



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00419**

(22) Data de depozit: **03.06.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.04.2011** BOPI nr. **4/2011**

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

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE-ICECHIM,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **ANTON LILIANA, BD. RÂMNICU SĂRAT  
NR. 29, BL. 11A1, SC.B, ET.6, AP. 72,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **DOBRE ELENA, STR. BODEȘTI NR. 9,  
BL. 29A, SC. A, ET. 6, AP. 25, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **VELEA SANDA, STR. ZAMBILELOR  
NR. 6, BL. 60, ET. 2, AP. 5, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **ROVINARU CAMELIA,  
CALEA FERENTARI NR.3, BL.75, ET.7,  
AP.29, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL. D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **ȘTEFAN LILIANA AURORA,  
B-DUL ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**WO 2007/03057; US 2002/0015988**

(54) **COMPOZIȚII PENTRU CONDIȚIONAREA DROJDIILOR  
ANTAGONISTE FAȚĂ DE CIUPERCILE PRODUCĂTOARE DE  
MICOTOXINE**



# RO 125097 B1

1 Inventția se referă la compoziții de condiționare sub formă de microemulsii și geluri  
ale drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* - tulpina L30 - izolată de pe boabe de struguri, anta-  
3 gonistă față de ciupercile producătoare de micotoxine. Compoziții utilizate pentru tratamentul  
seminței și al solului în culturile de porumb, în scopul reducerii riscurilor de contaminare cu  
5 aflatoxine.

Aflatoxinele sunt cele mai cunoscute toxice micotoxine. Controlul pe cale biologică  
7 folosind microorganisme, în speță drojdiile antagoniste, pentru reducerea riscului de conta-  
minare, este o abordare promițătoare și prietenoasă pentru mediu.

9 **WO 2007/030557 A2** se referă la o formulare de fungi din genul *Trichoderma* și  
bacterii din genul *Bradyrhizobium*, condiționate sub formă de microcapsule care cuprind o  
11 substanță care absoarbe apă, insolubile în apă, într-o cantitate de cel puțin 90% din  
cantitatea totală a formulării și microorganismele fiind într-o cantitate de  $5 \times 10^8$  unități de  
13 formare a coloniei pe gram de formulare.

**US 2002/0015988 A1** se referă la o formulare sub formă de granule, constituită dintr-  
15 un substrat de particule fine, insolubile în apă și un strat polimeric care conține  
microorganisme alese dintre *Rhizobium* spp., *Metharizinium*, *Fusarium*, *Trichoderma*,  
17 *Streptomyces*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Verticillium* order *Colletotrichum*,  
*Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Exsorohilium* spp., *Bacillus* spp., *Agrobacter* spp.,  
19 *Enterobacter* spp. și *Pseudomonas aurantiaca*, ATTC Nr. 55169.

Se cunosc diferite forme de condiționare a microorganismelor. De exemplu, *Bacillus*  
21 *turingiensis* poate fi condiționat sub formă solidă ca pulberi umectabile, granule sau prafuri,  
sau în formă lichidă ca spume, geluri, suspensii, concentrate emulsionabile (**US 4996155**).

23 Alte microorganisme, precum *Rhizobium* spp., *Metharizium*, *Fusarium*, *Trichoderma*,  
*Streptomyces*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Verticillium* oder *Colletotrichum*,  
25 *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Exserohilum* spp., *Bacillus* spp., *Agrobacter* spp.,  
*Enterobacter* spp. și *Pseudomonas aurantiaca* au fost condiționate sub formă de granule  
27 (**US 2002/0015988 A1**, **WO 96/02638**).

Fungi din genul *Trichoderma* și bacterii din genul *Bradyrhizobium* au fost condiționate  
29 sub formă de microcapsule (**WO 2007/030557 A2**).

Spori de tulpini atoxigene ale ciupercilor *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*,  
31 *Aspergillus oryzae* și *Aspergillus sojae* au fost formulați ca suspensii uleioase, utilizate în  
tratamentul semințelor ca agenți de biocontrol, pentru prevenirea contaminării cu toxine a  
33 produselor agricole (porumb, bumbac, arahide, **US 6306386**).

Toate aceste formulări folosesc ca ingredient activ biomasa uscată de micro-  
35 organisme, ceea ce implică costuri suplimentare de procesare a respectivelor culturi.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este realizarea unor biopreparate sub  
37 formă de microemulsii și geluri, în care drojdia antagonistă își păstrează viabilitatea și  
caracteristicile biologice.

39 Compoziția de condiționare sub formă de microemulsie a drojdiei *Saccharomyces*  
*cerevisiae*, tulpina L30, având numărul de acces NCAIN (P) Y 001350 (National Collection  
41 of Agricultural and Industrial Microorganisms), izolată de pe boabe de struguri, antagonistă  
față de ciupercile producătoare de micotoxine, conform invenției, înlătură dezavantajele de  
43 mai sus, prin aceea că este constituită din 1...20% biomasă de drojdie sub formă de  
suspensie concentrată, cu concentrație în spori de  $10^6$ ... $10^{11}$  celule/ml, rezultată din cultura  
45 ei pe orice mediu lichid sau semisolid, 2...15% nutrienți, 5...15% amestec de surfactanți  
anionici și neionici, 0,1...0,5% agent de îngroșare, 10...50% solvent ecologic, 0,01...1%  
47 stabilizator, 1...10% anticongelant, 15...50% apă distilată până la 100% greutate/volum.

# RO 125097 B1

Compoziția de condiționare sub formă de gel, a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*, tulpina L30, izolată de pe boabe de struguri, antagonistă față de ciupercile producătoare de micotoxine, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că este constituită din 1...20% biomasă de drojdie sub formă de suspensie concentrată, rezultată din cultura ei pe mediu GPYA, cu o concentrație în spori de  $10^6$ ... $10^{11}$  celule/ml, 5...15% nutrienți, 55...85% agent de gelifiere, 0,1...0,7% agent de îngroșare, 1...10% agent de dispersie, 0,1...5% antispumant, 0,01...1% stabilizator, 1...10% apă distilată, procente în greutate. 1  
3  
5  
7

Prin aplicarea invenției, se obține avantajul obținerii unei drojdie care își păstrează activitatea antagonistă. 9

Compoziția sub formă de microemulsie este constituită din:

a) 1...20% biomasă de drojdie, suspensie concentrată cu concentrație în spori de  $10^6$ - $10^{11}$  celule/ml; 11

b) 2...15% nutrienți selectați dintre sucroză, amidon și glicerină, recomandat 4...10%; 13

c) 5...15% amestec de surfactanți anionici, selectați dintre fosfați de tristirilfenol etoxilați, alchilbenzen sulfonați de sodiu, alchilbenzensulfonați de calciu și neionici selectați dintre nonilfenoli etoxilați, ulei de ricin polietoxilat, alcooli  $C_{12-14}$  etoxilați, oleil poliglicoleter, Tween 20, Tween 80, în raport 1:9...9:1, recomandat 3,5:1... 4,5:1; 15  
17

d) 0,1...0,5% îngroșant selectat dintre carboximetilceluloză, carboximetilceluloză sare de sodiu, gumă xantanică, alcoolpolivinilic, recomandat 0,2...0,3%; 19

e) 10...50% solvenți ecologici, selectați dintre esteri metilici sau etilici ai acizilor grași obținuți din uleiuri vegetale sau grăsimi animale, recomandat 25...40%; 21

f) 0,01...1% stabilizatori, selectați dintre benzoat de sodiu, cicloat de sodiu, recomandat 0,1...0,3%; 23

g) 1...10% anticongelanți selectați dintre mon-, di- și polietilenglicol, mono-, di- și polipropilenglicol și glicerină, recomandat 2...5%; 25

h) 15...50% apă distilată, până la 100%. 27

Drojdia a fost cultivată la o temperatură de 30°C, timp de trei zile pe mediul GPYA, format din: 20 g glucoză, 10 g peptonă, 5 g extract de drojdie și 20 g agar. Compozițiile de mai jos pot fi însă realizate cu biomasă de drojdie antagonistă, obținută prin cultivare pe orice alt mediu de cultură, lichid sau semisolid, din care biomasa poate fi separată prin tehnicile uzuale de decantare, centrifugare sau filtrare. 29  
31

Compozițiile sub formă de microemulsii se obțin în trei etape: i. prepararea fazei organice prin dizolvarea surfactanților în solvent; ii. prepararea fazei apoase prin dizolvarea substanțelor solide (nutrient, stabilizator) în apă distilată și omogenizarea soluției obținute cu suspensia concentrată de drojdie, anticongelantul și îngroșantul (sub formă de soluție apoasă 2...7%); iii. prepararea microemulsiei prin picurarea sub agitare a fazei organice peste faza apoasă. 33  
35  
37

Compoziția sub formă de gel este constituită din:

a) 1...20% biomasă de drojdie, suspensie concentrată cu concentrația în spori de  $10^6$ ... $10^{11}$  celule/ml; 39

b) 5...15% nutrienți selectați dintre sucroză și glicerină, recomandat 8...12%; 41

c) 55...85% agent de gelifiere, selectat dintre amidon pregelificat de porumb, de grâu, de cartof, recomandat 60...75%; 43

d) 0,1...0,7% agent de îngroșare, selectat dintre carboximetilceluloză, carboximetilceluloză sare de sodiu, gumă xantanică și alcool polivinilic, recomandat 0,25...0,45%; 45

e) 1...10% agent de dispersie, selectat dintre lignosulfonat de sodiu, lignosulfonat de amoniu, sarea de sodiu a acidului dinaftilmetan disulfonic, nonilfenoli etoxilați cu umiditate maximum 1% și liniaralchilbenzensulfonat de calciu uscat, recomandat 2...5%; 47  
49

# RO 125097 B1

1 f) 0,1...5% antispumant selectat dintre uleiurile de silicon cu mase moleculare  
cuprinse între 400 și 1000, recomandat 0,5...2%;

3 g) 0,01...1% stabilizatori selectați dintre benzoat de sodiu și cicloat de sodiu,  
recomandat 0,1...0,3%;

5 h) 1...10% apă distilată, recomandat 3...5%.

7 Compozițiile sub formă de geluri se obțin în trei etape: i). pregelifierea amidonului în  
apă distilată prin încălzirea sub agitare a amestecului până la obținerea unui gel cu un  
conținut de 6...10% amidon; ii). dizolvarea componentelor solizi solubili, dispersantul și  
9 stabilizatorul, în apă; iii). prepararea gelului prin omogenizarea sub agitare energetică a  
amidonului pregelifiat împreună cu soluția apoasă; (ii) și cu ceilalți componente, respectiv  
11 biomasa de drojdie, nutrientul, antispumantul și soluția apoasă 2...7% agent de îngroșare.

13 Compozițiile au fost testate din punct de vedere al viabilității și al caracteristicilor  
biologice. Viabilitățile determinate ale sporilor de drojdie din biopreparate au fost de  
85...97%.

15 În continuare, se dau 4 exemple de realizare a compozițiilor conform invenției.

17 **Exemplul 1.** Se obține următoarea compoziție sub formă de microemulsie: 10%  
biomasă de drojdie, suspensie concentrată de drojdie antagonistă *Saccharomyces*  
*cerevisiae*, tulpina L30, izolată de pe boabe de struguri, cu o concentrație în spori de  $6 \times 10^6$   
19 celule/ml, 9...10% fosfat de trisirilfenol etoxilat cu 16 moli etilenoxid, 2...3% alcool C<sub>12-14</sub>  
etoxilat cu 3 moli etilenoxid, 3% polietilenglicol, 4,5...5,5% sucroză, 4,5...5,5%  
21 carboximetilceluloză soluție apoasă 5%, 0,2% benzoat de sodiu, 30% solvent ecologic (esteri  
metilici ai acizilor grași obținuți din ulei de floarea soarelui) și apă distilată până la 100%,  
23 procentele fiind exprimate în greutate/volum. Se prepară faza organică prin dizolvarea  
fosfatului de trisirilfenol etoxilat cu 16 moli etilenoxid și a alcoolului C<sub>12-14</sub> etoxilat cu 3 moli  
25 etilenoxid în solventul ecologic. Se prepară faza apoasă prin dizolvarea sucrozei și a  
benzoatului de sodiu în ~80% din cantitatea necesară de apă distilată și omogenizarea  
27 soluției obținute cu suspensia concentrată de drojdie, polietilenglicolul și soluția apoasă 5%  
carboximetilceluloză. Microemulsia se obține prin picurarea sub agitare a fazei organice  
29 peste faza apoasă, completarea cu apă distilată până la 100% greutate/volum și  
amestecarea sub agitare până la obținerea unei microemulsii omogene.

31 Biopreparatul sub formă de microemulsie prezintă 85% viabilitate a sporilor de  
drojdie.

33 **Exemplul 2.** Se prepară o microemulsie conform exemplului 1, cu următoarea  
compoziție: 15% suspensie concentrată de drojdie antagonistă *Saccharomyces cerevisiae*,  
35 tulpina L30, izolată de pe boabe de struguri, 9,5...10,5% fosfat de trisirilfenol etoxilat cu 16  
moli etilenoxid, 2,5...3,5% alcool C<sub>12-14</sub> etoxilat cu 3 moli etilenoxid, 3% polietilenglicol, 5...6%  
37 sucroză, 4,5...5,5% carboximetilceluloză soluție apoasă 5%, 0,2% benzoat de sodiu, 30%  
solvent ecologic (esteri metilici ai acizilor grași obținuți din ulei de floarea soarelui), apă  
39 distilată până la 100%, procentele fiind exprimate în greutate/volum.

41 **Exemplul 3.** Se obține următoarea compoziție sub formă de gel: 1% suspensie  
concentrată de drojdie antagonistă *Saccharomyces cerevisiae*, tulpina L30, izolată de pe  
boabe de struguri, 72...75% amidon de porumb pregelifiat, 9...10% glicerină, 6...7% soluție  
43 apoasă 5% carboximetilceluloză, 3...4% sare de sodiu a acidului dinaftilmetan disulfonic, 1%  
ulei de silicon 1000, 0,2% benzoat de sodiu, 4...5% apă distilată, procentele exprimate în  
45 greutate. Amidonul se pregeliază cu apă prin încălzire sub agitare până la obținerea unui gel  
omogen cu conținut de 7...8% amidon. Se dizolvă în apă distilată dispersantul și benzoatul  
47 de sodiu. Amidonul pregelifiat, soluția apoasă preparată și restul componentelor se amestecă  
sub agitare energetică până la obținerea unui gel omogen.

## RO 125097 B1

**Exemplul 4.** Se prepară conform exemplului 3 o compoziție sub formă de gel care 1  
conține: 10% suspensie concentrată de drojdie antagonistă *Saccharomyces cerevisiae*,  
tulpina L30, izolată de pe boabe de struguri, 62...65% amidon de porumb pregelificat, 9...10% 3  
glicerină, 6,5...7,5% soluție apoasă 5% carboximetilceluloză, 3...4% sare de sodiu a acidului  
dinaftilmetan disulfonic, 1% ulei de silicon 1000, 0,2% benzoat de sodiu, 4...5% apă distilată, 5  
procente exprimate în greutate.  
Biopreparatul sub formă de gel prezintă 97% viabilitate a sporilor de drojdie. 7

# RO 125097 B1

## Revendicări

1  
3  
5  
7  
9  
11  
13  
15  
17  
19  
21  
23  
25  
27  
29  
31  
33  
35  
37  
39  
41  
43  
45

1. Compoziție de condiționare, sub formă de microemulsie, a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*, tulpina L30, izolată de pe boabe de struguri, antagonistă față de ciupercile producătoare de micotoxine, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 1...20% biomasă de drojdie, sub formă de suspensie concentrată, cu concentrație în spori de  $10^6...10^{11}$  celule/ml, rezultată din cultura ei pe orice mediu lichid sau semisolid, 2...15% nutrienți, 5...15% amestec de surfactanți anionici și neionici, 0,1...0,5% agent de îngroșare, 10...50% solvent ecologic, 0,01...1% stabilizator, 1...10% anticongelant, 15...50% apă distilată până la 100% greutate/volum.

2. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** surfactanții anionici sunt aleși dintre: fosfat de tristirilfenol polietoxilat cu 16 moli etilenoxid, alchilbenzen sulfonați de sodiu și alchilbensulfonați de calciu.

3. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** surfactanții neionici sunt aleși dintre: nonilfenol polietoxilat cu 8...10 moli etilenoxid, ulei de ricin polietoxilat cu 30...40 moli etilenoxid, oleile poliglicoleter, alcoolii  $C_{12}-C_{14}$  polietoxilați cu 3...8 moli etilenoxid, polisobat 20 și polisorbit 80.

4. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** raportul dintre surfactanții anionici și cei neionici este 1:9...9:1.

5. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** nutrienții sunt aleși dintre sucroză, amidon și glicerină.

6. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** agenții de îngroșare sunt aleși dintre: carboximetilceluloză, carboximetilceluloză sare de sodiu, gumă xantanică și alcool polivinilic.

7. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** solvenții ecologici sunt aleși dintre esteri metilici sau etilici ai acizilor grași, obținuți din uleiuri vegetale sau grăsimi animale.

8. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** stabilizatorii sunt aleși dintre benzoat de sodiu și cicloat de sodiu.

9. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** anticongelanții sunt aleși dintre mono-, di- și polietilenglicol, mono-, di- și polipropilenglicol și glicerină.

10. Compoziție de condiționare, sub formă de gel, a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*, tulpina L30, izolată de pe boabe de struguri, antagonistă față de ciupercile producătoare de micotoxine, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 1...20% biomasă de drojdie sub formă de suspensie concentrată, rezultată din cultura ei pe mediu GPYA, cu concentrație în spori de  $10^6...10^{11}$  celule/ml, 5...15% nutrienți, 55...85% agent de gelificare, 0,1...0,7% agent de îngroșare, 1...10% agent de dispersie, 0,1...5% antispumant, 0,01...1% stabilizator, 1...10% apă distilată, procente în greutate.

11. Compoziție conform revendicării 10, **caracterizată prin aceea că** nutrienții sunt aleși dintre sucroză și glicerină.

12. Compoziție conform revendicării 10, **caracterizată prin aceea că** agenții de gelificare sunt aleși dintre amidon pregelifiat de porumb, de grâu și de cartof.

13. Compoziție conform revendicării 10, **caracterizată prin aceea că** agenții de îngroșare sunt aleși dintre carboximetilceluloză, carboximetilceluloză sare de sodiu, gumă xantanică, alcool polivinilic.

# RO 125097 B1

14. Compoziție conform revendicării 10, **caracterizată prin aceea că** agenții de dispersie sunt aleși dintre lignosulfonat de sodiu, lignosulfonat de amoniu, sarea de sodiu a acidului dinaftilmetan disulfonic, nonilfenoli etoxilați cu umiditate maximum 1% și liniaralchilbenzensulfonat de calciu uscat. 1  
3
15. Compoziție conform revendicării 10, **caracterizată prin aceea că** antispumantul este de tipul ulei de silicon cu mase moleculare cuprinse între 400 și 1000. 5
16. Compoziție conform revendicării 10, **caracterizată prin aceea că** stabilizatorii sunt aleși dintre benzoat de sodiu și cicloat de sodiu. 7



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci