSKI, Poznań, PL

ADRIAN CZERNIAK, Poznań, PL

MARIUSZ LESIECKI, Poznań, PL

DOMINIK KMIECIK, Poznań, PL

KRZYSZTOF SMARZYŃSKI, Kąty, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Bartłomiej Fijałkowski, Łódź, PL

(54) Tytuł:

Sposób kapsułkowania olejów w komórkach drożdżowych

PL 246470 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób kapsułkowania olejów w komórkach drożdżowych.

Oleje jadalne tradycyjnie stanowią uznane i cenione źródło energii oraz składników odżywczych w diecie człowieka. Wynika to z ich ogólnej dostępności, umiarkowanej kosztowności oraz często bogactwa składników o funkcjach prozdrowotnych. Wśród olejów jadalnych szczególne zainteresowanie poświęca się olejom bogatym w wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodzajów omega-3 i omega-6, które posiadają powszechnie znany i dobrze udowodniony naukowo wpływ na ograniczenie ryzyka wystąpienia wielu chorób.

Technologia żywności tzw. funkcjonalnej (prozdrowotnej) od wielu lat rozwija się w kierunku wzbogacania produktów w oleje lub ich mieszanki, zawierające optymalne ilości kwasów wielonienasyconych takich jak kwas eikozapentaenowy (EPA), dokozaheksaenowy (DHA), linolowy (LA), alfa-linolenowy (ALA) i innych. Poszukuje się naturalnych źródeł tych kwasów, które najczęściej stanowią oleje pozyskiwane z organizmów i mikroorganizmów morskich oraz oleje tłoczone z nasion roślin oleistych. Ich powszechne stosowanie w żywności jest jednak ograniczone z powodu ich niestabilności. Kwasy tłuszczowe wielonienasycone ulegają szybkiemu utlenianiu w typowych warunkach produkcji, pakowania i przechowywania żywności, szczególnie w warunkach dostępu tlenu, światła oraz w podwyższonej temperaturze. Produkty utleniania tych kwasów prowadzą do pogorszenia jakości sensorycznej (tworzenie niepożądanych związków wpływających na aromat produktu oraz smak), obniżają stabilność przechowalniczą i wpływają na ogólne obniżenie jakości produktów wzbogaconych w oleje jadalne. Kolejnym utrudnieniem w zastosowaniu olejów jadalnych w żywności jest ich nierozpuszczalność w wodzie, co utrudnia ich szerokie zastosowanie w produktach, szczególnie produktach suchych i o wysokiej zawartości wody.

Mikrokapsułkowanie jest metodą stabilizacji hydrofobowych (np. oleje jadalne, witaminy, olejki eteryczne) oraz hydrofilowych substancji lub składników żywności poprzez ich otaczanie inną substancją, tzw. matrycą lub nośnikiem. Powoduje to wytworzenie układu, w którym substancja chroniona, np. olej, jest otoczona ciągłą lub nieciągłą barierą z innej substancji.

Kapsułkowanie ma za zadanie przede wszystkim ograniczenie parowania, maskowanie nieakceptowalnego smaku lub aromatu, albo poprawę niektórych parametrów, na przykład rozpuszczalności.

Stosowane w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym technologie mikrokapsułkowania można podzielić na dwie główne grupy: fizykochemiczne i mechaniczne. Do pierwszej grupy zaliczają się metody oparte na zastosowaniu emulsji, koacerwacji, ekstruzji i tworzeniu kompleksów włączeniowych. Do drugiej grupy należą metody fizyczne wykorzystujące suszenie i zestalanie rozpyłowe, liofilizację oraz otoczkowanie fluidalne.

Obiecującą alternatywę dla dotychczas stosowanych technologii mikrokapsułkowania może stanowić wykorzystanie struktur komórkowych jako naturalnych, wstępnie uformowanych nośników dla różnorodnych substancji aktywnych. Spośród szeregu nośników tego typu najwięcej uwagi poświęca się zastosowaniu komórek mikroorganizmów, przede wszystkim grzybów, bakterii oraz alg.

Biomasa drożdży piekarskich, ze względu na swój niski koszt, łatwość pozyskania i powszechną akceptowalność w produktach spożywczych, może stanowić atrakcyjną alternatywę dla substancji chemicznych stanowiących nośnik (otoczkę) hydrofobowych olejów jadalnych. W ogólnym zarysie, procedura tej metody mikrokapsułkowania została opracowana przez Bishop i in. (1998) i składa się z kilku etapów, z których najistotniejszym jest moment inkubacji wodnej emulsji lub dyspersji substancji kapsułkowanej z odpowiednio przygotowaną biomasą drożdżową. W trakcie inkubacji zachodzi proces biernego (pasywnego) wnikania kapsułkowanych związków do wnętrza komórek i ich immobilizacji w formie związanej z strukturami komórki lub w formie kropeł wewnątrzkomórkowej emulsji. Osiągane tą metodą wydajności zwykle oscylują w granicach 20–40% wag. zawartości kapsułkowanej substancji w gotowym produkcie.

Biomasa drożdżowa, przed jej zastosowaniem jako nośnika dla substancji hydrofobowych, musi zostać poddana obróbce wstępnej polegającej na zabiegach mających na celu standaryzację i usunięcie uszkodzonych lub pofragmentowanych komórek, a także resztek podłoży hodowlanych i innych substancji mogących znajdować się w „surowej” biomase. Natywne komórki drożdżowe wykazują ograniczoną zdolność do biernego wchłaniania i magazynowania substancji hydrofobowych, dlatego przed procesem poddaje się je obróbce mającej zwiększyć porowatość komórek oraz przestrzeń wewnątrzkomórkową dla substancji magazynowanych. Zabiegi te polegają najczęściej na usuwaniu rozpuszczalnych składników komórki na drodze autolizy, plazmolizy lub hydrolizy,

a także na działaniu enzymami i detergentami, zwiększającymi przepuszczalność ściany i błony komórkowej komórek drożdżowych.

Znane jest rozwiązanie według RU2678130 w jakim słodycze takie jak „Kremowe Toffi” wytwarzane są z wykorzystaniem metody produkcji kapsułkowanego oleju roślinnego obejmują produkcję mieszanki białkowo-polisacharydowej BPS z suchej serwatki, gumy arabskiej, karageniny i gumy ksantanowej oraz wody, a następnie podgrzanie mieszanki do 60°C i pęcznienie przez 40–60 minut. Następnie BPS rzepaku, siemienia lnianego, oleju z orzecha włoskiego i ich mieszanin. Do BPS wprowadzana jest druga część substancji słodzących: sorbitolu, ksylitolu i izomaltu, a całość jest mieszana. Powstały syrop podgrzewa się i gotuje do temperatury 110–115°C. Do gotowanego syropu wprowadza się melasę i olej roślinny. Masę utrzymuje się w temperaturze 113–115°C, następnie schładza do 90–100°C i wykonuje się z niej kapsułki.

Znany jest też wynalazek NZ239349 w jakim nierozpuszczalne kapsułki utworzone z hydrofilowego materiału koloidowego i mieszanki polimerów pochodzących z rozkładu polisacharydów; produkty olejne w kapsułkach; zastosowano do powlekania papieru i żywności. Pochodne polisacharydów o krótkim łańcuchu, takie jak hydrolizaty jonowych pochodnych celulozy, stosuje się do tworzenia kapsułek przez połączenie pochodnych polisacharydu o krótkim łańcuchu z innym polimerem. Substancje przeznaczone do kapsułkowania służą jako jądra, wokół których tworzą się kropelki koacerwatu. Naładowany polimer o krótkim łańcuchu zawiera produkty degradacji pochodnych polisacharydów o średnim stopniu polimeryzacji w zakresie od 3 do około 500. W zgłoszeniu ujawniono sposoby stosowania kapsułek do dostarczania lub przechowywania olejów i innych substancji. Wynalazek ujawnia również zastosowanie kapsułek w produktach spożywczych, paszowych, farmaceutycznych, kosmetycznych i higieny osobistej oraz w powlekanii papieru mikroskopijnymi pękającymi kapsułkami zawierającymi płyn drukarski.

Znane metody pozwalają co prawda na kapsułkowanie w żelatynie lub innych substancjach między innymi olejów, jednak jak pokazują przeprowadzone analizy i badania, efektywna przenikalność czy zdolność do uwalniania zakapsułkowanej substancji sięga najczęściej 5–10%.

Przeprowadzone badania miały na celu opracowanie nowej metody, w oparciu o wykorzystanie biomasy drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*), blendów olejów tłoczonych na zimno o cechach prozdrowotnych z wykorzystaniem blendów zawierających zoptymalizowane mieszaniny olejów, jakie zawierają olej ryżowy w ilości od 39 do 91% wagowych, jaki zmieszany jest korzystnie z olejem rzepakowym w ilości od 39% do 55% wagowych, korzystnie 45% wagowych, albo korzystnie z olejem konopnym w ilości od 8% do 28% wagowych, korzystnie 15% wagowych albo korzystnie z olejem lnianym w ilości od 9% do 14% wagowych, korzystnie 11% wagowych albo korzystnie z olejem rydzowym w ilości od 10% do 15% wagowych, korzystnie 12% wagowych, przy czym, w przypadku zastosowania oleju konopnego skład mieszaniny uzupełniony jest do 100% olejem rzepakowym, a wzajemny stosunek kwasów tłuszczowych omega 6 do omega 3 (w6/w3) opracowanej blendy zawarty jest w przedziale od 4 : 1 do 6 : 1.

Sposób kapsułkowania blendów w komórkach drożdżowych według wynalazku polega na tym, że materiał wyjściowy, jaki stanowią drożdże piekarskie, korzystnie prasowane drożdże piekarskie o zawartości suchej masy nie mniejszej niż 25% wagowych, poddaje się procesowi płukania i suszenia liofilizacyjnego. Biomasa w stężeniu 10% wag. płucze się w 0,01M roztworze bezwodnego wodorofosforanu dipotasu o pH 6,8, po czym oddziela się na drodze wirowania (3950 x g, 10 min) i uzyskaną masę o zawartości suchej substancji nie mniejszej niż 20% wag. umieszcza się na stalowych tacach liofilizacyjnych i zamraża w temp. -80°C przez 12 h. Zamrożoną biomasę poddaje się liofilizacji przy ciśnieniu 0,06 mbar przez 48 h. W uzyskanym proszku oznacza się metodą ekstrakcji odczynnikami Folcha zawartość lipidów całkowitych, która wynosiła $4,7 \pm 0,55 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ proszku, oraz liczebność całkowitą komórek metodą opartą o bezpośredni pomiar w komorze Neubauera, wynoszącą $3,6 \times 10^{10} \text{ g}^{-1}$ proszku.

Następnie prowadzi się obróbkę wstępną biomasy, tak że w 10% wag. zawiesinie suchej masy drożdży o pH 5,2, w butlach szklanych typu „pyrex”, inkubuje się zawiesinę w temperaturze nie mniejszej niż 35°C i nie wyższej niż 75°C. Równocześnie korzystnie, gdy stosuje się dodatek octanu etylu lub chlorku sodu do wspomagania procesu ekstrakcji składników wewnątrzkomórkowych (plazmolizy). Korzystnie do biomasy dodaje się dodatek octanu etylu o wielkości w ilości od 0,5 do 6,5% wag. (w stosunku do masy zawiesiny) oraz dodatek chlorku sodu w ilości od 5 do 40% wag., po czym prowadzi się plazmolizę w temperaturze nie mniejszej niż 50°C i nie wyższej niż 60°C, korzystnie w trakcie procesu plazmolizy stosuje się temperaturę 55°C.

Następnie w procesie hydrolizy enzymatycznej, przygotowaną wcześniej zawiesinę drożdżową poddaje się wstępnej pasteryzacji w 95°C przez 10 minut celem inaktywacji endogennych enzymów. Do tak przygotowanej biomasy dodaje się glukazę (Glucanex R200; 0,2 U/mg) w ilości od 0,0015 do 1,5% wag., po czym prowadzi się inkubację w temperaturze od 45°C do 55°C, korzystnie 50°C przez nie krócej niż 24 h.

Następnie prowadzi się proces wiązania blendów olejów w biomase drożdży piekarskich metodą Bishop i in. (1998), przy czym w naczyniach typu „pyrex” o pojemności 100 ml odważa się porcję 40 g wody dejonizowanej zawierającej 2% wag. dodatku emulgatora w postaci monooleinianu polioksyetylenosorbitolu (Tween 80, E433), dopuszczonego do zastosowania w żywności, i dodaje się naważkę blendu olejów, po czym wytwarza się emulsję typu o/w metodą homogenizacji rotor/stator przez 5 minut przy prędkości 10 000 min⁻¹ w homogenizatorze szybkoobrotowym.

Przy czym przez blendy olejowe rozumie się mieszaniny olejów, jakie zawierają olej ryżowy w ilości od 39 do 91% wagowych, jaki zmieszany jest korzystnie z olejem rzepakowym w ilości od 39% do 55% wagowych, korzystnie 45% wagowych, albo korzystnie z olejem konopnym w ilości od 8% do 28% wagowych, korzystnie 15% wagowych albo korzystnie z olejem lnianym w ilości od 9% do 14% wagowych, korzystnie 11% wagowych albo korzystnie z olejem rydzowym w ilości od 10% do 15% wagowych, korzystnie 12% wagowych, przy czym, w przypadku zastosowania oleju konopnego skład mieszaniny uzupełniony jest do 100% olejem rzepakowym, a wzajemny stosunek kwasów tłuszczowych omega 6 do omega 3 (w6/w3) opracowanej blendy zawarty jest w przedziale od 4 : 1 do 6 : 1.

Korzystnie, gdy zastosowane blendy olejowe mają następujący skład ilościowy:

Składnik I	Składnik II	Składnik III	% wag	% wag	% wag
Olej ryżowy	Rzepakowy	-	55	45	-
Olej ryżowy	Olej Rydzowy	-	88	12	-
Olej ryżowy	Olej Lniany	-	89	11	-
Olej ryżowy	Olej Konopny	Rzepakowy	55	15	30

Do tak wytworzonej emulsji dodaje się odważoną porcję liofilizowanej biomasy drożdżowej. Mieszanie kapsułkującą inkubuje się następnie przez czas nie krótszy niż 8 h i przy ciągłym mieszanym równym 200 min⁻¹. Po zakończeniu inkubacji, zawartość naczyń oddziela się od mieszaniny poreakcyjnej na drodze wirowania przy przyspieszeniu nie mniejszym niż 3950 x g przez okres nie krótszy niż 10 min. Oddzieloną pastę drożdżową płucze się następnie co najmniej trzykrotnie wodą dejonizowaną celem usunięcia resztek mieszaniny reakcyjnej. Mokłą biomasę przenosi się do naczyń do liofilizacji i zmraża w temp. -80°C przez 12 h, po czym liofilizuje przy ciśnieniu 0,125 mbara przez min. 48 h.

W uzyskanych lizatach oraz w hydrolizacie określono wydajność procesu „rozpuszczania” (Y_A), stężenie uwolnionego białka ogólnego oraz uwolnionej D-glukozy, będącej produktem hydrolizy enzymatycznej beta-glukanów ściany komórkowej. Wyniki wyrażono w miligramach danej substancji na gram suchej masy ekstraktu drożdżowego (mg g⁻¹).

Wydajność obróbki wstępnej mierzy się pośrednio, w oparciu o ilość (wagę) substancji rozpuszczalnych w wodzie, uwolnionych z danej ilości biomasy. W tym celu z każdej butli pobrano 10 ml zawiesiny i oddzielono biomasę na drodze wirowania (3950 x g, 10 min). Objętość zebranego supernatantu zmierzono za pomocą cylindra miarowego, po czym pozostały osad drożdżowy zawieszono w identycznej objętości wody dejonizowanej i ponownie zwirowano. Uzyskane supernatanty połączono i oznaczono w nim zawartość suchej masy na drodze suszenia w 105°C, zgodnie z normą PN-A-79005-4:1997P. Wydajność procesu autolizy określono jako procent suchej masy biomasy drożdżowej przekształcony do postaci rozpuszczalnej:

$$MY[\%_{wag.}] = \frac{A - C}{(B \times B_m)} \times 100\%$$

gdzie:

MY (% wag.) – wydajność mikroenkapsulowania (ang. microencapsulation yield, MY)

A – masa oleju rybiego pozyskanego w ekstrakcji metodą Soxhletha, [g],

C – masa oleju rybiego pozyskana w ekstrakcji heksanem, [g],

B – masa naważki mikro kapsulek, [g],

B_m – sucha masa mikro kapsulek, [g].

W uzyskanym ekstrakcie o znanej zawartości suchej masy określono stężenie rozpuszczalnego białka całkowitego oraz stężenie uwolnionej glukozy. Wyniki wyrażono w miligramach danej substancji na gram suchej masy ekstraktu drożdżowego (mgg⁻¹). Określenie ilości białka całkowitego w próbach prowadzono przy wykorzystaniu zmodyfikowanej metody Lowry'ego. Do określenia ilości uwolnionej glukozy wykorzystano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Stosowano kolumnę Aminex HPX87H (Bio-Rad, USA) oraz 0,005 N H₂SO₄ jako fazę ruchomą. Pomiar ilości D-glukozy określano na podstawie krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla czystej D-glukozy (kalibracja zewnętrzna).

Pomiar ilości blendu olejów, kapsułkowanego wewnątrz komórek drożdży, wykonano metodą ekstrakcji w aparacie Soxhletha eterem naftowym. Naważkę ok. 2,5 g (masa określona z dokładnością do d = 0,001 g) suchych mikro kapsulek umieszczono w celulozowej gilzie i zamknięto korkiem z waty szklanej. Ekstrakcję prowadzono przez 2 h za pomocą 100 ml eteru naftowego w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Uzyskany ekstrakt przeniesiono ilościowo do wyprażonej i wstępnie zważonej (d = 0,0001 g) kolby miarowej i odparowano rozpuszczalnik w temp. 40°C za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej. Zawartość kolby suszono dodatkowo w 95°C przez godzinę. Masę oleju uzyskanego z danej porcji mikro kapsulek określono na podstawie różnicy w masach kolby zawierającej olej oraz kolby pustej.

Pomiar ilości blendu olejów, występującego na powierzchni mikro kapsulek drożdżowych, mierzono metodą szybkiej ekstrakcji heksanem. W tym celu naważkę 1 g suchych mikro kapsulek umieszczono w kolbie miarowej o pojemności 250 ml i napełniono 100 ml heksanu, po czym wytrząsano ręcznie przez 5 min. Komórki oddzielono poprzez filtrację przez bibułę filtracyjną Nr 3 (Whatman). Pozostałość biomasy płukano dodatkową porcją heksanu (100 ml). Uzyskane ekstrakty łączono i, po przeniesieniu do kolby okrągłodennej, określono ilość pozyskanego oleju metodą identyczną jak dla ekstrakcji oleju z wnętrza komórek.

Wydajność mikroenkapsulowania (ang. microencapsulation yield, MY) określono jako procentową zawartość kapsułkowanej substancji w danej masie mikro kapsulek i wyznaczano z poniższego równania:

$$MY [\%_{wag.}] = \frac{A - C}{(B \times B_m)} \times 100\%$$

MY (% wag.) – wydajność mikroenkapsulowania (ang. microencapsulation yield, MY)

A – masa oleju rybiego pozyskanego w ekstrakcji metodą Soxhletha, [g],

C – masa oleju rybiego pozyskana w ekstrakcji heksanem, [g],

B – masa naważki mikro kapsulek, [g],

B_m – sucha masa mikro kapsulek, [g].

Stabilność oksydacyjną blendu olejów, stabilizowanego wewnątrz komórek drożdży mierzono w trakcie 30 dni przechowywania w temperaturze pokojowej i w warunkach wilgotności względnej otoczenia wynoszących 0, 43 i 90%. W tym celu naważki suchych mikro kapsulek (10 g) rozsypano na szalkach Petriego o średnicy 5 cm i umieszczono w eksykatorach zawierających wyprażony żel krzemionkowy (0% wilgotności względnej, w.w.), nasycony roztwór K₂CO₃ (43% w.w.) lub KNO₃ (90% w.w.). Co 5 dni pobierano ok. 1 g mikro kapsulek i, po pozyskaniu oleju na drodze ekstrakcji, mierzono stopień utlenienia oleju poprzez pomiar liczby nadtlenkowej (LOO), zgodnie z procedurą PN-ISO 3960:1996P (Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej.). Uzyskany wynik wyrażono jako mikrorównoważnik aktywnego tlenu na 1 kg oleju (meqO₂-kg⁻¹). W celach porównawczych przeprowadzono doświadczenie dla natywnego blendu olejów w formie zemulgowanej.

Dla zminimalizowania wpływu ekstrakcji na wzrost liczby nadtlenkowej zrezygnowano z ekstrakcji metodą Soxhletha na rzecz ekstrakcji heksanem. W tym celu naważkę 1 g kapsulek zawieszono w 10 ml zimnego heksanu i dezintegrowano poprzez sonikację przez 10 min przy użyciu sonikatora. W trakcie procesu dezintegracji zawiesina była chłodzona w łaźni lodowej celem zminimalizowania przyrostu temperatury. Uzyskany ekstrakt przesączono przez bibułę filtracyjną i płukano pozostałość dwiema porcjami świeżego heksanu. Zebrane ekstrakty połączono i odparowano rozpuszczalnik w strumieniu azotu. Uzyskany olej przechowywano w szczelnie zamkniętym naczyniu w temperaturze -20°C.

Rozwiązanie według wynalazku przedstawiono w przykładach wykonania.

Przykład I

Sposób kapsułkowania blendów w komórkach drożdżowych według wynalazku polega na tym, że materiał wyjściowy, jaki stanowią drożdże piekarskie, korzystnie prasowane drożdże piekarskie o zawartości suchej masy nie mniejszej niż 25% wagowych, poddaje się procesowi płukania i suszenia liofilizacyjnego. Biomase w stężeniu 10% wag. płucze się w 0,01M roztworze bezwodnego wodorofosforanu dipotasu o pH 6,8, po czym oddziela się na drodze wirowania (3950 x g, 10 min) i uzyskaną masę o zawartości suchej substancji nie mniejszej niż 20% wag. umieszcza się na stalowych tacach liofilizacyjnych i zamraża w temp. -80°C przez 12 h. Zamrożoną biomasę poddaje się liofilizacji przy ciśnieniu 0,06 mbar przez 48 h. W uzyskanym proszku oznacza się metodą ekstrakcji odczynnikiem Folcha zawartość lipidów całkowitych, która wynosiła $4,7 \pm 0,55 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ proszku, oraz liczebność całkowitą komórek metodą opartą o bezpośredni pomiar w komorze Neubauera, wynoszącą $3,6 \times 10^{10} \text{ g}^{-1}$ proszku.

Następnie prowadzi się obróbkę wstępną biomasy tak, że w 10% wag. zawiesinę suchej masy drożdży o pH 5,2, w butlach szklanych typu „pyrex”, inkubuje się zawiesinę w temperaturze nie mniejszej niż 35°C i nie wyższej niż 75°C, korzystnie w temperaturze 55°C. Równocześnie korzystnie, gdy stosuje się dodatek octanu etylu lub chlorku sodu do wspomagania procesu ekstrakcji składników wewnątrzkomórkowych (plazmolizy). Korzystnie do biomasy dodaje się dodatek octanu etylu o wielkości w ilości od 0,5 do 6,5% wag. (w stosunku do masy zawiesiny), korzystnie 1,5% wag., oraz dodatek chlorku sodu w ilości od 5 do 40% wag., korzystnie 10% wag., po czym prowadzi się plazmolizę w temperaturze nie mniejszej niż 50°C i nie wyższej niż 60°C, korzystnie w trakcie procesu plazmolizy stosuje się temperaturę 55°C.

Następnie w procesie hydrolizy enzymatycznej, przygotowaną wcześniej zawiesinę drożdżową poddaje się wstępnej pasteryzacji w 95°C przez 10 minut celem inaktywacji endogennych enzymów. Do tak przygotowanej biomasy dodaje się glukazę (Glucanex R200; 0,2 U/mg) w ilości od 0,0015 do 1,5% wag., korzystnie 0,15% wag., po czym prowadzi się inkubację w temperaturze od 45°C do 55°C, korzystnie 50°C przez nie krócej niż 24 h.

Następnie prowadzi się proces wiązania blendów olejów w biomasie drożdży piekarskich metodą Bishop i in. (1998), przy czym w naczyniach typu „pyrex” o pojemności 100 ml odważa się porcję 40 g wody dejonizowanej zawierającej 2% wag. dodatku emulgatora w postaci monooleinianu polioksyetylenosorbitolu (Tween 80, E433), dopuszczonego do zastosowania w żywności, i dodaje się naważkę blendu olejów, po czym wytwarza się emulsję typu o/w metodą homogenizacji rotor/stator przez 5 minut przy prędkości $10\,000 \text{ min}^{-1}$ w homogenizatorze szybkoobrotowym.

Przy czym przez blendy olejowe rozumie się mieszaniny olejów, jakie zawierają olej ryżowy w ilości od 55% wagowych, jaki zmieszany jest korzystnie z olejem rzepakowym w ilości 45% wagowych, a wzajemny stosunek kwasów tłuszczowych omega 6 do omega 3 (w6/w3) opracowanej blendy zawarty jest w przedziale od 4 : 1 do 6 : 1.

Korzystnie, gdy zastosowane blendy olejowe mają następujący skład ilościowy:

Składnik I	Składnik II	Składnik III	% wag	% wag	% wag
Olej ryżowy	Rzepakowy	-	55	45	-

Do tak wytworzonej emulsji dodaje się odważoną porcję liofilizowanej biomasy drożdżowej. Mieszanie kapsułkującą inkubuje się następnie przez czas nie krótszy niż 8 h i przy ciągłym mieszaniu równym 200 min^{-1} . Po zakończeniu inkubacji, zawartość naczyń oddziela się od mieszaniny poreakcyjnej na drodze wirowania przy przyspieszeniu nie mniejszym niż 3950 x g przez okres nie krótszy niż 10 min. Oddzieloną pastę drożdżową płucze się następnie co najmniej trzykrotnie wodą dejonizowaną celem usunięcia resztek mieszaniny reakcyjnej. Moką biomasę przenosi się do naczyń do liofilizacji i zmraża w temp. -80°C przez 12 h, po czym liofilizuje przy ciśnieniu 0,125 mbara przez min. 48 h.

W uzyskanych lizatach oraz w hydrolizacie określono wydajność procesu „rozpuszczania” (Y_A), stężenie uwolnionego białka ogólnego oraz uwolnionej D-glukozy, będącej produktem hydrolizy enzymatycznej beta-glukanów ściany komórkowej. Wyniki wyrażono w miligramach danej substancji na gram suchej masy ekstraktu drożdżowego (mg g^{-1}).

Wydajność obróbki wstępnej mierzy się pośrednio, w oparciu o ilość (wagę) substancji rozpuszczalnych w wodzie, uwolnionych z danej ilości biomasy. W tym celu z każdej butli pobrano 10 ml zawiesiny i oddzielono biomasę na drodze wirowania (3950 x g, 10 min). Objętość zebranego supernatantu zmierzono za pomocą cylindra miarowego, po czym pozostały osad drożdżowy zawieszono w identycznej objętości wody dejonizowanej i ponownie zwirowano. Uzyskane supernatanty połączono i oznaczono w nim zawartość suchej masy na drodze suszenia w 105°C, zgodnie z normą PN-A-79005-4:1997P.

Wydajność procesu autolizy określono jako procent suchej masy biomasy drożdżowej przekształcony do postaci rozpuszczalnej:

$$MY[\%_{\text{wag.}}] = \frac{A - C}{(B \times B_m)} \times 100\%$$

gdzie:

MY (% wag.) – wydajność mikrokapsułkowania (ang. microencapsulation yield, MY)

A – masa oleju rybiego pozyskanego w ekstrakcji metodą Soxhleeta, [g],

C – masa oleju rybiego pozyskana w ekstrakcji heksanem, [g],

B – masa naważki mikrokapsulek, [g],

B_m – sucha masa mikrokapsulek, [g].

W uzyskanym ekstrakcie o znanej zawartości suchej masy, określono stężenie rozpuszczalnego białka całkowitego oraz stężenie uwolnionej glukozy. Wyniki wyrażono w miligramach danej substancji na gram suchej masy ekstraktu drożdżowego (mgg⁻¹). Określenie ilości białka całkowitego w próbach prowadzono przy wykorzystaniu zmodyfikowanej metody Lowry'ego. Do określenia ilości uwolnionej glukozy wykorzystano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Stosowano kolumnę Aminex HPX87H (Bio-Rad, USA) oraz 0,005 N H₂SO₄ jako fazę ruchomą. Pomiar ilości D-glukozy określano na podstawie krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla czystej D-glukozy (kalibracja zewnętrzna).

Pomiar ilości blendu olejów, kapsułkowanego wewnątrz komórek drożdży, wykonano metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleeta eterem naftowym. Naważkę ok. 2,5 g (masa określona z dokładnością do d = 0,001 g) suchych mikrokapsulek umieszczono w celulozowej gilzie i zamknięto korkiem z waty szklanej. Ekstrakcję prowadzono przez 2 h za pomocą 100 ml eteru naftowego w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Uzyskany ekstrakt przeniesiono ilościowo do wyprażonej i wstępnie zważonej (d = 0,0001 g) kolby miarowej i odparowano rozpuszczalnik w temp. 40°C za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej. Zawartość kolby suszono dodatkowo w 95°C przez godzinę. Masę oleju uzyskanego z danej porcji mikrokapsulek określono na podstawie różnicy w masach kolby zawierającej olej oraz kolby puste.

Pomiar ilości blendu olejów, występującego na powierzchni mikrokapsulek drożdżowych, mierzono metodą szybkiej ekstrakcji heksanem. W tym celu naważkę 1 g suchych mikrokapsulek umieszczono w kolbie miarowej o pojemności 250 ml i napełniono 100 ml heksanu, po czym wytrząsano ręcznie przez 5 min. Komórki oddzielono poprzez filtrację przez bibułę filtracyjną Nr 3 (Whatman). Pozostałość biomasy płukano dodatkową porcją heksanu (100 ml). Uzyskane ekstrakty łączono i, po przeniesieniu do kolby okrągłodennej, określono ilość pozyskanego oleju metodą identyczną jak dla ekstrakcji oleju z wnętrza komórek.

Wydajność mikrokapsułkowania (ang. microencapsulation yield, MY) określono jako procentową zawartość kapsułkowanej substancji w danej masie mikrokapsulek i wyznaczano z poniższego równania:

$$MY[\%_{\text{wag.}}] = \frac{A - C}{(B \times B_m)} \times 100\%$$

MY (% wag.) – wydajność mikrokapsułkowania (ang. microencapsulation yield, MY)

A – masa oleju rybiego pozyskanego w ekstrakcji metodą Soxhleeta, [g],

C – masa oleju rybiego pozyskana w ekstrakcji heksanem, [g],

B – masa naważki mikrokapsulek, [g],

B_m – sucha masa mikrokapsulek, [g].

Stabilność oksydacyjną blendu olejów, stabilizowanego wewnątrz komórek drożdży, mierzono w trakcie 30 dni przechowywania w temperaturze pokojowej i w warunkach wilgotności względnej otoczenia wynoszących 0, 43 i 90%. W tym celu naważki suchych mikrokapsulek (10 g) rozsypano na szalkach Petriego o średnicy 5 cm i umieszczono w eksykatorach zawierających wyprażony żel krzemionkowy (0% wilgotności względnej, w.w.), nasycony roztwór K₂CO₃ (43% w.w.) lub KNO₃ (90% w.w.). Co 5 dni

pobierano ok. 1 g mikrokapsulek i, po pozyskaniu oleju na drodze ekstrakcji, mierzono stopień utlenienia oleju poprzez pomiar liczby nadtlenkowej (LOO), zgodnie z procedurą PN-ISO 3960:1996P (Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej.). Uzyskany wynik wyrażono jako mikrorównoważnik aktywnego tlenu na 1 kg oleju ($\text{meqvO}_2\text{-kg}^{-1}$). W celach porównawczych przeprowadzono doświadczenie dla natywnego blendu olejów w formie zemulgowanej.

Dla zminimalizowania wpływu ekstrakcji na wzrost liczby nadtlenkowej zrezygnowano z ekstrakcji metodą Soxhleta na rzecz ekstrakcji heksanem. W tym celu naważkę 1 g kapsulek zawieszono w 10 ml zimnego heksanu i dezintegrowano poprzez sonikację przez 10 min przy użyciu sonikatora. W trakcie procesu dezintegracji zawiesina była chłodzona w łaźni lodowej celem zminimalizowania przyrostu temperatury. Uzyskany ekstrakt przesączono przez bibułę filtracyjną i płukano pozostałość dwiema porcjami świeżego heksanu. Zebrane ekstrakty połączono i odparowano rozpuszczalnik w strumieniu azotu. Uzyskany olej przechowywano w szczelnie zamkniętym naczyniu w temperaturze -20°C .

Przykład II

Przeprowadzone badania miały na celu opracowanie nowej metody, w oparciu o wykorzystanie biomasy drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*), blendów olejów tłoczonych na zimno o cechach prozdrowotnych z wykorzystaniem blendów zawierających zoptymalizowane mieszaniny olejów, jakie zawierają olej ryżowy w ilości 88% wagowych, jaki zmieszany jest z olejem rydzowym w ilości 12%, a wzajemny stosunek kwasów tłuszczowych omega 6 do omega 3 (w6/w3) opracowanej blendy zawarty jest w przedziale od 4 : 1 do 6 : 1.

Sposób kapsułkowania blendów w komórkach drożdżowych według wynalazku polega na tym, że materiał wyjściowy, jaki stanowią drożdże piekarskie, korzystnie prasowane drożdże piekarskie o zawartości suchej masy nie mniejszej niż 25% wagowych, poddaje się procesowi płukania i suszenia liofilizacyjnego. Biomase w stężeniu 10% wag. płucze się w 0,01M roztworze bezwodnego wodorofosforanu dipotasu o pH 6,8, po czym oddziela się na drodze wirowania ($3950 \times \text{g}$, 10 min) i uzyskaną masę o zawartości suchej substancji nie mniejszej niż 20% wag. umieszcza się na stalowych tacach liofilizacyjnych i zamraża w temp. -80°C przez 12 h. Zamrożoną biomase poddaje się liofilizacji przy ciśnieniu 0,06 mbar przez 48 h. W uzyskanym proszku oznacza się metodą ekstrakcji odczynnikami Folcha zawartość lipidów całkowitych, która wynosiła $4,7 \pm 0,55 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ proszku, oraz liczebność całkowitą komórek metodą opartą o bezpośredni pomiar w komorze Neubauera, wynoszącą $3,6 \times 10^{10} \text{ g}^{-1}$ proszku.

Następnie prowadzi się obróbkę wstępną biomasy, tak, że w 10% wag. zawiesinie suchej masy drożdży o pH 5,2, w butlach szklanych typu „pyrex”, inkubuje się zawiesinę w temperaturze nie mniejszej niż 35°C i nie wyższej niż 75°C , korzystnie w temperaturze 55°C . Równocześnie korzystnie, gdy stosuje się dodatek octanu etylu lub chlorku sodu do wspomagania procesu ekstrakcji składników wewnątrzkomórkowych (plazmolizy). Korzystnie do biomasy dodaje się dodatek octanu etylu o wielkości w ilości od 0,5 do 6,5% wag. (w stosunku do masy zawiesiny), korzystnie 1,5% wag., oraz dodatek chlorku sodu w ilości od 5 do 40% wag., korzystnie 10% wag., po czym prowadzi się plazmolizę w temperaturze nie mniejszej niż 50°C i nie wyższej niż 60°C , korzystnie w trakcie procesu plazmolizy stosuje się temperaturę 55°C .

Następnie w procesie hydrolizy enzymatycznej, przygotowaną wcześniej zawiesinę drożdżową poddaje się wstępnej pasteryzacji w 95°C przez 10 minut celem inaktywacji endogennych enzymów. Do tak przygotowanej biomasy dodaje się glukanazę (Glucanex R200; 0,2 U/mg) w ilości od 0,0015 do 1,5% wag., korzystnie 1,5% wag., po czym prowadzi się inkubację w temperaturze od 45°C do 55°C , korzystnie 50°C przez nie krócej niż 24 h.

Następnie prowadzi się proces wiązania blendów olejów w biomasie drożdży piekarskich metodą Bishop i in. (1998), przy czym w naczyniach typu „pyrex” o pojemności 100 ml odważa się porcję 40 g wody dejonizowanej zawierającej 2% wag. dodatku emulgatora w postaci monooleinianu polioksyetylenosorbitolu (Tween 80, E433), dopuszczonego do zastosowania w żywności, i dodaje się naważkę blendu olejów, po czym wytwarza się emulsję typu o/w metodą homogenizacji rotor/stator przez 5 minut przy prędkości $10\,000 \text{ min}^{-1}$ w homogenizatorze szybkoobrotowym.

Przy czym przez blendy olejowe rozumie się mieszaniny olejów, jakie zawierają olej ryżowy w ilości 88% wagowych, jaki zmieszany jest z olejem rydzowym w ilości 12%, a wzajemny stosunek kwasów tłuszczowych omega 6 do omega 3 (w6/w3) opracowanej blendy zawarty jest w przedziale od 4 : 1 do 6 : 1.

Korzystnie, gdy zastosowane blendy olejowe mają następujący skład ilościowy:

Składnik I	Składnik II	Składnik III	% wag	% wag	% wag
Olej ryżowy	Olej Rydzowy	-	88	12	-

Do tak wytworzonej emulsji dodaje się odważoną porcję liofilizowanej biomasy drożdżowej. Mieszanie kapsułkującą inkubuje się następnie przez czas nie krótszy niż 8 h i przy ciągłym mieszaniu równym 200 min⁻¹. Po zakończeniu inkubacji, zawartość naczyń oddziela się od mieszaniny poreakcyjnej na drodze wirowania przy przyspieszeniu nie mniejszym niż 3950 x g przez okres nie krótszy niż 10 min. Oddzieloną pastę drożdżową płucze się następnie co najmniej trzykrotnie wodą dejonizowaną celem usunięcia resztek mieszaniny reakcyjnej. Moką biomasę przenosi się do naczyń do liofilizacji i zmraża w temp. -80°C przez 12 h, po czym liofilizuje przy ciśnieniu 0,125 mbara przez min. 48 h.

W uzyskanych lizatach oraz w hydrolizacie określono wydajność procesu „rozpuszczania” (Y_A), stężenie uwolnionego białka ogólnego oraz uwolnionej D-glukozy, będącej produktem hydrolizy enzymatycznej beta-glukanów ściany komórkowej. Wyniki wyrażono w miligramach danej substancji na gram suchej masy ekstraktu drożdżowego (mg g⁻¹).

Wydajność obróbki wstępnej mierzy się pośrednio, w oparciu o ilość (wagę) substancji rozpuszczalnych w wodzie, uwolnionych z danej ilości biomasy. W tym celu z każdej butli pobrano 10 ml zawiesiny i oddzielono biomasę na drodze wirowania (3950 x g, 10 min). Objętość zebranego supernatantu zmierzono za pomocą cylindra miarowego, po czym pozostały osad drożdżowy zawieszono w identycznej objętości wody dejonizowanej i ponownie zwirowano. Uzyskane supernatanty połączono i oznaczono w nim zawartość suchej masy na drodze suszenia w 105°C, zgodnie z normą PN-A-79005-4:1997P.

Wydajność procesu autolizy określono jako procent suchej masy biomasy drożdżowej przekształcony do postaci rozpuszczalnej:

$$MY [\%_{\text{wag.}}] = \frac{A - C}{(B \times B_m)} \times 100\%$$

gdzie:

MY (% wag.) – wydajność mikrokapsułkowania (ang. microencapsulation yield, MY)

A – masa oleju rybiego pozyskanego w ekstrakcji metodą Soxhleta, [g],

C – masa oleju rybiego pozyskana w ekstrakcji heksanem, [g],

B – masa naważki mikrokapsulek, [g],

B_m – sucha masa mikrokapsulek, [g].

W uzyskanym ekstrakcie o znanej zawartości suchej masy, określono stężenie rozpuszczalnego białka całkowitego oraz stężenie uwolnionej glukozy. Wyniki wyrażono w miligramach danej substancji na gram suchej masy ekstraktu drożdżowego (mg g⁻¹). Określenie ilości białka całkowitego w próbach prowadzono przy wykorzystaniu zmodyfikowanej metody Lowry'ego. Do określenia ilości uwolnionej glukozy wykorzystano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Stosowano kolumnę Aminex HPX87H (Bio-Rad, USA) oraz 0,005 N H₂SO₄ jako fazę ruchomą. Pomiar ilości D-glukozy określano na podstawie krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla czystej D-glukozy (kalibracja zewnętrzna).

Pomiar ilości blendu olejów, kapsułkowanego wewnątrz komórek drożdży, wykonano metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta eterem naftowym. Naważkę ok. 2,5 g (masa określona z dokładnością do d = 0,001 g) suchych mikrokapsulek umieszczono w celulozowej gilzie i zamknięto korkiem z waty szklanej. Ekstrakcję prowadzono przez 2 h za pomocą 100 ml eteru naftowego w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Uzyskany ekstrakt przeniesiono ilościowo do wyprażonej i wstępnie zważonej (d = 0,0001 g) kolby miarowej i odparowano rozpuszczalnik w temp. 40°C za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej. Zawartość kolby suszono dodatkowo w 95°C przez godzinę. Masę oleju uzyskanego z danej porcji mikrokapsulek określono na podstawie różnicy w masach kolby zawierającej olej oraz kolby puste.

Pomiar ilości blendu olejów, występującego na powierzchni mikrokapsulek drożdżowych, mierzone metodą szybkiej ekstrakcji heksanem. W tym celu naważkę 1 g suchych mikrokapsulek umieszczono w kolbie miarowej o pojemności 250 ml i napełniono 100 ml heksanu, po czym wytrząsano ręcznie przez 5 min. Komórki oddzielono poprzez filtrację przez bibułę filtracyjną Nr 3 (Whatman). Pozostałość

biomasy płukano dodatkową porcją heksanu (100 ml). Uzyskane ekstrakty łączono i, po przeniesieniu do kolby okrągłodennej, określono ilość pozyskanego oleju metodą identyczną jak dla ekstrakcji oleju z wnętrza komórek.

Wydajność mikroksułowowania (ang. microencapsulation yield, MY) określono jako procentowy zawartość ksułowowanej substancji w danej masie mikroksułowek i wyznaczano z poniższego równania:

$$MY[\%_{\text{wag.}}] = \frac{A - C}{(B \times B_m)} \times 100\%$$

MY (% wag.) – wydajność mikroksułowowania (ang. microencapsulation yield, MY)

A – masa oleju rybiego pozyskanego w ekstrakcji metodą Soxhleeta, [g],

C – masa oleju rybiego pozyskana w ekstrakcji heksanem, [g],

B – masa naważki mikroksułowek, [g],

B_m – sucha masa mikroksułowek, [g].

Stabilność oksydacyjną blendu olejów, stabilizowanego wewnątrz komórek drożdży, mierzono w trakcie 30 dni przechowywania w temperaturze pokojowej i w warunkach wilgotności względnej otoczenia wynoszących 0, 43 i 90%. W tym celu naważki suchych mikroksułowek (10 g) rozsypano na szalkach Petriego o średnicy 5 cm i umieszczono w eksykatorach zawierających wyprażony żel krzemionkowy (0% wilgotności względnej, w.w.), nasycony roztwór K₂CO₃ (43% w.w.) lub KNO₃ (90% w.w.). Co 5 dni pobierano ok. 1 g mikroksułowek i, po pozyskaniu oleju na drodze ekstrakcji mierzono stopień utlenienia oleju poprzez pomiar liczby nadtlencowej (LOO), zgodnie z procedurą PN-ISO 3960:1996P (Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlencowej.). Uzyskany wynik wyrażono jako mikrorównoważnik aktywnego tlenu na 1 kg oleju (meqvO₂-kg⁻¹). W celach porównawczych przeprowadzono doświadczenie dla natywnego blendu olejów w formie zemulgowanej.

Dla zminimalizowania wpływu ekstrakcji na wzrost liczby nadtlencowej zrezygnowano z ekstrakcji metodą Soxhleeta na rzecz ekstrakcji heksanem. W tym celu naważkę 1 g ksułowek zawieszono w 10 ml zimnego heksanu i dezintegrowano poprzez sonikację przez 10 min przy użyciu sonikatora. W trakcie procesu dezintegracji zawiesina była chłodzona w łaźni lodowej celem zminimalizowania przyrostu temperatury. Uzyskany ekstrakt przesączono przez bibułę filtracyjną i płukano pozostałość dwiema porcjami świeżego heksanu. Zebrane ekstrakty połączono i odparowano rozpuszczalnik w strumieniu azotu. Uzyskany olej przechowywano w szczelnie zamkniętym naczyniu w temperaturze -20°C.

Przykład III

Sposób ksułowowania blendów w komórkach drożdżowych według wynalazku polega na tym, że materiał wyjściowy, jaki stanowią drożdże piekarskie, korzystnie prasowane drożdże piekarskie o zawartości suchej masy nie mniejszej niż 25% wagowych, poddaje się procesowi płukania i suszenia liofilizacyjnego. Biomase w stężeniu 10% wag. płucze się w 0,01M roztworze bezwodnego wodorofosforanu dipotasu o pH 6,8, po czym oddziela się na drodze wirowania (3950 x g, 10 min) i uzyskaną masę o zawartości suchej substancji nie mniejszej niż 20% wag. umieszcza się na stalowych tacach liofilizacyjnych i zamraża w temp. -80°C przez 12 h. Zamrożoną biomase poddaje się liofilizacji przy ciśnieniu 0,06 mbar przez 48 h. W uzyskanym proszku oznacza się metodą ekstrakcji odczynnikiem Folcha zawartość lipidów całkowitych, która wynosiła 4,7 ± 0,55 g 100 g⁻¹ proszku, oraz liczebność całkowitą komórek metodą opartą o bezpośredni pomiar w komorze Neubauera, wynoszącą 3,6 X 10¹⁰g⁻¹ proszku.

Następnie prowadzi się obróbkę wstępną biomasy, tak, że w 10% wag. zawiesinie suchej masy drożdży o pH 5,2, w butlach szklanych typu „pyrex”, inkubuje się zawiesinę w temperaturze nie mniejszej niż 35°C i nie wyższej niż 75°C, korzystnie w temperaturze 55°C. Równocześnie korzystnie, gdy stosuje się dodatek octanu etylu lub chlorku sodu do wspomagania procesu ekstrakcji składników wewnątrzkomórkowych (plazmolizy). Korzystnie do biomasy dodaje się dodatek octanu etylu o wielkości w ilości od 0,5 do 6,5% wag. (w stosunku do masy zawiesiny), korzystnie 1,5% wag., oraz dodatek chlorku sodu w ilości od 5 do 40% wag., korzystnie 10% wag., po czym prowadzi się plazmolizę w temperaturze nie mniejszej niż 50°C i nie wyższej niż 60°C, korzystnie w trakcie procesu plazmolizy stosuje się temperaturę 55°C.

Następnie w procesie hydrolizy enzymatycznej, przygotowaną wcześniej zawiesinę drożdżową poddaje się wstępnej pasteryzacji w 95°C przez 10 minut celem inaktywacji endogennych enzymów. Do tak przygotowanej biomasy dodaje się glukanazę (Glucanex R200; 0,2 U/mg) w ilości od 0,0015 do 1,5% wag., korzystnie 0,15% wag., po czym prowadzi się inkubację w temperaturze od 45°C do 55°C, korzystnie 50°C przez nie krócej niż 24 h.

Następnie prowadzi się proces wiązania blendów olejów w biomasie drożdży piekarskich metodą Bishop i in. (1998), przy czym w naczyniach typu „pyrex” o pojemności 100 ml odważa się porcję 40 g wody dejonizowanej zawierającej 2% wag. dodatku emulgatora w postaci monooleinianu polioksyetylenosorbitolu (Tween 80, E433), dopuszczonego do zastosowania w żywności, i dodaje się naważkę blendu olejów, po czym wytwarza się emulsję typu o/w metodą homogenizacji rotor/stator przez 5 minut przy prędkości 10 000 min⁻¹ w homogenizatorze szybkoobrotowym.

Przy czym przez blendy olejowe rozumie się mieszaniny olejów, jakie zawierają olej ryżowy w ilości 89% wagowych, jaki zmieszany jest z olejem lnianym w ilości 11% wagowych, a wzajemny stosunek kwasów tłuszczowych omega 6 do omega 3 (w6/w3) opracowanej blendy zawarty jest w przedziale od 4 : 1 do 6 : 1.

Korzystnie, gdy zastosowane blendy olejowe mają następujący skład ilościowy:

Składnik I	Składnik II	Składnik III	% wag	% wag	% wag
Olej ryżowy	Olej Lniany	-	89	11	-

Do tak wytworzonej emulsji dodaje się odważoną porcję liofilizowanej biomasy drożdżowej. Mieszaninę kapsułkującą inkubuje się następnie przez czas nie krótszy niż 8 h i przy ciągłym mieszaniu równym 200 min⁻¹. Po zakończeniu inkubacji, zawartość naczyń oddziela się od mieszaniny poreakcyjnej na drodze wirowania przy przyspieszeniu nie mniejszym niż 3950 x g przez okres nie krótszy niż 10 min. Oddzieloną pastę drożdżową płucze się następnie co najmniej trzykrotnie wodą dejonizowaną celem usunięcia resztek mieszaniny reakcyjnej. Mokłą biomasę przenosi się do naczyń do liofilizacji i zmraża w temp. -80°C przez 12 h, po czym liofilizuje przy ciśnieniu 0,125 mbara przez min. 48 h.

W uzyskanych lizatach oraz w hydrolizacie określono wydajność procesu „rozpuszczania” (Y_A), stężenie uwolnionego białka ogólnego oraz uwolnionej D-glukozy, będącej produktem hydrolizy enzymatycznej beta-glukanów ściany komórkowej. Wyniki wyrażono w miligramach danej substancji na gram suchej masy ekstraktu drożdżowego (mg g⁻¹).

Wydajność obróbki wstępnej mierzy się pośrednio, w oparciu o ilość (wagę) substancji rozpuszczalnych w wodzie, uwolnionych z danej ilości biomasy. W tym celu z każdej butli pobrano 10 ml zawiesiny i oddzielono biomasę na drodze wirowania (3950 x g, 10 min). Objętość zebranego supernatantu zmierzono za pomocą cylindra miarowego, po czym pozostały osad drożdżowy zawieszono w identycznej objętości wody dejonizowanej i ponownie zwirowano. Uzyskane supernatanty połączono i oznaczono w nim zawartość suchej masy na drodze suszenia w 105°C, zgodnie z normą PN-A-79005-4:1997P.

Wydajność procesu autolizy określono jako procent suchej masy biomasy drożdżowej przekształcony do postaci rozpuszczalnej:

$$MY[\%_{wag.}] = \frac{A - C}{(B \times B_m)} \times 100\%$$

gdzie:

MY (% wag.) – wydajność mikrokapsułkowania (ang. microencapsulation yield, MY)

A – masa oleju rybiego pozyskanego w ekstrakcji metodą Soxhleta, [g],

C – masa oleju rybiego pozyskana w ekstrakcji heksanem, [g],

B – masa naważki mikrokapsulek, [g],

B_m – sucha masa mikrokapsulek, [g].

W uzyskanym ekstrakcie o znanej zawartości suchej masy, określono stężenie rozpuszczalnego białka całkowitego oraz stężenie uwolnionej glukozy. Wyniki wyrażono w miligramach danej substancji na gram suchej masy ekstraktu drożdżowego (mg g⁻¹). Określenie ilości białka całkowitego w próbach prowadzono przy wykorzystaniu zmodyfikowanej metody Lowry’ego. Do określenia ilości uwolnionej glukozy wykorzystano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Stosowano kolumnę Aminex HPX87H (Bio-Rad, USA) oraz 0,005 N H₂SO₄ jako fazę ruchomą. Pomiar ilości D-glukozy określano na podstawie krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla czystej D-glukozy (kalibracja zewnętrzna).

Pomiar ilości blendu olejów, kapsułkowanego wewnątrz komórek drożdży, wykonano metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta eterem naftowym. Naważkę ok. 2,5 g (masa określona z dokładnością

do $d = 0,001$ g) suchych mikrokapsulek umieszczono w celulozowej gilzie i zamknięto korkiem z waty szklanej. Ekstrakcję prowadzono przez 2 h za pomocą 100 ml eteru naftowego w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Uzyskany ekstrakt przeniesiono ilościowo do wyprażonej i wstępnie zważonej ($d = 0,0001$ g) kolby miarowej i odparowano rozpuszczalnik w temp. 40°C za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej. Zawartość kolby suszono dodatkowo w 95°C przez godzinę. Masę oleju uzyskanego z danej porcji mikrokapsulek określono na podstawie różnicy w masach kolby zawierającej olej oraz kolby pustej.

Pomiar ilości blendu olejów, występującego na powierzchni mikrokapsulek drożdżowych, mierzono metodą szybkiej ekstrakcji heksanem. W tym celu naważkę 1 g suchych mikrokapsulek umieszczono w kolbie miarowej o pojemności 250 ml i napełniono 100 ml heksanu, po czym wytrząsano ręcznie przez 5 min. Komórki oddzielono poprzez filtrację przez bibułę filtracyjną Nr 3 (Whatman). Pozostałość biomasy płukano dodatkową porcją heksanu (100 ml). Uzyskane ekstrakty łączono i, po przeniesieniu do kolby okrągłodennej, określono ilość pozyskanego oleju metodą identyczną jak dla ekstrakcji oleju z wnętrza komórek.

Wydajność mikrokapsułkowania (ang. microencapsulation yield, MY) określono jako procentowy zawartość kapsułkowanej substancji w danej masie mikrokapsulek i wyznaczano z poniższego równania:

$$MY [\%_{\text{wag.}}] = \frac{A - C}{(B \times B_m)} \times 100\%$$

MY (% wag.) – wydajność mikrokapsułkowania (ang. microencapsulation yield, MY)

A – masa oleju rybiego pozyskanego w ekstrakcji metodą Soxhleta, [g],

C – masa oleju rybiego pozyskana w ekstrakcji heksanem, [g],

B – masa naważki mikrokapsulek, [g],

B_m – sucha masa mikrokapsulek, [g].

Stabilność oksydacyjną blendu olejów, stabilizowanego wewnątrz komórek drożdży, mierzono w trakcie 30 dni przechowywania w temperaturze pokojowej i w warunkach wilgotności względnej otoczenia wynoszących 0, 43 i 90%. W tym celu naważki suchych mikrokapsulek (10 g) rozsypano na szalkach Petriego o średnicy 5 cm i umieszczono w eksykatorach zawierających wyprażony żel krzemionkowy (0% wilgotności względnej, w.w.), nasycony roztwór K_2CO_3 (43% w.w.) lub KNO_3 (90% w.w.). Co 5 dni pobierano ok. 1 g mikrokapsulek i, po pozyskaniu oleju na drodze ekstrakcji mierzono stopień utlenienia oleju poprzez pomiar liczby nadtlencowej (LOO), zgodnie z procedurą PN-ISO 3960:1996P (Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlencowej.). Uzyskany wynik wyrażono jako mikrorównoważnik aktywnego tlenu na 1 kg oleju ($\text{meqvO}_2\text{-kg}^{-1}$). W celach porównawczych przeprowadzono doświadczenie dla natywnego blendu olejów w formie zemulgowanej.

Dla zminimalizowania wpływu ekstrakcji na wzrost liczby nadtlencowej zrezygnowano z ekstrakcji metodą Soxhleta na rzecz ekstrakcji heksanem. W tym celu naważkę 1 g kapsulek zawieszono w 10 ml zimnego heksanu i dezintegrowano poprzez sonikację przez 10 min przy użyciu sonikatora. W trakcie procesu dezintegracji zawiesina była chłodzona w łaźni lodowej celem zminimalizowania przyrostu temperatury. Uzyskany ekstrakt przesączono przez bibułę filtracyjną i płukano pozostałość dwiema porcjami świeżego heksanu. Zebrane ekstrakty połączono i odparowano rozpuszczalnik w strumieniu azotu. Uzyskany olej przechowywano w szczelnie zamkniętym naczyniu w temperaturze -20°C .

Przykład IV

Sposób kapsułkowania blendów w komórkach drożdżowych według wynalazku polega na tym, że materiał wyjściowy, jaki stanowią drożdże piekarskie, korzystnie prasowane drożdże piekarskie o zawartości suchej masy nie mniejszej niż 25% wagowych, poddaje się procesowi płukania i suszenia liofilizacyjnego. Biomase w stężeniu 10% wag. płucze się w 0,01M roztworze bezwodnego wodorofosforanu dipotasu o pH 6,8, po czym oddziela się na drodze wirowania ($3950 \times g$, 10 min) i uzyskaną masę o zawartości suchej substancji nie mniejszej niż 20% wag. umieszcza się na stalowych tacach liofilizacyjnych i zamraża w temp. -80°C przez 12 h. Zamrożoną biomasę poddaje się liofilizacji przy ciśnieniu 0,06 mbar przez 48 h. W uzyskanym proszku oznacza się metodą ekstrakcji odczynnikami Folcha zawartość lipidów całkowitych, która wynosiła $4,7 \pm 0,55 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ proszku, oraz liczebność całkowitą komórek metodą opartą o bezpośredni pomiar w komorze Neubauera, wynoszącą $3,6 \times 10^{10} \text{ g}^{-1}$ proszku.

Następnie prowadzi się obróbkę wstępną biomasy, tak że w 10% wag. zawiesinie suchej masy drożdży o pH 5,2, w butlach szklanych typu „pyrex”, inkubuje się zawiesinę w temperaturze nie mniejszej niż 35°C i nie wyższej niż 75°C , korzystnie w temperaturze 55°C . Równocześnie korzystnie, gdy stosuje

się dodatek octanu etylu lub chlorku sodu do wspomaganie procesu ekstrakcji składników wewnątrzkomórkowych (plazmolizy). Korzystnie do biomasy dodaje się dodatek octanu etylu o wielkości w ilości od 0,5 do 6,5% wag. (w stosunku do masy zawiesiny), korzystnie 1,5% wag., oraz dodatek chlorku sodu w ilości od 5 do 40% wag., korzystnie 10% wag., po czym prowadzi się plazmolizę w temperaturze nie mniejszej niż 50°C i nie wyższej niż 60°C, korzystnie w trakcie procesu plazmolizy stosuje się temperaturę 55°C.

Następnie w procesie hydrolizy enzymatycznej, przygotowaną wcześniej zawiesinę drożdżową poddaje się wstępnej pasteryzacji w 95°C przez 10 minut celem inaktywacji endogennych enzymów. Do tak przygotowanej biomasy dodaje się glukanazę (Glucanex R200; 0,2 U/mg) w ilości od 0,0015 do 1,5% wag., korzystnie 0,15% wag., po czym prowadzi się inkubację w temperaturze od 45°C do 55°C, korzystnie 50°C przez nie krócej niż 24 h.

Następnie prowadzi się proces wiązania blendów olejów w biomasie drożdży piekarskich metodą Bishop i in. (1998), przy czym w naczyniach typu „pyrex” o pojemności 100 ml odważa się porcję 40 g wody dejonizowanej zawierającej 2% wag. dodatku emulgatora w postaci monooleinianu polioksyetylenosorbitolu (Tween 80, E433), dopuszczonego do zastosowania w żywności, i dodaje się naważkę blendu olejów, po czym wytwarza się emulsję typu o/w metodą homogenizacji rotor/stator przez 5 minut przy prędkości 10 000 min⁻¹ w homogenizatorze szybkoobrotowym.

Przy czym przez blendy olejowe rozumie się mieszaniny olejów, jakie zawierają olej ryżowy w ilości 55 % wagowych, jaki zmieszany jest z olejem konopnym w ilości 15% wagowych i olejem rzepakowym w ilości 30%, a wzajemny stosunek kwasów tłuszczowych omega 6 do omega 3 (w6/w3) opracowanej blendy zawarty jest w przedziale od 4 : 1 do 6 : 1.

Korzystnie, gdy zastosowane blendy olejowe mają następujący skład ilościowy:

Składnik I	Składnik II	Składnik III	% wag	% wag	% wag
Olej ryżowy	Olej Konopny	Rzepakowy	55	15	30

Do tak wytworzonej emulsji dodaje się odważoną porcję liofilizowanej biomasy drożdżowej. Mieszaninę kapsułkującą inkubuje się następnie przez czas nie krótszy niż 8 h i przy ciągłym mieszaniu równym 200 min⁻¹. Po zakończeniu inkubacji, zawartość naczyń oddziela się od mieszaniny poreakcyjnej na drodze wirowania przy przyspieszeniu nie mniejszym niż 3950 x g przez okres nie krótszy niż 10 min. Oddzieloną pastę drożdżową płucze się następnie co najmniej trzykrotnie wodą dejonizowaną celem usunięcia resztek mieszaniny reakcyjnej. Mokłą biomasę przenosi się do naczyń do liofilizacji i zmraża w temp. -80°C przez 12 h, po czym liofilizuje przy ciśnieniu 0,125 mbara przez min. 48 h.

W uzyskanych lizatach oraz w hydrolizacie określono wydajność procesu „rozpuszczania” (Y_A), stężenie uwolnionego białka ogólnego oraz uwolnionej D-glukozy, będącej produktem hydrolizy enzymatycznej beta-glukanów ściany komórkowej. Wyniki wyrażono w miligramach danej substancji na gram suchej masy ekstraktu drożdżowego (mg g⁻¹).

Wydajność obróbki wstępnej mierzy się pośrednio, w oparciu o ilość (wagę) substancji rozpuszczalnych w wodzie, uwolnionych z danej ilości biomasy. W tym celu z każdej butli pobrano 10 ml zawiesiny i oddzielono biomasę na drodze wirowania (3950 x g, 10 min). Objętość zebranego supernatantu zmierzono za pomocą cylindra miarowego, po czym pozostały osad drożdżowy zawieszono w identycznej objętości wody dejonizowanej i ponownie zwirowano. Uzyskane supernatanty połączono i oznaczono w nim zawartość suchej masy na drodze suszenia w 105°C, zgodnie z normą PN-A-79005-4:1997P.

Wydajność procesu autolizy określono jako procent suchej masy biomasy drożdżowej przekształcony do postaci rozpuszczalnej:

$$MY[\%_{wag.}] = \frac{A - C}{(B \times B_m)} \times 100\%$$

gdzie:

MY (% wag.) – wydajność mikrokapsułkowania (ang. microencapsulation yield, MY)

A – masa oleju rybiego pozyskanego w ekstrakcji metodą Soxhleeta, [g],

C – masa oleju rybiego pozyskana w ekstrakcji heksanem, [g],

B – masa naważki mikrokapsulek, [g],

B_m – sucha masa mikrokapsulek, [g].

W uzyskanym ekstrakcie o znanej zawartości suchej masy, określono stężenie rozpuszczalnego białka całkowitego oraz stężenie uwolnionej glukozy. Wyniki wyrażono w miligramach danej substancji na gram suchej masy ekstraktu drożdżowego (mg g⁻¹). Określenie ilości białka całkowitego w próbach prowadzono przy wykorzystaniu zmodyfikowanej metody Lowry'ego. Do określenia ilości uwolnionej glukozy wykorzystano metodą wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). Stosowano kolumnę Aminex HPX87H (Bio-Rad, USA) oraz 0,005 N H₂SO₄ jako fazę ruchomą. Pomiar ilości D-glukozy określano na podstawie krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla czystej D-glukozy (kalibracja zewnętrzna).

Pomiar ilości blendu olejów, kapsułkowanego wewnątrz komórek drożdży, wykonano metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta eterem naftowym. Naważkę ok. 2,5 g (masa określona z dokładnością do d = 0,001 g) suchych mikrokapsulek umieszczono w celulozowej gilzie i zamknięto korkiem z waty szklanej. Ekstrakcję prowadzono przez 2 h za pomocą 100 ml eteru naftowego w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Uzyskany ekstrakt przeniesiono ilościowo do wyprażonej i wstępnie zważonej (d = 0,0001 g) kolby miarowej i odparowano rozpuszczalnik w temp. 40°C za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej. Zawartość kolby suszono dodatkowo w 95°C przez godzinę. Masę oleju uzyskanego z danej porcji mikrokapsulek określono na podstawie różnicy w masach kolby zawierającej olej oraz kolby pustej.

Pomiar ilości blendu olejów, występującego na powierzchni mikrokapsulek drożdżowych, mierzono metodą szybkiej ekstrakcji heksanem. W tym celu naważkę 1 g suchych mikrokapsulek umieszczono w kolbie miarowej o pojemności 250 ml i napełniono 100 ml heksanu, po czym wytrząsano ręcznie przez 5 min. Komórki oddzielono poprzez filtrację przez bibułę filtracyjną Nr 3 (Whatman). Pozostałość biomasy płukano dodatkową porcją heksanu (100 ml). Uzyskane ekstrakty łączono i, po przeniesieniu do kolby okrągłodennej, określono ilość pozyskanego oleju metodą identyczną jak dla ekstrakcji oleju z wnętrza komórek.

Wydajność mikrokapsułkowania (ang. Microencapsulation yield, MY) określono jako procentowy zawartość kapsułkowanej substancji w danej masie mikrokapsulek i wyznaczano z poniższego równania:

$$MY[\%_{\text{wag.}}] = \frac{A - C}{(B \times B_m)} \times 100\%$$

MY (% wag.) – wydajność mikrokapsułkowania (ang. microencapsulation yield, MY)

A – masa oleju rybiego pozyskanego w ekstrakcji metodą Soxhleta, [g],

C – masa oleju rybiego pozyskana w ekstrakcji heksanem, [g],

B – masa naważki mikrokapsulek, [g],

B_m – sucha masa mikrokapsulek, [g].

Stabilność oksydacyjną blendu olejów, stabilizowanego wewnątrz komórek drożdży, mierzono w trakcie 30 dni przechowywania w temperaturze pokojowej i w warunkach wilgotności względnej otoczenia wynoszących 0, 43 i 90%. W tym celu naważki suchych mikrokapsulek (10 g) rozsypano na szalkach Petriego o średnicy 5 cm i umieszczono w eksykatorach zawierających wyprażony żel krzemionkowy (0% wilgotności względnej, w.w.), nasycony roztwór K₂CO₃ (43% w.w.) lub KNO₃ (90% w.w.). Co 5 dni pobierano ok. 1 g mikrokapsulek i, po pozyskaniu oleju na drodze ekstrakcji, mierzono stopień utlenienia oleju poprzez pomiar liczby nadtlenkowej (LOO), zgodnie z procedurą PN-ISO 3960:1996P (Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej.). Uzyskany wynik wyrażono jako mikrorównoważnik aktywnego tlenu na 1 kg oleju (meqvO₂-kg⁻¹). W celach porównawczych przeprowadzono doświadczenie dla natywnego blendu olejów w formie zemulgowanej.

Dla zminimalizowania wpływu ekstrakcji na wzrost liczby nadtlenkowej zrezygnowano z ekstrakcji metodą Soxhleta na rzecz ekstrakcji heksanem. W tym celu naważkę 1 g kapsulek zawieszono w 10 ml zimnego heksanu i dezintegrowano poprzez sonikację przez 10 min przy użyciu sonikatora. W trakcie procesu dezintegracji zawiesina była chłodzona w łaźni lodowej celem zminimalizowania przyrostu temperatury. Uzyskany ekstrakt przesączono przez bibułę filtracyjną i płukano pozostałość dwiema porcjami świeżego heksanu. Zebrane ekstrakty połączono i odparowano rozpuszczalnik w strumieniu azotu. Uzyskany olej przechowywano w szczelnie zamkniętym naczyniu w temperaturze -20°C.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób kapsułkowania blendów w komórkach drożdżowych **znamienny tym**, że materiał wejściowy, jaki stanowią drożdże piekarskie o zawartości suchej masy nie mniejszej niż 25% wagowych, poddaje się procesowi płukania i suszenia liofilizacyjnego, następnie prowadzi się obróbkę wstępną biomasy tak, że w 10% wag. zawiesinie suchej masy drożdży o pH 5,2, w butlach szklanych typu „pyrex”, inkubuje się zawiesinę w temperaturze nie mniejszej niż 35°C i nie wyższej niż 75°C, po czym w procesie hydrolizy enzymatycznej, przygotowaną wcześniej zawiesinę drożdżową poddaje się wstępnej pasteryzacji w 95°C przez 10 minut i do tak przygotowanej biomasy dodaje się glukanazę (Glucanex R200; 0,2 U/mg) w ilości od 0,0015 do 1,5% wag., po czym prowadzi się inkubację w temperaturze od 45°C do 55°C, korzystnie 50°C przez nie krócej niż 24 h, po czym prowadzi się proces wiązania blendów olejów w biomase drożdży piekarskich metodą Bishop i in. (1998), przy czym w naczyniach typu „pyrex” o pojemności 100 ml odważa się porcję 40 g wody dejonizowanej zawierającej 2% wag. dodatku emulgatora w postaci monooleinianu polioksyetylenosorbitolu (Tween 80, E433), dopuszczonego do zastosowania w żywności, i dodaje się naważkę blendu olejów, po czym wytwarza się emulsję typu o/w metodą homogenizacji rotor/stator przez 5 minut przy prędkości 10 000 min⁻¹ w homogenizatorze szybkoobrotowym, przy czym przez blendy olejowe rozumie się mieszaniny olejów, jakie zawierają olej ryżowy w ilości od 39 do 91% wagowych, jaki zmieszany jest korzystnie z olejem rzepakowym w ilości od 39% do 55% wagowych, korzystnie 45% wagowych, albo korzystnie z olejem konopnym w ilości od 8% do 28% wagowych, korzystnie 15% wagowych albo korzystnie z olejem lnianym w ilości od 9% do 14% wagowych, korzystnie 11% wagowych albo korzystnie z olejem rydzowym w ilości od 10% do 15% wagowych, korzystnie 12% wagowych, przy czym, w przypadku zastosowania oleju konopnego skład mieszaniny uzupełniony jest do 100% olejem rzepakowym, a wzajemny stosunek kwasów tłuszczowych omega 6 do omega 3 (w6/w3) opracowanej blendy zawarty jest w przedziale od 4 : 1 do 6 : 1, a do tak wytworzonej emulsji dodaje się odważoną porcję liofilizowanej biomasy drożdżowej i mieszaninę kapsułkującą inkubuje się następnie przez czas nie krótszy niż 8 h i przy ciągłym mieszaniu równym 200 min⁻¹, a po zakończeniu inkubacji, zawartość naczyń oddziela się od mieszaniny poreakcyjnej na drodze wirowania przy przyspieszeniu nie mniejszym niż 3950 x g przez okres nie krótszy niż 10 min, po czym oddzieloną pastę drożdżową płucze się co najmniej trzykrotnie wodą dejonizowaną celem usunięcia resztek mieszaniny reakcyjnej, a mokrą biomasę przenosi się do naczyń do liofilizacji i zmraża w temp. -80°C przez 12 h, po czym liofilizuje przy ciśnieniu 0,125 mbara przez min. 48 h.
2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że biomasę w stężeniu 10% wag. płucze się w 0,01M roztworze bezwodnego wodorofosforanu dipotasu o pH 6,8, po czym oddziela się na drodze wirowania (3950 x g, 10 min) i uzyskaną masę o zawartości suchej substancji nie mniejszej niż 20% wag. umieszcza się na stalowych tacach liofilizacyjnych i zamraża w temp. -80°C przez 12 h, po czym zamrożoną biomasę poddaje się liofilizacji przy ciśnieniu 0,06 mbar przez 48 h.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2 **znamienny tym**, że korzystnie, gdy do biomasy stosuje się dodatek octanu etylu lub chlorku sodu do wspomaganie procesu ekstrakcji składników wewnątrzkomórkowych (plazmolizy).
4. Sposób według zastrz. 3 **znamienny tym**, że do biomasy dodaje się dodatek octanu etylu o wielkości w ilości od 0,5 do 6,5% wag. (w stosunku do masy zawiesiny) oraz dodatek chlorku sodu w ilości od 5 do 40% wag., po czym prowadzi się plazmolizę w temperaturze nie mniejszej niż 50°C i nie wyższej niż 60°C.
5. Sposób według zastrz. 4 **znamienny tym**, że w trakcie procesu plazmolizy stosuje się temperaturę 55°C.
6. Sposób według zastrz. 1 albo 2, albo 3, albo 4, albo 5 **znamienny tym**, że zastosowane blendy olejowe mają następujący skład ilościowy:

Składnik I	Składnik II	Składnik III	% wag	% wag	% wag
Olej ryżowy	Rzepakowy	-	55	45	-
Olej ryżowy	Olej Rydzowy	-	88	12	-
Olej ryżowy	Olej Lniany	-	89	11	-
Olej ryżowy	Olej Konopny	Rzepakowy	55	15	30