



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00600**

(22) Data de depozit: **29/08/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2021** BOPI nr. **11/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. **6/2017**

(73) Titular:
• **PHARMACORP INNOVATION S.R.L.**,
SPLAIUL UNIRII NR. 313, ET. 2, CAM.6,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **BĂRBULESCU IULIANA DIANA**,
ALEEA MACULUI FA22, SC. A, AP. 5,
SLATINA, OT, RO;

• **MARINESCU SIMONA-IOANA**,
ȘOS. IANCULUI NR. 68, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **FRINCUI MIHAI**, SAT POROSCHIA,
COMUNA POROSCHIA, TR, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CN 1683516; MD 4086

(54) **BIOINGREDIENT PE BAZĂ DE BIOMASĂ DE DROJDIE
ADAPTATĂ, ÎMBOGĂȚITĂ ÎN CALCIU, ȘI PROCEDEU
DE OBȚINERE**



RO 131952 B1

Invenția se referă la obținerea unui produs pe bază de biomasă de drojdie de adaptată la calciu și îmbogățită în calciu, care nu prezintă risc pentru sănătate și care are capacitatea de a regla deficitul de calciu din organismul uman. Drojdiile sunt cunoscute pentru abilitatea lor de a capta diferite forme de minerale în structura lor.

Sunt cunoscute cercetări actuale privind obținerea pe bază de drojdii îmbogățite în minerale (seleniu, crom, zinc), prin care acestea în timpul fermentației submerse sunt legate de proteinele din biomasa obținută.

Este cunoscut faptul privind obținerea de biomasă de drojdie îmbogățită în crom (**RO 123279 B1**), drojdiile adaptate au o capacitate mărită de asimilare a metalelor în biomasă.

În prezent se cunosc procedee de obținere de biomasă de drojdie cromiata, drojdie îmbogățită în crom și seleniu care utilizează o tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* adaptată la concentrații ridicate de crom (**RO 123279 B1**).

Este cunoscut procedeul de obținere de biomasă de drojdie îmbogățită în crom și seleniu (**RO 125079 B1**).

Persoanele cu boala celiaca au o nevoie tot mai mare de calciu, comparativ cu populația generală adultă. Adulții cu boala celiaca au nevoie de o doză de calciu între 1000 miligrame (mg) și 1500 mg în fiecare zi.

Obținerea și utilizarea de biomase de drojdii îmbogățite în forme organice de calciu prin intermediul unor procedee biotehnologice este avantajos în scopul eliminării formelor anorganice și organice de sinteză chimică (calciu sulfat, calciu lactate, calciu propionat).

Pentru drojdiile cu calciu privind adaptarea la calciu, nu există studii în pragul actual al cunoașterii.

Seleniul este singurul element mineral care înlocuiește sulful din structura metioninei, singurul care formează legătură covalentă, formând selenometionina. Este cunoscut faptul că prezența selenitului de sodiu adăugat în timpul fermentației cu drojdii adaptate la seleniu se captează în forma organică în concentrații ridicate în biomasă finală.

Cromul, spre deosebire de seleniu, formează legături coordinative, precum factorul GTF.

Biomasa de drojdii îmbogățită cu calciu conform invenției, elimină dezavantajul utilizării produselor de sinteză, ca spre exemplu: pantotenat de calciu, propionat de calciu, sulfat de calciu, lactat de calciu.

Este cunoscută invenția care se bazează pe utilizarea tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* ZGFH-66 CGMCC No.1116 utilizând-o pentru fermentarea berii în prezența calciului în vederea obținerii de biomasă de drojdie cu calciu (**CN 200410032718**).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unui bioingredient pe bază de biomasă de drojdii izolate din must de vin, îmbogățite în calciu cu ajutorul drojdiilor adaptate (4e) la diferite forme ce calciu organic (calciu lactat).

Soluția constă în obținerea unui bioingredient pe bază de biomasă de drojdie îmbogățită în calciu pentru a fi folosit ca biofotificant și supliment alimentar pentru a ajusta deficiența de calciu din organism, deficiență care poate provoca diferite boli.

Pentru obținerea bioingredientului este necesară adaptarea drojdiilor la lactat de calciu (4e) în vederea izolării lor pentru obținerea unor culturi de drojdii adaptate la lactat de calciu.

Bioingredientul conform invenției, este constituit din biomasa de drojdie îmbogățită în calciu, iar procedeul de obținere al biomasei, conform invenției, conține următoarele faze:

- obținerea preinoculului de laborator;
- obținerea culturii adaptate;

- obținerea inoculului de laborator;	1
- fermentația propriu-zisă a mediului de cultură însămânțat cu inoculul de laborator și care utilizează drept sursă de calciu pentru bioconversie, calciu lactat.	3
Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:	
- bioingredientul obținut utilizează o tulpină de drojdie izolată din must de vin și cunoscută, dar adaptată la diferite forme de calciu. Un patern identic al tulpinii 4 e a fost identificat cu tulpina <i>S. cerevisiae</i> CBS 1171 ^T , ca și control (M.S. Cappello, G. Bleve, F. Grieco, 2004). Pot fi utilizate și alte drojdii similare izolate din biomasa de must de vin;	5
- bioingredientul obținut prezintă un grad ridicat de asimilare al calciului, în biomasa de drojdie (400-6000 mg/100g);	7
- bioingredientul pe bază de biomasă de drojdie cu calciu poate fi folosit pentru obținerea de suplimente alimentare;	9
- bioingredientul pe bază de biomasă de drojdie îmbogățită în calciu poate fi adăugat ca bioingredient, ca biofortificant și in suplimente alimentare;	11
- bioingredientul pe bază de drojdie îmbogățită în calciu utilizează tulpini adaptate la calciu, care prezintă un grad ridicat de asimilare al calciului în biomasă finală;	13
- bioingredientul utilizează în timpul fermentației lactat de calciu care este folosit ca atare ca și stimulator de creștere al pâinii în industria de panificație;	15
- tulpina adaptată a prezentat o eficiență crescută privind asimilarea calciului și nu este modificată genetic comparativ cu cea martor în urma analizei REP- PCR.	17
Se dă în continuare un exemplu de obținere a bioingredientului pe bază de biomasă de drojdie îmbogățită în calciu.	19
Proba martor (4) și adaptată (4e) au fost testate prin analize de REP-PCR.	21
Probele Control 4, și cea adaptată la calciu - 4e au făcut parte din același grup de testare (testare grupa 1) prin folosirea de primeri: BOX A1R, GTG5, Eric1, Eric2 și BOXA2R.	23
Preinoculul (cultura statică) se prepară din cultura de întreținere a unei colonii de <i>S. cerevisiae</i> selectată și adaptată anterior prin cultivarea pe mediu YMS-agar la temperatura de 28-30°C timp de 48 ore.	25
Mediul YMS (yeast extract - malt extract) - agar g/l:	27
- extract de drojdie 5,0;	
- extract de malț 20,0;	29
- zahăr 20;	
- agar-agar 25,0;	31
- apă distilată 1000 ml.	
Preinoculul este apoi utilizat la prepararea inoculului lichid astfel: cultura dintr-un tub/2 tuburi înclinat este folosită la obținerea inoculului, care se incubează apoi la temperatura de 30°C timp de 15-22 ore cu agitare (150 240rpm) (inoculul YSP), pe bază de extract de drojdie și extract de malț și zahăr alimentar.	33
Mediu inocul 2- YPS: Extract de drojdie; Peptona hy-soy; Sucroza; Apă distilată - 100 ml.	35
Într-un fermentator 41 Vu (Vt = 61), mediu de cultură ce conține g % (v/v): extract de drojdie 0.3...0.7, zahăr alimentar inițial (150 g/3.2 l inițial), săruri de Mg ²⁺ , K ⁺ și NH ₄ ⁺ . Soluția de calciu lactat 9g % - 300 ml a fost adăugată în porții de câte 50 ml pe parcursul procesului; este însămânțată cu drojdia adaptată cu inocul 1/2 dezvoltat anterior, la următorii parametri tehnologici:	37
- durata de cultivare: 12- 20 h;	39
- temperatura: 30°C;	41
- pH pe parcursul cultivării: 4-5;	43
- rata de agitare: 300 rpm-550 rpm.	45

RO 131952 B1

După separarea biomasei de drojdie îmbogățită în calciu prin centrifugare la 4000 rpm timp de 10 min, aceasta s-a purificat prin spălări repetate pentru îndepărtarea reziduurilor metalice extracelulare neprocesate și apoi a fost supusă uscării prin liofilizare.

Cel mai comod și rapid mod de a efectua separarea biomasei de drojdie de mediul de fermentație este aplicarea centrifugării, prin care se realizează separarea celulelor de drojdie de mediul de cultură și de metaboliți.

O separare bună s-a realizat la 3000-4500 rpm timp de 10-15 minute, utilizând o centrifugă Sorvall (4 x 400 ml).

Pentru îndepărtarea mediului de cultură reținut între celulele de drojdie, precum și a sărurilor de Ca rămase neprocesate, este necesară spălarea de trei ori cu apă distilată a biomasei separate. Spălarea se efectuează prin agitare energetică urmată de centrifugare și descărcarea apei de spălare.

Liofilizarea:

- uscarea drojdiilor s-a efectuat prin procesul de liofilizare;
- acesta constă în două operații: înghețarea probelor în etape succesive și sublimarea gheții cu ajutorul vidului înaintat;
- drojdiile au fost turnate în cutii Petri;
- liofilizarea s-a făcut timp de 48 de ore, în mai multe etape;
- atât temperatura de pe rafturile liofilizatorului cât și cea din probă este măsurată de senzori de temperatură;
- s-a realizat o soluție de calciu care s-a adăugat pe parcursul cultivării;
- pe parcursul cultivării s-a realizat corecția mediului de fermentație cu o soluție bazică în vederea păstrării pH-ului în intervalul 4.2-5.0.

S-a observat faptul că, adaosul de calciu împreună cu sursa de zahăr, pe parcursul fermentației, duce la captarea a 400-6694 mg/100g Ca total.

Proba	Determina re Calciu (mg/100g)	Proteină g/100	Pb (mg/kg)	Cd (mg/k g)	Bacterii Coliforme	Drojdie	Mucegaiuri
Biomasa de drojdie - martor adaptat Martor 4e - fără adaos de calciu	43.12	48.89	0.0026	0.011	Sub 10	5.5x10 ⁶	Sub 10
Biomasă de drojdie îmbogățită în calciu Martor 4 cu adaos calciu	400-6694 mg/100	50	0.0026	0.011	Sub 10	7.3x10 ⁶	Sub 10

1. Procedeu de obținere a unui bioingredient pe bază de drojdie îmbogățită în calciu, **caracterizat prin aceea că:** 3
 - se prepară un preinocul dintr-o cultură de întreținere a unei colonii de *Saccharomyces cerevisiae* selectată și adaptată anterior prin cultivarea pe mediu YMS-agar, la temperatura de 28-30°C, timp de 48h; 5
 - se prepară un inocul de laborator din preinocul, care se incubează pe mediu YMS, la temperatura de 30°C, agitare la 150-240 rpm, timp de 15-22 h și apoi se trece pe mediu YPS; 9
 - se însămânțează cu inoculul de laborator un mediu de cultură care conține lactat de calciu, când are loc fermentarea propriu-zisă la pH=4-5, agitare la 300-550 rpm, temperatura de 30°C, timp de 12-20 h; 11
 - se separă biomasa îmbogățită în calciu prin centrifugare la 4000rpm, timp de 10 min, apoi se purifică prin spălări repetate deresturile metalice și se usucă prin liofilizare. 13
2. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, lactatul de calciu se adaugă gradual, sub formă de soluție 9%, câte 300 ml/șarjă, împreună cu soluții de zaharoză. 17
3. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, soluțiile de zaharoză se adaugă în porții mici de 60 g zaharoză în 200ml apă distilată și porții mari de 100 g zaharoză în 300 ml apă distilată. 21
4. Bioingredient direct obținut prin procedeul definit în revendicările 1-3, **caracterizat prin aceea că** prezintă un grad de asimilare a calciului în biomasa de drojdie de 400-6000 mg/100 g. 23

