



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00709**

(22) Data de depozit: **06/10/2016**

(41) Data publicării cererii:
27/04/2018 BOPI nr. **4/2018**

(71) Solicitant:
• **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, BL. FA22, SC. A, ET. 2,
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

(54) **PRODUS PE BAZĂ DE BIOMASĂ DE DROJDII, ÎMBOGĂȚITĂ
ÎN CALCIU ȘI FIER, ȘI PROCEDEU DE OBTINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs îmbogățit în calciu și fier, utilizat ca bioingredient în panificație. Procedeul, conform invenției, constă în prepararea unei culturi de întreținere a drojdiei *Candida* sp. DBVPG37P, prepararea culturii inocul lichid generația 1, prepararea culturii inocul lichid generația 2, însămânțarea mediului de fermentație cu inocul 1 și/sau

2, utilizând ca sursă de calciu-calciu lactat și ca sursă de fier-fier pirofosfat, rezultând un produs pe bază de biomasă de drojdie îmbogățită în calciu și fier, având un conținut de proteină de 40...50 g/100 g biomasă.

Revendicări: 4



PRODUS PE BAZA DE BIOMASA DE DROJDII, IMBOGATITA IN FIER DI CALCIU SI PROCEDEU DE OBTINERE

Inventia se refera la obtinerea unui produs pe baza de biomasa de drojdie nou identificata si cu numar de depozit *Candida sp.* DBVPG37P, imbogatita in calciu si fier, care nu prezinta risc pentru sanatate si care are capacitatea de a regla deficitul de calciu si fier din organismul uman.

In prezent se cunosc procedee de obtinere de drojdie imbogatita in curpu, zinc si mangan care utilizeaza o tulpina de drojdie *Saccharomyces cereviae* (Barbulescu D. si altii RO 125200 B1).

Persoanele cu boala celiaca au deficiente in fier si calciu, comparativ cu populatia generala adulta. Adultii cu boala celiaca au nevoie de o doza de calciu între 1000 miligrame (mg) și 1500 mg în fiecare zi si fier 7-14 mg.

Obtinerea si utilizarea de biomase de drojdii imbogatite in calciu (lactat de calciu) si fier (fier pirofosfat), ingrediente care se regasesc in REGULAMENTUL (CE) NR. 1170/2009 AL COMISIEI din 30 noiembrie 2009) prin intermediul unor procedee biotehnologice, este avantajoasa in scopul eliminarii formelor anorganice si organice de sinteza chimica.

Nu exista studii in stadiul actual al cunoasterii deoarece tulpina a fost noua identificata. Nu exista studii privind obtinerea de biomase drojdii in fier si calciu care utilizeaza tulpina si procedeul care urmeaza sa fie descris.

Este cunoscut faptul ca biomasa de drojdii imbogatita cu calciu conform inventiei A/00600/29/08/16, elimina dezavantajul utilizarii produselor de sinteza, ca spre exemplu: pantotenat de calciu, propionat de calciu, sulfat de calciu, lactat de calciu.

Este cunoscut faptul că folosirea suplimentelor de fier împreuna cu vitamina C ajută corpul uman să absoarbă fierul mult mai eficient.

Pentru suplimentarea orală cu fier, sărurile de fier feroase (sulfat feros și gluconat feros) sunt preferate datorită costului lor scăzut și biodisponibilității ridicate. (Larocque R, Casapia, 2005). Ascorbatul, citratul, aminoacizi, peste, pui sunt cunoscuti ca fiind facilitatori privind creșterea privind absorbția fierului. Baza Globala de date OMS privind anemia este singura sursă de estimări ale anemiei la nivel de țară, regional și la nivel mondial.

În ceea ce privește relația între fier și calciu, studiile au relevat probleme privind

absorbția fierului în prezența unor cantități prea ridicate de calciu.

Drojdiiile au capacitatea de a acumula numeroase microelemente, printre care și fierul și calciul, drojdiiile îmbogățite rezultate putând să fie utilizate în prevenirea anemiei (în cazul fierului) și a altor afecțiuni în care sunt implicate cele 2 microelemente.

Obținerea de biomasa de drojdie îmbogățită în calciu (Barbulescu I.D, Marinescu S.I, Frincul M, 2016) prin drojdiiile adaptate la calciu pot avea o capacitate marită de asimilare a calciului în biomasa.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in obtinerea unui produs pe baza de biomasa de drojdii izolate din biomasa de vin alb, imbogatite in calciu si fier cu ajutorul drojdiei noi izolate *Candida sp.* DBVPG37P.

Solutia tehnica pe care o rezolva inventia consta in obtinerea unui produs pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in fier calciu pentru a fi folosit ca bio-fotificant in produsele derivate de panificatie si suplimente alimentare pentru a ajusta deficienta de fier si calciu din organism, deficienta care poate provoca diferite boli in organism. Biomasa de drojdie îmbogățită cu fier și calciu ar putea reprezenta o soluție nouă și mai sigură pentru prevenirea dezvoltării anemiei.

Produsul conform inventiei, este constituit din biomasa de drojdie imbogatita in fier si calciu, iar procedeul de obtinere al biomasei, conform inventivei, contine urmatoarele faze:

- a) Obținerea preinoculului de laborator
- b) Obținerea inoculului 1 și/2
- c) Fermentatia propriu-zisa a mediului de cultura insamantat cu inoculul 1 și /2 și care utilizeaza drept sursa de calciu pentru bioconversie, calciu lactat și sursa de fier, fier pirofosfat

Prin aplicarea inventiei se obtin urmatoarele avantaje:

Produsul obtinut utilizeaza o tulpina de drojdie izolata din vin alb si identificata ca noua, ca și *Candida sp.*, cu data de deposit ascension form DBVPG37P.

- 1) Produsul obtinut prezinta calciu si fier in biomasa de drojdie
- 2) Produsul pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in fier si calciu poate fi folosita pentru obtinerea de produse derivate de panificatie si pentru suplimente alimentare.
- 3) Produsul pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in fier si calciu poate fi adaugat ca bioingredient in panificatie in pote fi utilizat pentru obtinerea de

suplimente alimentare.

- 4) Produsul pe baza de drojdie imbogatita in fier si calciu utilizeaza tulpina *Candida sp*, cu deposit ascension form DBVPG37P prezinta calciu si fier asimilat in biomasa
- 5) Produsul utilizeaza in timpul fermentatiei utilizeaza lactat de calciu care este folosit ca atare ca si stimulator de crestere al painii in industria de panificatie.
- 6) Produsul utilizeaza in timpul fermentatiei utilizeaza fier pirofosfat, conform legislatie suplimentelor alimentare

Exemplu 1

Se da in continuare un exemplu de obtinere a produsului pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in calciu in fier:

Obținerea de colonii izolate de drojdii s-a realizat prin aplicarea tehnicii diluțiilor succesive;

-diluati zecimale pe plăci petri pe MP agarizat media (malt extract, peptona de soia, agar agar);

Identificarea drojdiei noi – izolate – atasam secventa identificata

Identificarea drojdiei ca, *Candida sp*. prin tehnica secvențierii AND. Domeniile D1/D2 ale ADNr 26S in doua cazuri regiunile a ADNr ITS1 si ITS2, incluzand gena ARNr 5.8S a tulpinii au fost secventiate.

Cultura de intretinere - *Candida sp*, cu deposit ascension form DBVPG37P dupa identificare a fost utilizata pentru obtinerea culturii stoc de intretinere;

Preinoculul (cultura statică) se prepară din cultura de întreținere a unei colonii de *Candida sp*, cu deposit ascension form DBVPG37P selectata anterior prin cultivarea pe mediu YMSP-agar la temperatura de 28-30°C timp de 48 ore.

Mediul YMSP (yeast extract – malt extract) – agar (g/l)

- ❖ extract de drojdie5,0
- ❖ extract de malt20,0
- ❖ zahar.....20
- ❖ zaharoza.....20 g
- ❖ agar – agar25,0
- ❖ apă distilată1000 ml

S-au repartizat 7 ml de mediu steril agarizat pe tub inclinat. S-au obtinut tuburi inclinate agarizate solide.

Au fost insamnatate tuburile inclinate cu cultura de drojdie identificata *Candida*

sp DBVPG37P si s-au dezvoltat pentru 48 de ore la 30°C.

Prepararea inoculului de laborator la shaker 140-240 rpm – generatia1:

Preinoculul este apoi utilizat la prepararea **inoculului lichid 1** astfel: cultura *Candida* sp, cu deposit ascension form DBVPG37P dezvoltata un tub/2tuburi înclinate a fost folosită la obținerea inoculului, care s-a incubat apoi la temperatura de 30°C timp de 15-22 ore cu agitare (170 rpm) (inoculul YSP), pe baza de extract de drojdie, extract de malt si zaharoza.

Mediu inocul 2 generatia 2: Extract de drojdie; Sucroza; saruri de K⁺ si Mg²⁺, apa distilata – Vu 3 l – a fost insamantat cu inocul lichid 1 (300 ml inocul lichid /fermentator).

Durata de cultivare a inoculului a fost de 10 ore. Pe parcursul cultivarii s-au realizat adaosuri sterile de solutii de zaharoza.

Bioproces fermentativ pentru obtinerea de biomasa de drojdie imbogatita in calciu si fier

Intr-un fermentator 4l Vu (Vt = 6l), mediu de cultura ce contine g % (v/v): extract de drojdie 0.3...0.7, zahar initial (100-150 g/3.2 l initial), saruri de Mg²⁺, K⁺

-Solutia de calciu lactat 9 g % - 300 ml a fost adaugata in portii de cate 75 ml pe parcursul procesului in doua portii;

-Solutia de fier pirofosfat 3 g % a fost adaugata in portii a cate 10 ml pe parcursul fermentatiei;

-solutie de zaharoza in portii;

Reglarea pH-ului s-a reglat pana la o anumita ora de cultivare a procesului cu o solutie amoniacala 5 %.

Pe parcursul fermentatiei s-au urmarit parametrii tehnologici:

- ✓ Durata de cultivare: 12-14 h;
- ✓ Temperatura: 30°C;
- ✓ pH pe parcursul cultivarii: 4-5.5;
- ✓ Rata de agitare: 300 rpm-550 rpm.

Separarea mediului fermentat

Cel mai simplu și rapid mod de a efectua separarea biomasei de drojdie de mediul de fermentație este centrifugarea, prin care se realizeaza separarea celulelor de drojdie de mediul de cultură și de metaboliți.

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

Spălarea biomasei

Pentru îndepărtarea mediului de cultură reținut între celulele de drojdie, precum și a sarurilor de Ca și Fe 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.

Liofilizare

- ✓ 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;

Produsul conform învetiei, prezintă următoarele caracteristici:

S-a observat faptul că, adaosul de calciu împreună cu sursa de zahăr, pe parcursul fermentației, duce la captarea calciului și fierului în biomasa de drojdie *candida sp.*

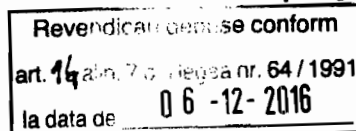
Proba	Proteina g/100	Bacterii Coliforme	Drojdie	Mucegaiuri
Biomasa de drojdie îmbogățită în calciu și fier	40-50	Sub10	0.5×10^5	Sub 10

REVENDICARI

Revendicări depuse conform
art. 14 alin. 7 din legea nr. 64 / 1991
la data de 06 -12- 2016

1. Produs pe baza de biomasa de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in calciu si fier **caracterizat prin aceea ca**, prin continutul mediu de calciu si fier, nu prezinta risc pentru sanatate, deoarece utilizeaza fier pirofosfat in timpul fermentatiei si calciu lactat.
2. Produs pe baza de biomasa de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in calciu si fier **caracterizat prin aceea ca** poate fi folosit pentru obtinerea unor suplimente alimentare care sa echilibreze deficitul de fier din organism.
3. Produs de obtinere a unui produs pe baza de biomasa de drojdie *Candida sp.* DBVPG 37P imbogatita in fier si calciu din culturi de drojdii de *Canadida sp.*, **caracterizat prin aceea ca** este constituit din urmatoarele faze:
 - Prepararea culturii de intretinere a drojdiei *Candida sp.* DBVPG37P;
 - Prepararea culturii inocul lichid 1 nivel de flacoane agitate, pornind de la cultura de drojdie *Candida sp.* DBVPG 37P;
 - Preparare cultura inocul 2 generatia 2: Extract de drojdie; Sucroza; saruri de K^+ si Mg^{2+} , apa distilata – Vu 3 l – a fost insamantat cu inocul lichid 1 (300 ml inocul lichid /fermentator). Durata de cultivare a inoculului a fost de 10 ore. Pe parcursul cultivarii s-au realizat adaosuri sterile de solutii de zaharoza.
 - Prepararea bioprodusului pe baza de biomasa de drojdii *Candida sp.* DBVPG 37P imbogatite in fier si calciu prin insamantarea mediului de fermentatie cu inocul lichid, separarea biomasei, purificarea prin spalari repetate cu apa distilata sterila si uscarea prin liofilizare obtinand un produs uscat activ cu miros placut.
4. Procedeu de obtinere a unui produs de biomasa de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in fier conform revendicarii 3, **caracterizat prin aceea ca**, parcurge urmatoarele etape:
 - Intr-un fermentator 4l Vu ($V_t = 6l$), mediu de cultura ce contine g % (v/v): extract de drojdie 0.3...0.7, zahar initial (100-150 g/3.2 l initial), saruri de Mg^{2+} , K^+ , inoculat cu cultura de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P –inocul 2, cu adaosuri pe parcurs a urmatoarelor solutii:





- Solutia de calciu lactat 9 g % - 300 ml a fost adaugata in portii de cate 75 ml pe parcursul procesului in doua portii;
- Solutia de fier pirofosfat 3 g % a fost adaugata in portii a cate 10 ml pe parcursul fermentatiei;
- solutie de zaharoza adaugata in portii;
- Reglarea pH-ului s-a reglat pana la o anumita ora de cultivare a procesului cu o solutie amoniacala 5 %.

- Separarea mediului fermentat

Cel mai simplu și rapid mod de a efectua separarea biomasei de drojdie de mediul de fermentație este centrifugarea, prin care se realizeaza separarea celulelor de drojdie de mediul de cultură și de metaboliți.

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

- Spălarea biomasei

Pentru îndepărtarea mediului de cultură reținut între celulele de drojdie, precum și a sarurilor de Ca si Fe ramase 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.

- Liofilizare

- ✓ Uscarea drojdiilor s-a efectuat prin procesul de liofilizare;
- ✓ Acesta consta in doua operatii: inghetarea probelor in etape succesive si sublimarea ghetii cu ajutorul vidului inaintat;
- ✓ Drojdiile au fost turnate in cutii Petri;
- ✓ Liofilizarea s-a facut timp de 48 de ore, in mai multe etape;

Se obtine un produs uscat active pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in fier si calciu .

