



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2007 00003**

(22) Data de depozit: **04.01.2007**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.05.2011** BOPI nr. 5/2011

(41) Data publicării cererii:
30.07.2008 BOPI nr. 7/2008

(73) Titular:

• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO-
FARMACEUTICĂ - ICCF, CALEA VITAN
NR.112, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

• **BĂRBULESCU IULIANA DIANA,**
ALEEA ARMONIEI NR.1, BL. FA22, SC.A,
ET.2, AP.5, SLATINA, OT, RO;
• **IONIȚĂ ANA,** STR.BURDUJENI NR.5A,
BL.GC, AP.1, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **CĂMPEANU GHEORGHE,**
ALEEA VALEA CĂLUGĂREASCĂ NR.3,
BL.A10, SC.B, ET.3, AP.27, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **RAITARU GETA,** BD.CAMIL RESSU
NR.66, BL.1, SC.1, ET.5, AP.24, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **POPA OVIDIU,** CALEA GRIVIȚEI NR. 206,
BL.K, SC.D, ET.6, AP. 26, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **MINERVA PANTELI,**
STR.SPĂȚAR NICOLAE MILESCU
NR.46-48, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• **ALBULESCU RADU,**
STR.ROȘIA MONTANĂ NR.6, BL.07, SC.C,
AP.125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ENE ELENA,** ALEEA EROU BUTEICĂ
EMANOIL MARIUS NR.6, BL.72, AP.18,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **VAMANU ADRIAN,**
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.2B,
BL.C17A, SC.B, ET.5, AP.68, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **BALAȘ RODICA,** STR.ARIPILOR NR.3-5,
BL.15C S22, ET.3, AP.27, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **CIUHU IULIAN,** ȘOS.PANTELIMON
NR. 287, BL.10, AP. 44, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **RASIT IUKSEL,** BD.DINICU GOLESCU
NR.37, BL.4, SC.B, AP.40, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **BĂBEANU NARCISA,** STR.VIRTUȚII NR.5,
BL.R2, SC.2, ET.5, AP.50, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**V.G. Zetic și colab., "Chromium uptake by
Saccharomyces cerevisiae and isolation
of glucose tolerance factor from yeast
biomass.", J. Biosci., 26 (2), pp. 217-223,
2001; CN 1482236 A**

(54) PROCEDU DE OBTINERE A BIOPRODUSULUI DE DROJDIE CROMIATĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un model de adaptabilitate a tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* la niveluri variate de concentrații de clorură cromică, în scopul obținerii unui bioprodus de drojdie cromiată. Modelul conform invenției constă în cultivarea submersă a tulpinii *Saccharomyces cerevisiae*, înregistrată în Colecția de Microorganisme a INCDF- ICCF, cu nr. ICCF 349, adaptată în prealabil la concentrații mai mari de 15000 ppm clorură cromică, în mediu de cultură care conține

glucoză, extract de drojdie, clorură cromică și săruri minerale, înșămânțat cu 10...15% (v/v) inocul, la temperatura de 28...30°C, pH 4,5...5,5, timp de 16...19 h, cu agitare, obținându-se, după prelucrarea mediului de cultură prin centrifugare, purificare și uscare, produsul dorit, drojdia cromiată, cu un conținut de crom total de 150...215 ppm.

Revendicări: 1

Examinator: biochimist EREMIA LAURA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 123279 B1

1 Inventția se referă la prezentarea unui procedeu de obținere a unui bioprodus de
drojdie cromiată, având ca efect facilitarea efectului insulinei, prin creșterea sensibilității
3 tisulare periferice precum diabetul zaharat de tip II (noninsulino-dependent), a hipercolestero-
lemiei, obezității și a aterosclerozei.

5 În prezent sunt cunoscute metode de obținere prin biosinteză de suplimente de
drojdie îmbogățită în crom, "*Chromium uptake by Saccharomyces cerevisiae and isolation*
7 *of glucose tolerance factor from yeast biomass*", Zetic V. G. și colab (2001) *J. Biosci.* 26 (2),
217-223, care se referă la fermentația drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* în condiții
9 semiaerobe și statice, cu adăugare de clorură cromică în mediu cu melasă. Adăugarea de
cantități optime de CrCl_3 în mediu a crescut cinetica fermentației alcoolice, stimulând
11 creșterea drojdiei pe de o parte și producerea de alcool, precum și cantitatea de ioni de Cr^{3+}
încorporați în celulele de drojdie. În aceste condiții, acumularea ionilor de Cr^{3+} este realizată
13 în cursul fazei de creștere exponențială, iar cantitatea îmbogățită a ajuns la 30-45 $\mu\text{g/l}$, prin
formarea compușilor în care cromul este legat sub formă de chelat organic prin legături
15 coordinative, denumit factor GTF.

CN 1482236 prezintă un procedeu de preparare a drojdiei îmbogățite cu crom prin
17 dizlocarea acidului nicotinic în apă, adăugare de glicină și acetat de crom, în timp ce se
încălzește și se agită, se reglează valoarea pH-ului până ce lichidul își modifică culoarea de
19 la verde la violet regal și reacția, timp de 1 h, cu menținerea temperaturii și agitării; și
prepararea drojdiei îmbogățite cu crom prin inocularea drojdiei de producere a vinului pentru
21 fermentarea lichidului, adăugând lichide organice cu controlul pH-ului la 4,5-6,0, pentru a
fermenta la 30-34°C, timp de 18-20 h, se separare prin centrifugare, se spală cu apă, se
23 usucă, se zdrobesc, se cern și se verifică. Drojdia îmbogățită cu crom este folosită sub forma
unui agent de completare a conținutului de crom la diferite tipuri de produse alimentare.

25 Dezavantajul suplimentării mediilor de cultivare cu clorură cromică, în timpul fermenta-
ției submerse, constă în obținerea unui randament scăzut de bioconversie a cromului în
27 produsul final, datorită toxicității.

Pentru aceasta, pentru a reduce impactul toxic al cromului asupra celulei de drojdie,
29 unii autori au încercat să realizeze o adaptare la concentrații ridicate de clorură cromică,
urmată de suplimentarea acestuia în timpul cultivării submerse în mediu, menținând un nivel
31 optim, încorporarea fiind la un nivel netoxic celulei. Batic, M., Raspor, P., (1998) "*Uptake and*
bioaccumulation of Cr (III) in yeast Saccharomyces cerevisiae", *Food Technol. Biotechnol.*
33 36: 291-297. În acest document s-a stabilit influența pH-ului mediului asupra absorbției
cromului.

35 Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere
a unui bioprodus de drojdie cromiată adaptată la concentrații de crom de 15.000 ppm.

37 Procedeu de obținere a unui bioprodus din drojdie cromiată, conform invenției,
înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că acesta cuprinde:

39 a) adaptarea unei tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* la concentrații de 15000 ppm
de clorură cromică, prin:

41 - realizarea unei diluții 1:100 dintr-o cultură de *Saccharomyces cerevisiae*, în mediu
cu extract de malt, care se repartizează în tuburi care conțin 500, 1.000, 3.000 și, respectiv,
43 5.000 ppm clorură cromică, se incubează la o temperatură de 28...30°C, timp de 36...48 h,
apoi se determină densitatea optică (D.O.) la $\lambda=590$ nm și cultura care are DO cea mai mare
45 se dispersează pe un mediu cu extract de malt, se incubează 2...7 zile, se selectează
coloniile cele mai dezvoltate, se însămânțează pe un mediu înclinat, se incubează la o
47 temperatură de 28...30°C, timp de 48 h, realizându-se o cultură stoc "de întreținere",
menținută la 4°C;

RO 123279 B1

- celulele astfel obținute sunt puse în contact direct cu o soluție de clorură cromică la o concentrație de 7.500...20.000 ppm, apoi sunt selectate celulele care au o rezistență și o viabilitate crescută, pentru a forma o a doua cultură stoc "de întreținere";	1 3
b) obținerea inoculului, în care celulele dintr-o a doua cultură stoc "de întreținere", obținută în etapa a) se însămânțează în tuburi cu mediu înclinat ce conține zaharoză, extract de drojdie și peptonă, care se incubează la o temperatură de 28...30°C, timp de 48 h, obținându-se un preinocul care se însămânțează în mediu lichid, se incubează la o temperatură de 28...30°C, cu agitare la 200...240 rpm, timp de 13...15 h, când se obține un inocul ce conține 10^8 ... 10^9 celule/ml, greutate celulară umedă >70 g/l, pH 3,7...4,0, culoare bej și miros caracteristic;	5 7 9
c) însămânțarea inoculului obținut în etapa b) în raport de 10...15%, pe un mediu de fermentație ce conține: glucoză 8...12%, extract de drojdie 0,1...0,5 %, clorură cromică 0,1...0,12%, procentele fiind exprimate în volum, adăugată la momentul 0 h și la 13 h și săruri minerale, alese dintre NH^{4+} , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} și Cu^{2+} , și incubarea la o temperatură de 28...30°C, pH 4,5...5,5 cu agitare continuă la 200...240 rpm, timp de 16...19 h;	11 13 15
d) separarea bioprodusului prin centrifugare la 3000 rpm a biomasei obținute în etapa c), spălare o dată cu EDTA 0,1 M și soluție tampon Na_2HPO_4 0,01 M și de patru ori cu apă distilată, pentru a îndepărta reziduurile metalice extracelulare neprocesate, iar crema de drojdie care rezultă se pasteurizează, la o temperatură de 75...80°C, timp de 45...50 min, apoi se usucă sub vid, rezultând bioprodusul de drojdie cromiată sub formă de pulbere de culoare bej-maronie, umiditate 4,94...5,5%, cu următorul conținut în substanță uscată: reziduu sulfat 5,56%, azot total 8,7...9,0%, azot amoniacal 1,83%, proteină brută de 45...48%, crom total 150...215 ppm, crom anorganic ~20 ppm.	17 19 21 23
Prin aplicarea procedurii conform invenției, se obțin următoarele avantaje:	
- utilizând adaptarea în trepte a microorganismului, celulele devin mult mai ușor accesibile clorurii cromice și determină implicit o viabilitate crescută ($4,3 \times 10^3$... $1,5 \times 10^5$ celule/ml);	25 27
- un randament de bioconversie ridicat al cromului anorganic, utilizând cultura selectată la al doilea nivel de adaptare și prin aceasta o eficacitate ridicată a procesului;	29
- obținerea unui bioprodus lipsit de toxicitate, evaluat prin teste farmacologice de toxicitate acută, efectuate pe șoareci Swiss și șobolani Wistar;	31
- procedeul tehnologic este mult mai eficient datorită unei accesibilități și a unei încorporării ridicate a cromului.	33
Modelul de viabilitate constă în elaborarea a două niveluri de adaptare a microorganismului, nivel direct ce constă în contactul soluției de crom cu celulele parentale de drojdie, fiind accesibile până la un nivel de 5000 ppm. Acestea devin inactive din punct de vedere biologic la un nivel de concentrație de peste 7500 ppm clorură cromică, necesitând un al doilea nivel de adaptare, în trepte. De aceea, procedeul utilizează cultura de drojdie selectată anterior de la primul nivel de 5000 ppm, și o adaptează treptat, prin selecție, ajungându-se la o concentrație de clorură cromică > 15.000 ppm, realizând selecția celor mai robuste colonii, formarea culturii stoc „de întreținere” și încorporarea cromului în timpul procesului biotehnologic.	35 37 39 41
Procedeul conform invenției constă în aceea că se obține o diluție 1:100 dintr-o cultură de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ICCF 349 în mediu cu extract de malt, se repartizează câte 10 ml suspensie/tub ce conține 500/1000/3000/5000 ppm clorură cromică (10 tuburi pentru fiecare concentrație), se incubează la temperatura 28...30°C, timp de 36...48 h, se determină apoi, densitatea optică (D.O) la spectrofotometru în $\lambda = 590$ nm pentru fiecare concentrație în parte, iar cultura cu D.O. cea mai mare se dispersează în plăci Petri pe mediu	43 45 47

RO 123279 B1

1 cu extract de malt, se incubează 2...7 zile, după care se selectează coloniile cele mai
de dezvoltate și se însămânțează pe mediu înclinat, se incubează apoi la temperatura de
3 28...30°C, timp de 48 h, realizându-se cultura stoc "de întreținere" (+4°C), pentru primul nivel
de adaptare, devenind practic inactive la 7500 ppm, necesitând un al doilea nivel de
5 adaptare, în trepte.

Celulele adaptate inițial la concentrația maximă 5000 ppm din primul nivel sunt puse
7 în contact direct cu o soluție de clorură cromică la o concentrație mai mare, pornind cu 7500
ppm, ajungând la concentrații de peste 15.000 ppm, celulele devenind accesibile acestei
9 concentrații, având o rezistență și o viabilitate crescută ($4,3 \times 10^3 \dots 1,5 \times 10^5$ cel/ml), apoi sunt
selectate pentru a forma cultura stoc "de întreținere", din care se prepară materialul biologic
11 de însămânțare (preinocul și inocul).

Preinoculul (cultură statică) conform invenției se obține dintr-o cultură de întreținere
13 care se însămânțează în tuburi cu mediu înclinat ce conține zaharoză, extract de drojdie și
peptonă și se incubează la temperatura de 28...30°C, timp de 48 h.

15 Cultura pură de preinocul dezvoltată în plajă se utilizează la prepararea inoculului
lichid.

17 Cultura preinocul (1...2 tuburi) se folosește la însămânțarea a 100 ml mediu lichid,
care se incubează la temperatura de 28...30°C, timp de 13...15 h; cu agitare (200...240 rpm),
19 obținându-se inoculul ($10^8 \dots 10^9$ cel/ml).

Cultura inocul pură, bine dezvoltată (greutate celulară umedă >70 g/l), pH 3,7...4,0,
21 culoare bej și miros caracteristic se folosește la însămânțarea mediului de fermentație.

În continuare, se prezintă un exemplu de realizare a procedurii de obținere a
23 bioprodusului din drojdie cromiată.

Exemplu. *Cultivarea tulpinii Saccharomyces cerevisiae ICCF 349 în sistem submers,*
25 *adaptată la concentrații mai mari de 15.000 ppm ($4,3 \times 10^3 \dots 1,5 \times 10^5$ cel/ml).*

Cultivarea în 100 ml mediu de fermentație ce conține următoarele ingrediente:
27 glucoză 8...12% (s.r); extract de drojdie 01...0,5; săruri minerale (NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} și
 Cu^{2+}) în diferite proporții, adaos de 0,1...0,12 $\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, agitare continuă 200...240 rpm,
29 timp de 16...19 h, pH 4,5...5,0; însămânțat cu o cultură inocul 10...12%, culoare bej, miros
caracteristic, biomasă umedă 7,0 g % (v/v), ce este preparat dintr-o cultură preinocul (1...2
31 tuburi) dezvoltate pe mediu solid (10 ml) ce conține zaharoză, extract de drojdie și peptonă,
cu care se însămânțează 100 ml mediu de inocul, se incubează la temperatura de 28...30°C,
33 cu agitare (200...240 rpm), timp de 13...15 h și se incubează peste noapte la temperatura
28...30°C, cu agitare (200...240 rpm).

35 Cultivarea submersă s-a realizat la parametri monitorizați on-line: agitarea
(200...240 rpm), temperatura (28...30°C), și off-line: determinarea conținutului de zahăr
37 reducător, determinarea greutății umede, determinarea pH-ului și a cromului total.

La sfârșitul procesului se efectuează prelucrarea mediului de fermentație conform
39 următoarelor faze:

1. Separarea mediului de cultură fermentat, rezultat în urma procesului prin centri-
41 fugare, utilizând o centrifugă Janetski-K70, la 3000 rpm, timp de 20 min.

2. Spălarea biomasei o dată cu 100 ml soluție EDTA 0,1 M, pH 7,8; o dată cu 100 ml
43 soluție de Na_2HPO_4 0,01 M și de patru ori cu 100 ml apă distilată, pentru îndepărtarea
reziduurilor metalice extracelulare neprocesate, rezultând după centrifugare (la 3000 rpm
45 timp de 20 min) crema de drojdie cu un conținut redus de umiditate.

Pasteurizarea biomasei la temperatura de 75...80°C, timp de 45...50 min.

47 Uscarea biomasei în vacuum (până la umiditate de aproximativ 5%), rezultând
bioprodusul de drojdie cromiată cu un conținut de crom cuprins între 145 și 215 ppm (crom
49 anorganic ~20 ppm), datorită unui grad ridicat de adaptabilitate la clorură cromică
(10.000...20.000 ppm), evaluat prin teste farmacologice, nu prezintă toxicitate la adminis-
51 trarea orală a unor doze de 7000 mg/kgc la șoareci Swiss și 5000 mg/kgc la șobolani Wistar,

RO 123279 B1

ce pot fi considerate doze maxime administrabile, în condițiile experimentului. Doza de 5000 mg/kgc la șobolan reprezintă limita inferioară a spectrului de doze letale 50% pentru substanțele considerate practic netoxice, conform clasificărilor în vigoare (Scala claselor de toxicitate Hodge si Sterner).	1 3
Bioprodusul de drojdie cromiată s-a dovedit a fi lipsit de toxicitate prin testele farmacologice elaborate și prezintă avantajul că poate fi utilizat pentru testarea cromului asupra rezistenței celulare la insulină.	5 7
Biopreparatul „drojdie cromiată”, obținut conform invenției, prezintă următoarele caracteristici:	9
- aspect: pulbere;	
- culoare: bej-maronie;	11
- miros: caracteristic (nu ranced);	
- umiditate (pierdere prin uscare): 4,94-5,5%;	13
- reziduu sulfatat: 5,56%;	
- azot total, (s.u.): 8,7-9,0%;	15
- azot amoniacal, (s.u.): 1,83%;	
- proteină brută, (s.u.): 45- 48%;	17
- conținut în crom total: 150-215 ppm;	
- conținut în crom anorganic: < 50 ppm.	19
Produsul obținut prin procedeul conform invenției poate fi utilizat ca atare sub formă de bioprodus, ce are rolul de a facilita efectului insulinei, prin creșterea sensibilității tisulare periferice la acțiunea acesteia în boli precum diabetul zaharat de tip II (noninsulino-dependent).	21 23
Poate fi asociat cu:	
- vanadiu, manifestând un efect sinergic în tratarea diabetul zaharat de tip II;	25
- miere, <i>Cinnaminum verum</i> fiind indicat în curele de slăbire, ce manifestă efect curativ;	27
- vitamina C, duce la creșterea absorbției cromului în organism;	
- biopreparat de drojdie seleniată, rol antioxidant, previne formarea radicalilor liberi provocați de excesul de minerale.	29
Drojdia cromiată poate fi utilizată în zootehnie, ca aditiv furajer sub formă de bioprodus, pentru animale de fermă, porcine, cabaline, caprine, datorită efectului său bioprodusiv.	31 33
Metoda de adaptare poate fi aplicată și pentru obținerea de bioproduse de drojdie îmbogățită în zinc, cupru, mangan.	35

RO 123279 B1

Revendicare

1

3 Procedeu de obținere a unui bioproduct de drojdie cromiată, **caracterizat prin aceea**
că acesta cuprinde:

5 a) adaptarea unei tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* la concentrații de 15000 ppm
de clorură cromică, prin:

7 - realizarea unei diluții 1:100 dintr-o cultură de *Saccharomyces cerevisiae*, în mediu
cu extract de malț, care se repartizează în tuburi care conțin 500, 1.000, 3.000 și, respectiv,
9 5.000 ppm clorură cromică, se incubează la o temperatură de 28...30°C, timp de 36...48 h,
apoi se determină densitatea optică (D.O.) la $\lambda=590$ nm și cultura care are DO cea mai mare
11 se dispersează pe un mediu cu extract de malț, se incubează 2...7 zile, se selectează
coloniile cele mai dezvoltate, se însămânțează pe un mediu înclinat, se incubează, la o
13 temperatură de 28...30°C, timp de 48 h, realizându-se o cultură stoc "de întreținere",
menținută la 4°C;

15 - celulele astfel obținute sunt puse în contact direct cu o soluție de clorură cromică
la o concentrație de 7.500...20.000 ppm, apoi sunt selectate celulele care au o rezistență și
17 o viabilitate crescută, pentru a forma o a doua cultură stoc "de întreținere";

19 b) obținerea inoculului, în care celulele dintr-o a doua cultură stoc "de întreținere",
obținută în etapa a), se însămânțează în tuburi cu mediu înclinat ce conține zaharoză, extract
de drojdie și peptonă, care se incubează la o temperatură de 28...30°C, timp de 48 h,
21 obținându-se un preinocul care se însămânțează în mediu lichid, se incubează la o
temperatură de 28...30°C, cu agitare la 200...240 rpm, timp de 13...15 h, când se obține un
23 inocul ce conține 10^8 ... 10^9 celule/ml, greutate celulară umedă >70 g/l, pH 3,7...4,0, culoare
bej și miros caracteristic;

25 c) însămânțarea inoculului obținut în etapa b), în raport de 10...15%, pe un mediu de
fermentație ce conține: glucoză 8...12%, extract de drojdie 0,1...0,5 %, clorură cromică
27 0,1...0,12 %, procentele fiind exprimate în volum, adăugată la momentul 0 h și la 13 h și
săruri minerale, alese dintre NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} și Cu^{2+} , și incubarea la o temperatură de
29 28...30°C, pH 4,5...5,5, cu agitare continuă la 200...240 rpm, timp de 16...19 h;

31 d) separarea bioproductului prin centrifugare la 3000 rpm a biomasei obținute în etapa
c), spălare o dată cu EDTA 0,1 M și soluție tampon Na_2HPO_4 0,01 M și de patru ori cu apă
33 distilată, pentru a îndepărta reziduurile metalice extracelulare neprocesate, iar crema de
drojdie care rezultă se pasteurizează, la o temperatură de 75...80°C, timp de 45...50 min,
35 apoi se usucă sub vid, rezultând bioproductul de drojdie cromiată sub formă de pulbere de
culoare bej-maronie, umiditate 4,94...5,5%, cu următorul conținut în substanță uscată:
37 reziduu sulfat 5,56%, azot total 8,7...9,0%, azot amoniacal 1,83%, proteină brută de
45...48%, crom total 150...215 ppm, crom anorganic ~20 ppm.

