



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00353**

(22) Data de depozit: **13.05.2008**

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

(41) Data publicării cererii:
30.12.2009 BOPI nr. **12/2009**

(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;
• **POPA OVIDIU,** CALEA GRIVIȚEI NR. 206,
BL. K, SC. D, ET.6, AP. 26, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **NIȚĂ SULTANA,** STR.BĂRBAT VOIEVOD
NR.21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BĂBEANU NARCISA,** STR.VIRTUȚII NR.5,
BL.R2, SC.2, ET.5, AP.50, 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;

• **RASHIT IUKSEL,** BD.DINICU GOLESCU
NR.37, BL.4, AP.40, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **RUGHINIS DOMNICA,** ALEEA LEORDA
NR.3, BL.MP1A, SC.D, AP.34, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **MINERVA PANTELI,**
STR.SPĂȚAR NICOLAE MILESCU
NR.46-48, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MARIN CONSTANTIN,** ȘOS.BERCENI
NR.3, BL.2, SC.1, ET.6, AP.42, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **CĂRBUREAN MARIANA,**
STR.BURDUJENI NR.5A, BL.GC, ET.2,
AP.11, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ENE ELENA,**
ALEEA EROU BUTEICĂ EMANOIL MARIUS
NR.6, BL.72, AP.18, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CN 1557941 (A); CN 101045907 (A)

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI BIOPRODUS PE BAZĂ
DE SELENIU ȘI CRÔM**



RO 125079 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de obținere a unui bioprodus pe bază de seleniu și crom, care prezintă efect sinergic în normalizarea acțiunii insulinice.

3 Este cunoscut din CN 1557941 un procedeu de preparare a drojdiei de bere îmbogățită în crom, care include cultivarea în două etape a monocoloniei însământate
5 selectate de drojdie de bere, fermentarea într-un fermentator la pH 5,6...6,0 și 27...29°C, timp de 9...11 h, reglarea pH-ului la 5,5...5,6, adăugarea Cr trivalent 0,10...0,15 g/l și adăugarea
7 mustului de malț în cantitate de 30...50%, în volum, de lichid inițial de fermentare, fermentarea până la un timp de fermentare total de 40...50 h, colectarea prin centrifugare
9 Thallus, spălarea cu apă super-pură, uscarea prin pulverizare pentru a obține pulbere uscată de drojdie de bere cu un conținut de crom bioactiv de 222...318 μg/g.

11 CN 101045907 se referă la un tip de *Saccharomyces cerevisiae* îmbogățit cu seleniu și crom, și procesul lor de producție. Produsul *Saccharomyces cerevisiae* îmbogățit în
13 seleniu și crom conține seleniu 100...4000 mg și crom 100...4000 mg pe fiecare kilogram. *Saccharomyces cerevisiae* îmbogățit pe seleniu și crom poate fi utilizată ca supliment de
15 seleniu și crom, adăugat în diverse produse alimentare sau preparate gata de preparare.

Este cunoscut, de asemenea, produsul Diabichrome pe bază de drojdie îmbogățită
17 în crom și drojdie îmbogățită în seleniu, produs realizat de Alltech USA) (<http://www.venkys.com/archive/nutrition/nhpDiabichrome.html>).

19 Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținere a unui bioprodus din drojdie pe bază de crom și seleniu, având efect în normalizarea acțiunii insulinei.

21 Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se
23 cultivă $1,7 \times 10^4$ - $2,9 \times 10^4$ UFC/ml dintr-o cultură de *Sacharomyces cerevisiae*, rezistente la o soluție de selenit de sodiu 14% și la o soluție de clorură cromică 12% pentru a obține o
25 cultură stoc de întreținere cu un conținut de $0,7 \times 10^9$... $0,9 \times 10^9$ UFC/ml, care se folosește pentru obținerea inoculului prin cultivare timp de 17...18 h, inoculul astfel obținut este
27 însământat în procent de 15% în volum, pe un mediu de fermentație care conține zaharoză ca sursă de carbon, vitamine alese dintre biotină, tiamină, piridoxină și pantotenat de calciu,
29 400...1000 ppm soluție de clorură cromică 10%, minerale precum Zn^{2+} , Fe^{3+} , la 28°C...32°C, la care se adaugă 200...700 ppm selenit de sodiu 14% la 14...16 h de la cultivare, pH
31 4,5...6,5, timp de 20...24 h, cu agitare 240 rpm, rezultând mediul fermentat care se separă prin centrifugare la 3000 rpm, biomasa obținută se spală o dată cu o soluție EDTA 0,1 M, o
33 dată cu o soluție tampon de fosfat acid de sodiu 0,1M și de trei ori cu apă distilată, pentru îndepărtarea reziduurilor metalice extracelulare neprocesate, apoi se pasteurizează la
35 temperatura de 75...80°C, timp de 45...50 min, se usucă cu alcool etilic 70% 2...3 h la 4°C, se filtrează la vid și apoi se resuspendă în alcool de 90%, se usucă la vid, obținându-se
37 bioprodusul pe bază de biomasă de *Sacharomyces cerevisiae* îmbogățită în crom total 100...400 ppm, respectiv în seleniu 500...2500 ppm.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

39 - se obține unui singur bioprodus care să conțină ambele minerale în compoziția biomasei și nu un produs care să conțină un amestec de biomasă îmbogățită în seleniu cu
41 biomasă îmbogățită în crom;

43 - seleniul are proprietatea de a contracara formarea radicalilor liberi și care permite asimilarea în concentrații mari a cromului care ar putea fi toxic în absența acestuia pentru
45 cultura de drojdie. Pentru a păstra concentrația de minerale sub nivelul toxic, a fost stabilit totodată adaosul seleniului treptat, în același timp cu adaosul de zaharoză (soluție 40%);

47 - se utilizează colonii de *Sacharomyces cerevisiae* rezistente la crom și seleniu anorganic, care au proprietatea de a crește gradul de bioconversie în timpul fermentației submerse, determinând o eficientizare crescută a procesului;

RO 125079 B1

- selectarea coloniilor rezistente la crom și seleniu a creat posibilitatea încorporării unui conținut ridicat de crom și seleniu care nu este toxic celulelor de drojdie, datorită unei viabilități ridicate ($1,7 \times 10^4 \dots 2,9 \times 10^4$ UFC/ml);

- obținerea unei concentrații ridicate în biomasă ($>6,0$ g%) și a unei încorporări ridicate de crom și seleniu.

Procedeul conform invenției constă în cultivarea submersă a celulelor selectate de *Sacharomyces cerevisiae* rezistente la concentrații ridicate de crom și seleniu care formează cultura stoc de întreținere sau inoculul de laborator, care a constituit material de însămânțare în procent de 15% (v/v) al mediului de cultură pe bază de zaharoză, vitamine (alese dintre biotină, tiamină, piridoxină și pantotenat de calciu), selenit de sodiu, în concentrații mici, împreună cu sursa de carbon la 14...16 h de la cultivare, clorură cromică, minerale precum Zn^{2+} , Fe^{3+} , la $28^\circ C \dots 32^\circ C$, pH 4,5...6,5, corectat pe parcursul cultivării, timp de 20...24 h, cu agitare 150...240 rpm, care a fost supus prelucrării mediului fermentat prin centrifugare 3000 rpm, purificare prin spălare cu EDTA 0,1 M, soluție tampon Na_2HPO_4 0,01M și de trei ori cu 100 ml apă distilată, pentru îndepărtarea reziduurilor metalice extracelulare neprocesate, rezultând crema de drojdie care se incubează prin pasteurizare la temperatura de $75 \dots 80^\circ C$, timp de 45...50 min, apoi se usucă cu alcool etilic 70%, 2...3 h, la $4^\circ C$, filtrare la vid și apoi resuspendate în alcool de 90%, uscare la vacuum, bioprodusul pe bază de biomasă de *Sacharomyces cerevisiae* îmbogățită în crom total 100-400 ppm, respectiv seleniu 500-2500 ppm.

Selectarea coloniilor rezistente la crom și seleniu a creat posibilitatea încorporării unui conținut ridicat de crom și seleniu, care nu este toxic celulelor de drojdie în concentrația aleasă, datorită prezenței unei viabilități ridicate ($1,7 \times 10^4 \dots 2,9 \times 10^4$ UFC/ml) în urma tratamentului cu aceste minerale.

Procedeul de selectare a coloniilor care prezintă proprietatea de a rezista la concentrații ridicate de crom și seleniu conform invenției constă în aceea că se formează cultura "stoc" de întreținere ($+4^\circ C$) din care se prepară materialul biologic de însămânțare, preinoculul, care se incubează la temperatura de $28^\circ C$, timp de 48 h, pe mediu înclinat agarizat pe bază de zaharoză, extract de malț, peptonă și inoculul lichid.

Preinoculul se folosește la însămânțarea a 100 ml mediu lichid, care se incubează la temperatura de $28^\circ C$, timp de 17...18 h, cu agitare 240 rpm, obținându-se inoculul ($0,7 \times 10^9 \dots 0,9 \times 10^9$ cel/ml).

Inoculul, cultura pură, bine dezvoltată (greutate celulară umedă >100 g/l), pH 4,0, culoare bej deschis și miros caracteristic se folosește la însămânțarea mediului de fermentație.

Se prezintă, în continuare, un exemplu de realizare a procedurii conform invenției.

Exemplu. Se selectează culturile de *Saccharomyces cerevisiae* în care s-au încorporat concentrații ridicate la crom și seleniu cu o viabilitate de $1,7 \times 10^4 \dots 2,9 \times 10^4$ UFC/ml, se cultivă pe 10 ml mediu solid care conține zaharoză, extract de drojdie și peptonă, timp de 17...18 h, pentru obținerea unei culturi stoc de întreținere, preinoculul, cu un conținut de $0,7 \times 10^9 \dots 0,9 \times 10^9$ cel/ml. Această cultură este folosită pentru obținerea culturii de inocul de 17...18 h, care este apoi însămânțată pe 100 ml de mediu de fermentație ce conține 7...9% zaharoză, 0,4...0,5, extract de drojdie săruri minerale (Fe^{3+} , Zn^{2+} și Cu^{2+}) în diferite proporții, soluție de $CrCl_3 \times 6 H_2O$ 10%, 700...1000 ppm, cu agitare continuă 240 rpm, timp de 20...24 h, pH 4,5...6,5. La sfârșitul procesului, mediul fermentat a fost supus prelucrării, într-o primă etapă fiind separat prin centrifugare la 3000 rpm. În a doua etapă urmează

RO 125079 B1

1 spălarea biomasei cu 100 ml de soluție EDTA 0,1 M, 100 ml de soluție de Na₂HPO₄, 0,01 M
și de trei ori cu 100 ml apă distilată pentru îndepărtarea reziduurilor metalice extracelulare
3 neprocesate, rezultând după centrifugare biomasa cu un conținut redus de umiditate. A
urmat pasteurizarea biomasei la temperatura de 75...80°C, timp de 45...50 min, pentru
5 inactivare celulară.

În final, biomasa a fost supusă uscării cu alcool etilic 70%, 2...3 h, la 4°C, filtrare la
7 vid și apoi resuspendare în alcool de 90%, usucare la *vacuum*, obținându-se în final
bioprodusul pe bază de biomasă de *Sacharomyces cerevisiae* îmbogățită în crom și seleniu.

9 Bioprodusul pe bază de seleniu și crom obținut conform invenției prezintă
următoarele caracteristici:

- 11 - aspect: pulbere;
- culoare: maronie;
- 13 - miros: caracteristic;
- umiditate (pierdere prin uscare): 5,5...6,0%;
- 15 - conținut în azot total (s.u): 7,5...8,0%;
- conținut în proteină (s.u): 40...50%;
- 17 - conținut în seleniu total: 500...2500 ppm;
- conținut în crom total: 150...400 ppm.

Procedeu de obținere a unui bioprodus din drojdie pe bază de crom și seleniu, carac-	3
terizat prin aceea că se cultivă $1,7 \times 10^4$ - $2,9 \times 10^4$ UFC/ml dintr-o cultură de <i>Sacharomyces</i>	5
<i>cerevisiae</i> rezistentă la o soluție de selenit de sodiu 14% și la o soluție de clorură cromică	7
12%, pentru a obține o cultură stoc de întreținere cu un conținut de $0,7 \times 10^9$... $0,9 \times 10^9$	9
UFC/ml, care se folosește pentru obținerea inoculului prin cultivare timp de 17...18 h, inoculul	11
astfel obținut este apoi însămânțat în procent de 15% în volum, pe un mediu de fermentație	13
care conține zaharoză ca sursă de carbon, vitamine alese dintre biotină, tiamină, piridoxină	15
și pantotenat de calciu, 400...1000 ppm soluție de clorură cromică 10%, minerale precum	17
Zn^{2+} , Fe^{3+} , la 28...32°C, la care se adaugă 200...700 ppm selenit de sodiu 14% la 14...16 h	19
de la cultivare, pH 4,5...6,5, timp de 20...24 h, cu agitare 240 rpm, rezultând mediul fermentat	
care se separă prin centrifugare la 3000 rpm, biomasa obținută se spală o dată cu o soluție	
EDTA 0,1 M, o dată cu o soluție tampon de fosfat acid de sodiu 0,1 M și de trei ori cu apă	
distilată, pentru îndepărtarea reziduurilor metalice extracelulare neprocesate, apoi se	
pasteurizează la temperatura de 75...80°C, timp de 45...50 min, se usucă cu alcool etilic	
70%, timp de 2...3 h, la 4°C, se filtrează la vid și apoi se resuspendă în alcool de 90%, se	
usucă la vid, obținându-se bioprodusul pe bază de biomasă de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	
îmbogățită în crom total 100...400 ppm, respectiv în seleniu 500...2500 ppm.	

