



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01383**

(22) Data de depozit: **21.12.2010**

(41) Data publicării cererii:

29.06.2012

BOPI nr. **6/2012**

(71) Solicitant:

• **INSTITUTUL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PROTECȚIA PLANTELOR,**

*BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO*

(72) Inventatori:

• **OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **ȘTEFAN AURORA LILIANA,**

*BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*

• **LUPU CARMEN, INTRAREA BÂRSEI
NR.5, BL.G3, SC.A, ET.2, AP.24,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE ÎNCAPSULARE A DROJDIILOR
ANTAGONISTE, PROCEDEU DE USCARE ȘI
CONDIȚIONARE A DROJDIILOR ÎNCAPSULATE
RECUPERATE DUPĂ FERMENTAȚIA ALCOOLICĂ ȘI
BIOPREPARAT REZULTAT PRIN FOLOSIREA ACESTORA**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de încapsulare a drojdiilor antagoniste, destinate producerii de bioetanol prin fermentația hidrolizatelor de cereale, la un procedeu de uscare și condiționare a drojdiilor încapsulate recuperate după fermentația alcoolică, și la biopreparatul rezultat, care este utilizat pentru protecția plantelor împotriva agenților fitopatogeni și, în special, împotriva ciupercilor fito patogene și toxigene. Procedul de încapsulare cuprinde amestecarea unei soluții 1M de bicarbonat de sodiu cu o suspensie concentrată de drojdie, adăugarea suspensiei rezultate peste acid alginic, extrudarea suspensiei de drojdie

încapsulată în alginat de sodiu, cu formare de micro-granule sferice, care se coagulează în soluție 0,25 M de CaCl_2 , spălarea și menținerea granulelor în soluție Ringer până la utilizare, după care se combină cu hidrolizat din făină de grâu, se fermentează pentru reducerea conținutului de glucoză, se separă și se supun uscării și condiționării, rezultând un produs cu granulație mai mică de 1 mm și umectabilitate superioară, cu un conținut de cel puțin 10 la 8 ufc/g de compoziție drojdii viabile.

Revendicări: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



14

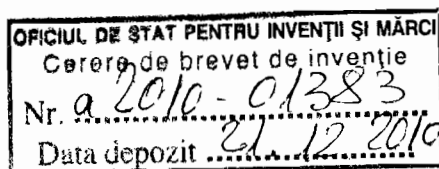
**PROCEDEU DE ÎNCAPSULARE A DROJDIILOR ANTAGONISTE, PROCEDEU DE
USCARE ȘI CONDITIONARE A DROJDIILOR ÎNCAPSULATE RECUPERATE
DUPA FERMENTATIA ALCOOLICA SI BIOPREPARAT REZULTAT PRIN
FOLOSIREA ACESTORA**

Prezenta invenție se referă la un procedeu de încapsulare a drojdiilor antagoniste, destinate producerii de bioetanol prin fermentația alcoolică a hidrolizatorilor de cereale, în special a celor provenite din loturi contaminate cu micotoxine, la un procedeu de uscare și condiționare a drojdiilor încapsulate recuperate după fermentația alcoolică și la biopreparatul rezultat prin folosirea succesivă a celor două procedee, destinat protecției plantelor împotriva agenților fitopatogeni, și în special împotriva ciupercilor fitopatogene și toxigene.

Sunt cunoscute mai multe procedee de încapsulare a drojdiilor utilizate pentru fermentația alcoolică, drojdiile încapsulate prezentând avantajul de a fi îndepărtate mai ușor din mediul de fermentație. Brevetul SUA 5070019 descrie un procedeu prin care drojdiile, *Saccharomyces bayanus* și/sau *Saccharomyces cerevisiae*, sunt încapsulate în granule de alginat de calciu și apoi sunt folosite pentru producerea de băuturi alcoolice. Procedul descris implică adăugarea amestecului de alginat de sodiu 0,5...5% - biomasă de drojdii, sub formă de picături extrudate printr-un ac de seringă, într-o soluție de 0,5% ...20% CaCl_2 , întărirea granulelor prin menținerea timp de 30... 80 min în soluția de CaCl_2 , spălarea granulelor pentru 100... 500 min, cu apă având max. 5 g/l săruri, uscarea granulelor spălate la temperaturi de 10...50°C și utilizarea respectivelor drojdii încapsulate pentru fermentație alcoolică.

Procedul de încapsulare descris produce granule de dimensiuni relativ ridicate, de 1..3 mm, datorită extrudării printr-un ac de seringă. În practică sunt de preferat granule de drojdie de dimensiuni mai mici, pentru că acestea prezintă o suprafață mai mare de contact dintre lichidul de fermentat și granulele cu drojdii încapsulate. Brevetul SUA 6217916 se referă la un procedeu de încapsulare a drojdiilor cu formare de granule de dimensiuni submilimetrice. Procedul prevede o microemulsionare prealabilă, a amestecului de (pre)polimer - drojdii de imobilizat, într-un ulei alimentară, urmat apoi de polimerizarea / gelifierea (pre)polimerului din microemulsie.

Toate aceste procedee produc drojdii care sunt imobilizate în rețeaua de alginat de calciu care le încapsulează. Imobilizarea celulelor de drojdie este favorizată de omogenizarea inițială în soluțiile de alginat de sodiu. Soluțiile de alginat de sodiu sunt ușor acide, întrucât la fabricarea alginatului din biomasă algală tratarea cu hidroxid de sodiu urmărește solubilizarea biopolimerului din pereții celulari și nu neutralizarea tuturor resturilor de acizi uronici. Caracterul acid al soluției de alginat de sodiu determină modificarea înspre pozitiv a încărcăturii electrice a suprafeței celulelor de



drojdie, datorită caracterului amfoter al resturilor de aminoacizi din proteinele peretelui celular. Celule de drojdie încărcate pozitiv sunt fixate de rețeaua de molecule de alginat, fiind apoi total imobilizate prin formarea rețelei tridimensionale de alginat reticulat cu ioni de calciu.

În cazul drojdiilor antagoniste imobilizarea prezintă dezavantajul reducerii ratei de multiplicare a celulelor datorită constrângerilor sterice care inhibă procesele de diviziune celulară prin înmugurire. Pentru drojdiile antagoniste agenților fitopatogeni, care sunt destinate atât fermentației alcoolice, cât și realizării de produse pentru protecția plantelor, este necesară multiplicarea biomasei concomitent cu desfășurarea proceselor fermentative, deci sunt necesare procedee de încapsulare care să asigure în același timp dimensiuni de ordinul sutelor de microni și o structură cu constrângeri sterice minime pentru celulele de drojdii sechestrate prin încapsulare.

Prelucrarea ulterioară a acestor drojdii antagoniste încapsulate, recuperate după fermentare, destinate fabricării de biopreparate de uz fitosanitar, implică și dezvoltarea unui procedeu de uscare și de condiționare prin amestecarea cu ingredientii de condiționare.

Cererea de brevet SUA US2004/0018274 descrie un procedeu de uscare a biomasei de drojdii recuperate după procesul de fermentație, prin care se asigură o rată ridicată de supraviețuire și o bună reactivare metabolică. Prin acest procedeu biomasa de drojdie este trecută succesiv prin două tipuri de soluții, una care conține stabilizatori de tipul trehalozei, maltitolului, manitolului, xilozei, și a doua care conține agenți de reducere a activității apei de tipul glicerolului, maltitolului și xilitolului, după care uscarea se face la max. 30°C, într-un uscător de tip pat fluid. Pentru creșterea productivității ar fi utilă utilizarea unor uscătoare cu o capacitate de uscare mai mare per unitatea de timp, așa cum sunt de exemplu uscătoarele prin pulverizare. Brevetul SUA 3962467 precizează însă clar o limită a temperaturii de uscare prin pulverizare de maximum 55°C. Peste această temperatură rata de supraviețuire a drojdiilor scade semnificativ. Întrucât uscarea prin pulverizare la temperaturi de sub 55°C nu determină reducerea suficientă a conținutului de apă, în cadrul procedeeului protejat prin brevetul SUA 3962467 se utilizează un procedeu de uscare combinat, uscare prin pulverizare continuată prin uscare în pat fluid. Particulele care rezultă prin acest ciclu de uscare au dimensiuni de peste 1 mm, dar mai mici de 1,7 mm.

La uscarea drojdiilor încapsulate trebuie evitată agregarea granulelor de alginat, cu formarea de particule de dimensiuni mari, dificil de omogenizat cu ingredientii de condiționare. Uscarea în pat fluid poate determina o agregare semnificativă a granulelor de alginat, deci acest procedeu de uscare trebuie evitat pe cât posibil.

Uscarea granulelor de polimer hidrofili / alginat care conțin drojdii (antagoniste) încapsulate generează un produs cu o umectabilitate redusă datorită caracterului



21-12-2010

hidrocoloid, rezultat dintr-o hidrofilicitate ridicată a (bio)polimerilor cu masa moleculară mare utilizați pentru încapsulare (alginat) și a celor produși de drojdii (beta-glucani din peretele celular al drojdiilor). Unii dintre compuși utilizați uzual pentru creșterea ratei de supraviețuire a drojdiilor la uscare (trehaloză, maltitol, xilitol, glicerol) accentuează caracterul hidrocoloid, cu înrăutățirea umectabilității biopreparatului final.

Utilizarea finală a produsului, în aplicații de protecția plantelor cultivate împotriva agenților de dăunare, impune însă o umectabilitate ridicată. Procedul de uscare trebuie deci să ducă la formarea unui produs cu o granulație mai mică de 1 mm și cu o umectabilitate superioară, asigurând în același timp o productivitate ridicată, cu supraviețuirea drojdiilor în cursul etapelor de uscare și de depozitare și menținerea unei capacități ridicate de reactivare metabolică.

Umectabilitatea poate fi ameliorată și în cursul etapei de amestecare cu ingredientii de condiționare, prin adăugarea unor agenți de umectare și a unor surfactanți suplimentari. În afară de umectabilitate, compozițiile pe bază de drojdii antagoniste utilizate în combaterea agenților fitopatogeni trebuie să îndeplinească și alte criterii specifice utilizării ca produse de protecția plantelor, respectiv stabilitate la păstrare, absența formării de pulberi potențial alergene la manipulare, suspendabilitate, timp redus de omogenizare, eventual capacitate de autosuspendare în apă, spumare redusă la amestecarea cu apă dură. Brevetul SUA 5780023 descrie o compoziție pe baza a două drojdii antagoniste, *Pichia guilliermondii* NRRL Y-18314 și *Hanseniaspora uvarum* NRRL Y-18527, care conține un agent purtător (amidon, silicagel, talc), combinat cu un agent de suspendare (tragacantă, gumă karaya, gumă carob, xantan, metilceluloză), la care se pot adăuga prezervanți, agenți umectanți, surfactanți pentru realizarea unui biopreparat care să corespundă cerințelor utilizării practice. Agenții purtători asigură o bună supraviețuire a drojdiilor în timp, iar agenții de suspendare asigură o bună suspendabilitate, dar combinația drojdii - amidon - metilceluloză de ex. generează materiale cu caracter hidrocoloid pronunțat, dificil de solubilizat în apă. Acțiunea agenților umectanți și a surfactanților este redusă datorită durtății crescute a apei folosite uzual pentru tratamentele în agricultură (care este de obicei apă de fântână, motiv pentru care testele produselor de protecția plantelor se fac cu apă dură standard). De asemenea compoziția care se realizează trebuie să includă exclusiv agenți de umectare biocompatibili, pentru a nu afecta supraviețuirea în timp a drojdiilor condiționate.

În cazul particular al compozițiilor pe bază de drojdii antagoniste, încapsulate în granule de alginat sub-milimetrice, compoziția trebuie să asigure fixarea biopreparatului pe materialul vegetal pentru a evita spălarea lui de precipitați, rouă sau vânt și menținerea relativ constantă a activității apei pentru a permite reactivarea metabolică a drojdiilor și eliberarea lor din matricea de încapsulare.



Procedeul de încapsulare a drojdiile antagoniste este alcătuit din următoarele etape:

- amestecarea a 800 ml soluție bicarbonat de sodiu 1M cu 200 ml de suspensie drojdie antagonistă *Saccharomyces cerevisiae* L30b, concentrată, care conține în jur de 10^7 ufc drojdii /ml;
- adăugarea celor 1000 ml de suspensie de drojdii în bicarbonat de sodiu 1 M peste 17,6g acid alginic și solubilizarea acidului alginic prin formarea de alginat de sodiu și eliberare de bioxid de carbon;
- formarea microgranulelor sferice prin extrudarea suspensiei de celule de drojdie - alginat de sodiu printr-un ac bont, la o rată constantă de 0,25 ml/min, realizată cu ajutorul unei pompe de tip seringă de 20 ml, și sub acțiunea combinată a gravitației și a unui câmp electric format de un generator electrostatic de picături, care generează o diferență de potențial electric de 6 kV pe distanța de 2,5 cm între acul de formare a picăturilor și baia de coagulare cu soluție de CaCl_2 0,25 M;
- menținerea timp de 30... 35 min a granulelor în soluția de clorură de calciu, pentru întărire;
- spălarea granulelor prin introducere timp de 15 min în apă distilată;
- menținerea granulelor de alginat cu drojdie încapsulată până la utilizare în soluție fiziologică Ringer, dar nu mai mult de 48 ore;
- omogenizarea granulelor cu hidrolizat din făină de cereale, grâu, orz sau porumb, obținut în două etape, prin fluidificare și zaharificare, în proporție volumetrică de 5 ml granule cu drojdii încapsulate la 95 ml hidrolizat din făină de cereale conținând 150 g/l zaharuri fermentescibile, care poate fi contaminat cu micotoxine precum deoxinivalenol, DON, peste limitele maxime admisibile;

Procedeul de uscare și condiționare a drojdiilor încapsulate recuperate după fermentare este alcătuit din următoarele etape:

- spălarea granulelor cu drojdie încapsulată cu soluție Ringer, în raport de 1:2, pe o sită granulometrică de 30... 60 mesh;
- amestecarea a 300 g de granule de alginat cu drojdii încapsulate cu 1000 ml soluție de bicarbonat de sodiu 0,1 M și omogenizarea suspensiei cu 0,75...0,85 g stearat de magneziu și 0,05...0,07 g ascorbat de sodiu;
- uscarea suspensiei astfel rezultate pe o instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20,000 rpm a discului atomizor, la o temperatură de intrare a agentului de uscare de 120 ... 140°C și la o temperatură de ieșire a agentului de uscare de 65...70°C;



- amestecarea a 28...28,5 g granule uscate cu 3,1... 3,2 g acid acrilic, 2,9...3,0 g acid citric, 1,4 ...1,6 g alcool polivinilic;
- dizolvarea separată a 0,7 ... 0,75 g de lecitină în 5 ml de alcool etilic;
- granularea umedă a 36...36,3 g de amestec conținând granule de alginat uscate cu 5 ml soluție alcoolică preparată ca mai sus;
- uscarea timp de 4... 5 ore a produsului rezultat ca urmare a granulării umede în uscător cu tăvi la presiune normală și la temperatură de max. 30°C.

Biopreparatul rezultat ca aplicare a procedeelor menționate are următoarea compoziție: 18,5 .. 20 părți de alginat de calciu, 7,5...7,7 părți de bicarbonat de sodiu, 3,2... 3,3 părți acid poli-acrilic, 2,9...3,0 părți acid citric, 1,4 ...1,6 părți alcool polivinilic, 0,7...0,75 părți lecitină, 0,65.. 0,7 părți de stearat de calciu, 0,04.. 0,045 părți ascorbat de sodiu și cel puțin 10^8 ufc drojdii per gram de compoziție.

Procedeul de încapsulare a drojdiilor antagoniste prezintă următoarele avantaje:

- celulele de drojdie nu se fixează de rețeaua moleculelor de alginat, ci sunt respinse de acestea întrucât au aceeași încărcătură electrică negativă ca urmare a suspendării inițiale într-o soluție cu pH bazic;
- celulele de drojdie care nu sunt imobilizate prezintă o mai mare libertate de mișcare și o mai mare libertate de diviziune;
- efervescenta blândă rezultată la solubilizarea acidului alginic determină o omogenizare foarte bună a moleculelor de alginat, cu expunerea lor în întreaga masă de suspensie;
- granulele care se formează sunt de dimensiuni submilimetrice datorită acțiunii de reducere a tensiunii superficiale de către moleculele de alginat sub acțiunea câmpului electric.

Procedeul de uscare și condiționare a drojdiilor încapsulate recuperate după fermentare prezintă următoarele avantaje:

- limitează tendința de aglomerare a granulelor de alginat de calciu datorită repulsiei electrostatice dintre particulele cu aceeași sarcină, rezultată ca urmare a suspendării în mediu ușor bazic;
- reduce timpul de expunere a drojdiilor la temperaturi ridicate ca urmare a turației ridicate a discului atomizor și a efectului lubrifiant și de reducere a tensiunii superficiale exercitat de stearatul de magneziu;
- asigură o rată bună supraviețuire a drojdiilor în timpul proceselor de uscare și de depozitare datorită acțiunii protective a acidului ascorbic;
- asigură o umectabilitate bună a compoziției rezultate, ca urmare a structurii granulate poroase formate prin granulare umedă.

Compoziția de biopreparat rezultat ca aplicare a procedeelor menționate are următoarele avantaje:



21-12-2010

- nu formează pulberi potențial alergene datorită structurii granulare;
- conține exclusiv agenți de condiționare biocompatibili, care nu afectează supraviețuirea drojdiilor;
- are o umectabilitate ameliorată sub acțiunea lecitinei și a stearatului;
- prezintă capacitate ridicată de autosuspendare în apă datorită sistemului efervescent;
- are o suspendabilitate superioară, care este asigurată de agenții de suspendare pe care-i conține, alcool polivinilic, sau care se formează la dizolvare, poliacrilatul de sodiu și citratul de sodiu;
- nu spumează datorită creșterii semnificative a vâscozității sub acțiunea combinată a poliacrilatului de sodiu și a alcoolului polivinilic;
- asigură o bună fixare de suprafața materialului vegetal, sub acțiunea aderentă conjugată a alcoolului polivinilic și a poliacrilatului de sodiu;
- formează pelicule pe suprafața resturilor vegetale pe care se aplică, în care apa este reținută de macromoleculele cu caracter hidrofil ridicat.

Se prezintă mai jos un exemplu de realizare a invenției.

Exemplu. Se prepară 200 ml de suspensie de drojdie antagonistă, de exemplu *Saccharomyces cerevisiae* L30b, conform procedurilor cunoscute, cum ar fi de exemplu reluarea biomasei crescute la suprafața unui mediu agarizat sau concentrarea biomasei crescute pe mediu lichid aerat și agitat. Numărul de celule de drojdie se măsoară prin numărare pe lamelă citometrică sau prin determinarea densității optice la 600 nm (considerând $DO_{600}=1$ pentru 3×10^7 ufc drojdii/ml). Se aduc cei 200 ml de suspensie de drojdie la o concentrație de 10^7 ufc drojdii /ml și se amestecă cu 800 ml soluție bicarbonat de sodiu 1M. Cei 1000 ml de suspensie de drojdii în bicarbonat de sodiu 1 M se aduc peste 17,6g acid alginic și se solubilizează acidului alginic prin formarea de alginat de sodiu și eliberare de bioxid de carbon.

Granulele sferice care conțin celule de drojdie încapsulate se formează prin extrudarea suspensiei de celule de drojdie - alginat de sodiu printr-un ac bont, la o rată constantă de 0,25 ml/min. Această extrudare este realizată cu ajutorul unei pompe de tip seringă de 20 ml (Harvard Apparatus sau KD Scientific). Acțiunea de formare a picăturilor de suspensie drojdie în alginat de sodiu este sub acțiunea combinată a gravitației și a unui câmp electric format de un generator electrostatic, care generează o diferență de potențial electric de 6 kV pentru doi electrozi placă, situați unul pe acul bont de formare a picăturilor, la care este polul negativ și al doilea pe baia de coagulare cu soluție de $CaCl_2$ 0,25 M, la care este polul pozitiv. Distanța dintre cei doi electrozi este de 2,5 cm, iar câmpul electric se asigură fie cu un generator electrostatic de picături (cum este de exemplu cel de la Niso Engineering, Elveția), fie o sursă care are capacitatea de a genera potențiale de 5 kV (cum este de exemplu sursa EV262 de



la Consort, Belgia) la care se adaptează electrozi placă. Sub acțiunea câmpului electric este forțată migrarea moleculelor încărcate electric către suprafața picăturii; având aceeași sarcină ele se vor respinge reciproc, reducând tensiunea superficială care determină de fapt mărimea picăturilor - granulelor formate, menținând integritatea picăturilor de suspensie până la o anumită masă. Sub acțiunea câmpului electric se vor forma deci picături de dimensiuni mai mici, care vor genera granule sferice de dimensiuni mai mici.

Granulele sferice formate prin coagularea alginatului în soluție de clorură de calciu se mențin timp de 30... 35 min în soluția de clorură de calciu, pentru întărire. Se spală apoi prin introducere timp de 15 min în apă distilată și apoi se mențin granulele de alginat cu drojdie încapsulată până la utilizare în soluție fiziologică Ringer (NaCl 6g, KCl 0,075g, CaCl₂ 0,1 g, NaHCO₃ 0,1 g), dar nu mai mult de 48 ore. Se omogenizează granulele cu hidrolizat din făină de grâu. Hidrolizatul de făină de grâu (sau din oricare altă cereală) se obține conform procedeelelor cunoscute, prin fluidificare cu α -amilază bacteriană termorezistentă și zaharificare cu gluco-amilază fungică.

Hidrolizatul preparat ca mai sus se amestecă cu granule conținând drojdie încapsulată, în proporție volumetrică de 5 ml granule cu drojdii încapsulate la 95 ml hidrolizat din făină de cereale. Se continuă fermentație timp de circa 42 ore, până la reducerea concentrației de glucoză la mai puțin de 2 g/l. Granule de alginat cu drojdie încapsulată se separă de plămada fermentată prin trecere pe o sită granulometrică de 30...60 mesh, fiind apoi supuse procesului de uscare și condiționare.

Granulele de alginat cu drojdii încapsulate recuperate după fermentare spălarea granulelor cu drojdie încapsulată se spală cu soluție Ringer, în raport de 1 volum granule : 2 părți soluție Ringer, pe o sită granulometrică de 30... 60 mesh. Se amestecă 300 g de granule de alginat cu drojdii încapsulate cu 1000 ml soluție de bicarbonat de sodiu 0,1 M și se omogenizează suspensia cu 0,75...0,85 g stearat de magneziu și 0,05...0,07 g ascorbat de sodiu. Suspensia se usucă pe o instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20,000 rpm a discului atomizor, la o temperatură de intrare a agentului de uscare de 120 ... 140°C și la o temperatură de ieșire a agentului de uscare de 65...70°C. O instalație de uscare prin pulverizare care poate fi utilizată în acest scop este de exemplu Niro Production Minor Unit, produsă de Niro Gea sau Laboratory spray dryer, produsă de ICF Cibec. După uscare se amestecă 28...28,5 g granule uscate cu 3,1... 3,2 g acid acrilic, 2,9...3,0 g acid citric, 1,4 ...1,6 g alcool polivinilic. Produsul rezultat, 36...36,3 g de amestec conținând granule de alginat uscate, se granulează cu 5 ml soluție alcoolică, care conține 0,7 ... 0,75 g de lecitină dizolvate în 5 ml de alcool etilic. Se usucă timp de 4... 5 ore produsul rezultat ca urmare a granulării umede în uscător cu tăvi la presiune normală și la temperatură de



max. 30°C. Se formează un biopreparat care conține granule spongioase de dimensiuni de 3...4 mm. Acest biopreparat rezultă ca aplicare a procedeelor menționate are următoarea compoziție: 18,5 .. 20 părți de alginat de calciu, 7,5...7,7 părți de bicarbonat de sodiu, 3,2... 3,3 părți acid poliacrilic, 2,9...3,0 părți acid citric, 1,4 ...1,6 părți alcool polivinilic, 0,7...0,75 părți lecitină, 0,65.. 0,7 părți de stearat de calciu, 0,04.. 0,045 părți ascorbat de sodiu și cel puțin 10^8 ufc drojdii per gram de compoziție.

Procedeele descrise în exemplul de mai sus au fost aplicate pe un hidrolizat realizat din făină de grâu contaminată cu deoxinivalenol (DON) la un nivel de 1400 µg/kg, nivel peste limita admisibilă de 1,2 ppm. Într-un vas de reacție din inox, prevăzut cu manta rezistentă la abur 1 bar, 121°C, de 10 l, s-au adus 1360 g făină de grâu, conținând circa 818 g amidon, care au fost dispersate cu 3 l apă distilată, amestecându-se până la formarea unei paste. Vasul de reacție conținând pasta de făină de grâu a fost menținut timp de 5 min la 105 °C pentru a se produce gelatinizarea amidonului. După autoclavare flaconul a fost răcit la 95°C și incubat la această temperatură. În pasta de făină de grâu la 95°C s-au adăugat 5 g de α-amilază bacteriană (activitate enzimatică > 1500 U / kg), 3 ml soluție dintr-o soluție 1 mM de clorură de calciu (conținând 1 µM de Ca^{2+} per ml, respectiv 4 mg de ioni de calciu pentru 100 g de pastă de amidon = 40 mg/kg = 40 ppm Ca^{2+}). Suspensia gelifiată a fost incubată la 95°C timp de 2 ore. La sfârșitul perioadei de incubare s-a verificat solubilizarea amidonului, adăugând peste 2..3 ml suspensie fluidizată, răcită la temperatura camerei, 0,1 ml soluție de iod în iodură de potasiu (preparată prin dizolvarea 2 g iod și 5 g iodura de potasiu în 100 ml apă distilată). Cu această soluție de iod amidonul formează o culoare albastră specifică, iar maltodextrinele rezultate prin solubilizarea amidonului / fluidificarea suspensiei de făină gelifiate generează o culoare roșiatică, a cărei intensitate descrește cu gradul de hidroliză. Soluția rezultată prin fluidificarea făinii de grâu a fost răcită la 55°C și s-au adăugat 7,5 ml de amiloglucozidază fungică (activitate enzimatică > 2000 U/kg). S-a incubat timp de 8 ore pentru zaharificare; la final s-au prelevat probe de 1 ml în care s-au determinat grupările reducătoare cu reactiv DNS. Soluția de zaharuri fermentescibile rezultată a fost adusă la 6000 ml cu apă distilată, pentru a se obține o soluție conținând 150 g/l. Peste cei 6000 ml apă distilată s-au adus 300 ml granule cu drojdie antagonistă *Saccharomyces cerevisiae* L30b (număr de depozit DSM 23648, orice altă drojdie antagonistă fermentativă putând fi folosită), încapsulată conform exemplului de mai sus. S-a procedat la fermentare, la separarea granulelor cu drojdie încapsulată, la uscarea și condiționarea granulelor cu drojdie încapsulată conform exemplului de mai sus, ca și la suspendarea biopreparatului în apă dură standard, 1 g la 1000 ml (echivalent al unei doze de 1 kg/ha reluată în 1000 ml). După fiecare stadiu s-a determinat numărul de drojdii încapsulate prin tehnica unităților formatoare de colonii.

Prima diluție a fost realizată în soluție 2% de citrat de sodiu, pentru a dizolva gelul de alginat de calciu. În același timp s-a verificat și păstrarea caracteristicilor antagoniste *in vitro* ale drojdiei *S. cerevisiae* L30b, încapsulate și prelucrate conform procedeele descrise, față de o tulpină de *Fusarium graminearum* DSM 4527 producătoare de deoxinivalenol DON.

Tab.1. Influența diferitelor etape ale procedeele conform invenției asupra numărului de drojdii antagoniste încapsulate și a activității antagoniste a drojdiilor

Etape conform procedee invenție	Număr drojdii (ufc per gram granule)	Activitate antagonistă <i>in vitro</i> față de <i>F. graminearum</i> DSM4527*
Încapsulare	$2,5 \times 10^7$	0,1; Puternic antagonist (PA)
După fermentarea hidrolizatului de cereale contaminat cu DON	$3,7 \times 10^{10}$	0,1; Puternic antagonist (PA)
După uscare prin pulverizare	$1,2 \times 10^8$	0,1; Puternic antagonist (PA)
După condiționare și reluare în apă dură standard	$1,5 \times 10^8$	0,1; Puternic antagonist (PA)

*Antagonism (A) cu atât mai puternic (PA) cu cât valorile coeficientului x sunt mai apropiate de valoarea 0; calcularea coeficientului x s-a realizat pe baza raportului dintre razele interne (i) și externe (e) ale ciupercii test (A) și a drojdiei (B), după formula : $x = iA/iB \times eB/Ea$.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tab.1. Aceste rezultate dovedesc: (i) înmulțirea semnificativă a drojdiilor antagoniste încapsulate în timpul fermentației, în pofida încapsulării și a prezenței DON în exces; (ii) supraviețuirea drojdiei antagoniste în cursul etapelor de uscare și condiționare, inclusiv la reluarea biopreparatului în soluții apoase; (iii) păstrarea proprietăților antagoniste *in vitro* ale drojdiilor supuse operațiilor de încapsulare și de fermentare, multiplicare, uscare și condiționare în stare încapsulată.

În cursul fermentației au fost monitorizați principalii parametri specifici, respectiv concentrația de etanol (și parametrii derivați precum randamentul și productivitatea volumetrică) și concentrația de glucoză (determinată prin lichid cromatografie) și numărul de drojdii încapsulate, determinate prin tehnica unităților formatoare de colonii, după realizarea primei diluții în soluție 2% de citrat de sodiu, pentru a dizolva gelul de alginat de calciu. Condițiile analizei lichid cromatografice prin care s-au determinat simultan concentrația de alcool și de glucoză au fost: Sistem Agilent 1290 Infinity LC, coloana Hi-Plex H 8 μ m, 300 x 7,7 mm, p/n: PL1170-6830; eluent: acid sulfuric 5 mM; gradient isocratic; flux de 0,7 ml/min., volum injectat 20 μ l, temperatură 60°C, presiune 4.6 MPa (46 bari), detector cu indice de refracție, menținut la 55°C. Rezultatele sunt prezentate în tab. 2.



Tab.2. Evoluția unor parametri specifici fermentației hidrolizatului de făină de grâu contaminat cu DON prin utilizarea drojdiilor antagoniste imobilizate conform procedurii descris în invenție.

Timp fermentație (ore)	25	40
Concentrație etanol (%g/g)	7,97	8,98
Randament etanol (g/g)	0,45	0,52
Productivitate volumetrică (g/l/h)	3,06	0,52
Concentrație reziduală de glucoză (g/l)	87,6	2,36
Număr celule drojdie ($\times 10^{10}$ ufc)	0,15	2,24

Aceste rezultate din tab. 2 arată o capacitatea ridicată de fermentare a hidrolizatelor de cereale contaminate cu micotoxine de către drojdiile antagoniste încapsulate în granule de alginat de calciu, în paralel cu o multiplicare peste limita uzual întâlnită în procesele de fermentare cu drojdii.

S-a testat și capacitatea biopreparatului obținut în final, comparativ cu cea a suspensiei de drojdii de aceeași concentrație în limitarea producerii de ascospori de către ciuperca *Fusarium graminearum* Schw. DSM 4527 (teleomorfa *Gibberella zea* Schw. Petch). Ciuperca toxigenă, forma conidială, *F. graminearum*, a fost cultivată pe mediu înclinat cartof – glucoză - agar. După 7 zile de creștere cultura a fost reluată în tampon fosfat salin, pH 7,2, adusă la 10^5 ufc/ml și inoculată (0,1 ml / g) peste paie de grâu sterilizate prin autoclavare. Același tratament a fost aplicat și unor variante experimentale tratate aseptice (anterior, concomitent sau ulterior) cu biopreparat realizat conform exemplului (0,1 ml dintr-o suspensie realizată prin dizolvarea a 1 g biopreparat la 1 l suspensie, pentru 10 g de paie) și cu inocul de reluat de pe mediu YEM agarizat, înclinat (inoculare 0,1 ml suspensie 10^5 ufc/ml per g de paie).

Paiele au fost trecute apoi aseptice pe plăci Roux, închise cu dopuri de vată, care conțineau câte 5 g de vermiculit steril, umectat cu câte 5 ml de apă sterilă. Plăcile au fost incubate timp de 21 zile, la 25°C, și în lumină fluorescentă cu dominantă în UV apropiat (2 lămpi F40 BLB, două lămpi F40 CWX, Philips). Vermiculitul a fost reumectat de două ori pe săptămână. Captarea ascosporilor s-a realizat cu ajutorul unor lamele de microscop 25 x 75 mm, tratate cu silicon și plasate la 10 mm de gâtul plăcii Roux. După 21 de zile s-a lăsat vermiculitul să se usuce timp de 5 zile, după care a fost re-umectat abundent cu 7 ml de apă sterilă. Această alternanță a favorizat ejectarea sporilor din apoteci. Spori captați în uleiul siliconi au fost numărați la microscop, pe 25% din suprafața lamelei. Fiecare variantă experimentală a fost realizată în trei repetiții, iar întregul experimentul a fost repetat o dată. Datele au fost interpretate pe baza testului Friedman pentru măsurări repetate. Rezultatele sunt prezentate în tab.3. de mai jos.



Tab.3. Influența aplicării biopreparatului pe bază tulpinii de drojdie antagonistă *S. cerevisiae* L30b obținută conform procedeelelor descrise în invenție, comparativ cu a suspensiei de drojdii antagoniste L30b, asupra producerii de ascospori de către *Fusarium graminearum* DSM 4527 (teleomorfa *Gibberella zea*).

Varianta experimentală	Ascospori ($\times 10^5$) per cm^2 de substrat	% față de martor
Martor, paie de grâu neinoculate cu microorganisme antagoniste, inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	12,6 a	-
Pre-inoculat cu biopreparat cf. ex., inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	1,71 c	13,57%
Inoculat concomitent cu biopreparat cf. ex., inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	2,61 bc	20,71%
Post-inoculat cu biopreparat cf. ex., inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	4,27 b	25,95%
Pre-inoculat cu 0,1 ml suspensie L30b 10^5 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	1,62 a	12,86%
Inoculat concomitent cu 0,1 ml suspensie L30b 10^5 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	2,87 bc	22,78%
Post-inoculat cu 0,1 ml suspensie L30b 10^5 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	4,15 b	32,94%

* valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru testul Friedman la 0,05 nivel de încredere.

Rezultatele din tab.3. demonstrează că biopreparatul realizat pe baza procedeelelor descrise în invenție este eficientă în reducerea dezvoltării și sporulării ciupercilor fitopatogene și toxigene *F. graminearum*. Tulpina condiționată sub formă de biopreparat rezultat în urma aplicării procedeelelor conform invenției este la fel de eficace ca și tulpina ca atare, aplicată sub formă de suspensie.



21-12-2010

**PROCEDEU DE ÎNCAPSULARE A DROJDIILOR ANTAGONISTE, PROCEDEU DE
USCARE ȘI CONDITIONARE A DROJDIILOR ÎNCAPSULATE RECUPERATE
DUPA FERMENTATIA ALCOOLICA ȘI BIOPREPARAT REZULTAT PRIN
FOLOSIREA ACESTORA**

Revendicări

1. Procedeul de încapsulare a drojdiile antagoniste conform invenției caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: amestecarea a 800 ml soluție bicarbonat de sodiu 1M cu 200 ml de suspensie drojdie antagonistă *Saccharomyces cerevisiae* L30b, concentrată, care conține în jur de 10^7 ufc drojdii /ml; adăugarea celor 1000 ml de suspensie de drojdii în bicarbonat de sodiu 1 M peste 17,6g acid alginic și solubilizarea acidului alginic prin formarea de alginat de sodiu și eliberare de bioxid de carbon; formarea microgranulelor sferice prin extrudarea suspensiei de celule de drojdie - alginat de sodiu printr-un ac bont, la o rată constantă de 0,25 ml/min, realizată cu ajutorul unei pompe de tip seringă de 20 ml, și sub acțiunea combinată a gravitației și a unui câmp electric format de un generator electrostatic de picături, care generează o diferență de potențial electric de 6 kV pe distanța de 2,5 cm între acul de formare a picăturilor și baia de coagulare cu soluție de CaCl_2 0,25 M; menținerea timp de 30... 35 min a granulelor în soluția de clorură de calciu, pentru întărire; spălarea granulelor prin introducerea timp de 15 min în apă distilată; menținerea granulelor de alginat cu drojdie încapsulată până la utilizare în soluție fiziologică Ringer, dar nu mai mult de 48 ore; omogenizarea granulelor cu hidrolizat din făină de cereale, grâu, orz sau porumb, obținut în două etape, prin fluidificare și zaharificare, în proporție volumetrică de 5 ml granule cu drojdii încapsulate la 95 ml hidrolizat din făină de cereale conținând 150 g/l zaharuri fermentescibile, care poate fi contaminat cu micotoxine precum deoxinivalenol, DON, peste limitele maxime admisibile.
2. Procedeul de uscare și condiționare a drojdiilor încapsulate conform revendicării 1, recuperate după fermentare, caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: spălarea granulelor cu drojdie încapsulată cu soluție Ringer, în raport de 1:2, pe o sită granulometrică de 30... 60 mesh; amestecarea a 300 g de granule de alginat cu drojdii încapsulate cu 1000 ml soluție de bicarbonat de sodiu 0,1 M și omogenizarea suspensiei cu 0,75...0,85 g stearat de magneziu și 0,05...0,07 g ascorbat de sodiu; uscarea suspensiei astfel rezultate pe o instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20,000 rpm a discului atomizor, la o temperatură de intrare a agentului de uscare de 120 ... 140°C și la o temperatură de ieșire a agentului de uscare de 65...70°C; amestecarea a 28...28,5 g granule uscate cu 3,1... 3,2 g acid acrilic, 2,9...3,0 g acid citric, 1,4 ...1,6 g alcool



2 1 -12- 2010

2

polivinilic; dizolvarea separată a 0,7 ... 0,75 g de lecitină în 5 ml de alcool etilic; granulara umedă a 36...36,3 g de amestec conținând granule de alginat uscate cu 5 ml soluție alcoolică preparată ca mai sus; uscarea timp de 4... 5 ore a produsului rezultat ca urmare a granulării umede în uscător cu tăvi la presiune normală și la temperatură de max. 30°C.

3. Biopreparat rezultat ca aplicare a procedurii conform revendicării 2 caracterizat prin aceea că este alcătuit din: 18,5 .. 20 părți de alginat de calciu, 7,5...7,7 părți de bicarbonat de sodiu, 3,2... 3,3 părți acid poliacrilic, 2,9...3,0 părți acid citric, 1,4 ...1,6 părți alcool polivinilic, 0,7..0,75 părți lecitină, 0,65.. 0,7 părți de stearat de calciu, 0,04.. 0,045 părți ascorbat de sodiu și cel puțin 10^8 ufc drojdii per gram de compoziție.

