



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00671**

(22) Data de depozit: **01.09.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.07.2012** BOPI nr. 7/2012

(41) Data publicării cererii:
26.02.2010 BOPI nr. 2/2010

(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;**

• **RĂITARU GETA, STR. CAMIL RESSU
NR.66, BL.1, ET.5, AP.24, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RUSU NICOLETA, STR.ARIEȘUL MARE
NR.1, BL.I 5, SC.B, AP.28, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**M. Mapolelo, N. Torto, Trace enrichment of
metal ions in aquatic environments by
Saccharomyces cerevisiae, Department of
Chemistry, University of Borswana, p/bag
UB 00704, 19 mai 2004, Gaborone,
Botswana; JP 2007176879 (A)**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI BIOPREPARAT
ÎMBOGĂȚIT ÎN CUPRU, ZINC ȘI MANGAN**



RO 125200 B1

1 Inventția prezintă obținerea unui biopreparat de *S.cerevisiae*, îmbogățit în cupru, zinc
și mangan, ca supliment nutritiv.

3 În prezent, sunt cunoscute metode pentru obținerea unor suplimente nutritive pe bază
de biomasă de drojdie îmbogățită în minerale, cum sunt zincul, seleniul, magneziul, din *Trace*
5 *enrichment of metal ions in aquatic environments by Saccharomyces cerevisiae*, M.
Mapolelo, N. Torto, Departement of Chemistry, University of Borswana, p/bag UB 00704,
7 Gaborone, Botswana, 19 mai 2004, care prezintă celule de *Saccharomyces cerevisiae* care
au fost evaluate în ceea ce privește îmbogățirea cu urme de ioni metalici, cum ar fi: Cd^{2+} ,
9 Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} și Pb^{2+} din medii apoase. Au fost optimizați parametri care afectează
absorbția metalelor, cum ar fi pH-ul soluției, timpul de incubare, cantitatea de biomasă de
11 drojdie și efectul concentrației de glucoză (sursa de energie). Studii ulterioare au fost
efectuate pentru a evalua efectele asupra absorbției metalului, după tratarea drojdiei cu
13 glucoză, precum și cu un solvent organic. Rezultatele din aceste studii demonstrează că
drojdia este un mediu îmbogățit cu urme viabile de metal, care pot fi utilizate suspendate
15 liber în soluție pentru a atinge un factor de îmbogățire foarte mare în mediul acvatic.

JP 2007176879 prezintă un medicament eficient pentru prevenirea sau tratamentul
17 leziunilor provocate de radiații sau de expunerea la radiații. Agentul de protecție împotriva
radiațiilor cuprinde drojdia *Saccharomyces cerevisiae* sau drojdia *Saccharomyces cerevisiae*
19 care conține un element mineral cu acțiune antioxidantă. Concret, agentul de protecție
împotriva radiațiilor cuprinde drojdia *Saccharomyces cerevisiae*, conținând cel puțin
21 mangan, zinc, cupru și seleniu.

Sunt cunoscute cercetările actuale privind obținerea unor suplimente nutritive pe bază
23 de biomasă de drojdie îmbogățită în minerale, cum sunt zincul, seleniul, magneziul etc., în
care drojdia este utilizată ca un biotransportor ce pune la dispoziția organismului minerale
25 legate organic (mai puțin toxice).

Drojdiile sunt cunoscute pentru abilitatea lor de a acumula ionii metalici din soluțiile
27 apoase prin diferite interacțiuni fizico-chimice (adsorbție, absorbție sau un mecanism
dependent de absorbție). Fermentațiile tulpinilor de *S.cerevisiae* se efectuează în medii de
29 cultură ce conțin melasă (ca sursă de carbon) și săruri de zinc, cupru și mangan al căror
conținut variază în funcție de cerințele drojdiei (R. P. Jones, G. M. Gadd, *Enzyrne Microb.*
31 *Technol.* 12 (1990), 1-17).

Este cunoscut faptul că sursele anorganice (sulfatul de mangan, sulfatul de cupru,
33 sulfatul de zinc) sunt pro-oxidative și au implicații într-o serie de procese fiziologice. Zincul
îndeplinește în organism rolul unui agent de circulație, dirijând și supraveghând buna
35 desfășurare a proceselor fiziologice și întreținerea sistemelor enzimatice și celulare.
Manganul acționează ca și activator enzimatic, dar ca și component al metaloenzimelor:
37 piruvat decarboxilază și superoxidismutază. Cuprul este necesar pentru sintetizarea
hemoglobinei din fierul organic. Zincul joacă un rol important în mecanismul de apărare
39 antioxidantă ca parte integrantă din SOD (superoxidismutază).

Sunt cunoscute procedee separate de obținere a biomasei de drojdie îmbogățită în
41 cupru, procedeu de obținere de biomasă de drojdie îmbogățită în zinc, biomasă de drojdie
îmbogățită în mangan, dar nu este cunoscut procedeu de obținere a unui singur biopreparat
43 pe bază de biomasă de drojdie îmbogățită în cupru, zinc și mangan.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere
45 a unui bioprodus *S. cerevisiae*, îmbogățit în cupru, zinc și mangan.

Procedeu de obținere a unui biopreparat de *S. cerevisiae*, îmbogățit în cupru, zinc
47 și mangan înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că celulele de *S.cerevisiae*
rezistente la 1000 ppm $ZnSO_4$, soluție de concentrație 1%, la 1000 ppm $Cu SO_4$, soluție de

RO 125200 B1

concentrație 1%, la 1250 ppm MnSO ₄ , soluție de concentrație 1%, cu o viabilitate celulară de 2,14 x 10 ⁴ ufc/ml sunt selectate pentru obținerea preinocului și apoi a inoculului de laborator, inocul care este folosit ca material de însămânțare pentru mediul de fermentație, la care se adaugă, la momentul 0 al cultivării, următoarele săruri minerale: 73,6 ppm sulfat de cupru, 100 ppm sulfat de zinc și 180 sulfat de mangan, se corectează pH-ul la 5...5,5 pe parcursul cultivării, obținându-se în cele din urmă biopreparatul care se purifică fie prin filtrare pe membrană clarifiantă, fie prin centrifugare la 3000 rpm, timp de 20 min, apoi se pasteurizează și se usucă, obținându-se o biomasă de drojdie uscată cu concentrație de 14 g/l, care conține 1016...1145,8 ppm Cu, 1123,8...1143,4 ppm Zn și 33,1...33,9 ppm Mn.	1 3 5 7 9
Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:	
- viabilitate ridicată în urma optimizării concentrației de minerale adăugate în mediul de cultură;	11
- obținerea unei concentrații ridicate în minerale în biopreparatul pe bază de biomasă de drojdie;	13
- dezvoltarea biomasei a fost influențată atât de concentrația de minerale, cât și de modul de adaos;	15
- obținerea unei biomase uscate crescute 14 g/l DCW și în același timp un grad ridicat de încorporare al cuprului, zincului și manganului de către celulele de drojdie;	17
- biomasa de drojdie îmbogățită în cupru, zinc și mangan poate fi utilizată în zootehnie, ca aditiv furajer sub formă de biopreparat;	19
- biopreparatul poate fi aplicat pentru neutralizarea radicalilor liberi, ca scavenger, datorită cuprului, zincului și manganului din biomasa de drojdie.	21
Bioprocesul conform invenției constă în cultivarea tulpinii <i>S.cerevisiae</i> , selectată în ceea ce privește rezistența celulară la diferite concentrații de sulfat de cupru, zinc și mangan, pentru formarea culturii stoc de întreținere, care este folosită ca material de însămânțare pentru cultivare în sistem submers, pentru obținerea inoculului de laborator dezvoltat timp de 17 h și 30 min, utilizat apoi în raport de 15% pentru inocularea mediului de fermentație, care conține: sursa de C și sursă de N, 73,6 ppm sulfat de cupru, 100 ppm sulfat de zinc, 180 ppm sulfat de mangan, adăugate la momentul 0 h de cultivare, la un pH inițial de 6,4, corectat la 16 h de la cultivare și apoi este corectat din când în când, sub agitare la 240 rpm, la temperatura de 28°C, timp de 17...20 h, obținându-se în final biopreparatul pe bază de biomasă de drojdie îmbogățită în cupru, zinc și mangan, prin două metode de prelucrare.	23 25 27 29 31
Coloniile de drojdie, rezistente la concentrații de cupru, zinc și mangan care nu provoacă toxicitate celulară, ajung, în final, la un număr de 2,14 x 10 ⁴ UFC/ml. Coloniile selectate, care prezintă rezistență celulară la cupru, zinc și mangan, formează cultura stoc de întreținere, din care se formează preinoculul. Din preinocul se obține cultura de inocul prin însămânțarea a 100 ml mediu lichid pe mediu înclinat pe bază de extract de drojdie, extract de malt, zaharoză și agar, se incubează la 28°C, cu agitare la 240 rpm, timp de 17-18 h de cultivare. Procedul este avantajos, datorită obținerii unui randament ridicat de biomasă uscată, și anume DCW-14,3 g/l.	33 35 37 39
Se prezintă în continuare două exemple de realizare a procedurii conform invenției.	41
Exemplul 1. Coloniile de <i>S.cerevisiae</i> au fost testate la diferite concentrații de cupru, zinc și mangan, fiind selectate coloniile cele mai mari și cel mai bine formate pentru obținerea culturii stoc de întreținere. Tuburile cu extract de malt (lichid) sunt însămânțate cu 7,75 ml cultură de <i>S.cerevisiae</i> 1%, la pH 5,5 pe fiecare eprubetă, apoi se adaugă următoarele săruri minerale: 1000 ppm ZnSO ₄ , soluție 1%, la pH 4...5, 1000 ppm CuSO ₄ , soluție 1%, la pH 4...5, 1250 ppm MnSO ₄ , soluție 1%, la pH 4-5, se incubează 36...48 h, la 28°C. Se obține o viabilitate celulară Ufc/ml 2,14 x 10 ⁴ , DO _{590 nm} 0,74. Se izolează coloniile	43 45 47

RO 125200 B1

1 care rezistă la concentrații ridicate de minerale, pentru formarea culturii de întreținere pe
mediu înclinat agarizat. Din cultura stoc de întreținere se obține preinoculul de laborator, din
3 preinoculul de laborator se obține inoculul de laborator; inocularea mediului de fermentație
se realizează în procent de 15% cu un inocul lichid, dezvoltat la 28°C, timp de 17 h, care
5 prezintă o $DO_{590\text{ nm}}$ de 20,20. Se folosește o variantă de inocul care conține sucroză în
concentrație de 8%, în greutate, s.r. Cultura de inocul dezvoltată se însămânțează în raport
7 de 15%, pe mediul optimizat pe bază de zaharoză, fosfat monoamoniacal, sulfat de
magneziu și sulfat de cupru (53,6 ppm la momentul 0 h de cultivare și încă 20 ppm până la
9 momentul 15 h de la cultivare), sulfat de zinc (50 ppm la momentul 0 h de cultivare și încă
50 ppm până la momentul 15 h de la cultivare) și sulfat de mangan (100 adăugat la momentul
11 0 h de la cultivare și încă 80 ppm adăugat la momentul 15 h de la cultivare). Se agită la
240 rpm, la pH 6,4, timp 17...19 h de cultivare. Pentru obținerea biopreparatului îmbogățit
13 în cupru, zinc și mangan, mediul de cultură se prelucrează prin spălări cu apă distilată și
după fiecare spălare se filtrează pe membrană clarifiantă, pentru eliminarea reziduurilor
15 celulare rămase neprocesate, apoi se pasteurizează pentru inactivarea celulară, după care
se usucă până la umiditate 5%.

17 Biopreparatul obținut în urma separării prin filtrare conține următoarele concentrații
de minerale, determinate prin metoda spectrofotometrică de absorbție atomică (AAS) și prin
19 spectrometrie de masă cuplată inductiv (ICP-MS), conform metodologiei ICCF:

Biopreparat pe bază de drojdie îmbogățită în cupru, zinc și mangan	Cupru (ppm)	Zinc (ppm)	Mangan (ppm)
	1016	1123,8	33,1

23 **Exemplul 2.** Obținerea preinocului și a inocului s-a realizat în aceleași condiții ca cele
din exemplul 1 descris mai sus.

25 Tulpina *S.cerevisiae* este testată la diferite concentrații de minerale, în cele din urmă
fiind selectate coloniile cele mai mari și cel mai bine formate pentru obținerea culturii stoc de
27 întreținere. Tuburile cu extract de malț (lichid) sunt însămânțate cu 7,75 ml cultură de
S.cerevisiae 1% la pH 5,5 pe fiecare eprubetă, apoi se adaugă următoarele săruri minerale:
29 1000 ppm $ZnSO_4$, soluție de concentrație 1%, la pH 4...5, 1000 ppm $Cu SO_4$, soluție de
concentrație 1%, la pH 4...5, 1250 ppm $Mn SO_4$, soluție de concentrație 1%, la pH 4-5, se
31 incubează 36...48 h, la 28°C. Se obține o viabilitate celulară Ufc/ml $2,14 \times 10^4$, $DO_{590\text{ nm}}$ 0,74.
33 Se izolează coloniile care au rezistat la concentrații ridicate de minerale, pentru formarea
culturii de întreținere pe mediu înclinat agarizat. Din cultura stoc de întreținere se obține
35 preinoculul de laborator. Din preinoculul de laborator se obține inoculul de laborator.
Inocularea mediului de fermentație se realizează cu un inocul lichid în procent de 15%,
37 dezvoltat la 28°C, timp de 17 h, care prezintă $DO_{590\text{ nm}}$ de 20,20. Se folosește varianta de
inocul care conține sucroză în concentrație de 8%, în greutate, s.r. Cultura dezvoltată de
39 inocul se însămânțează în raport de 15% pe mediul optimizat pe bază de zaharoză, fosfat
monoamoniacal, sulfat de magneziu și sulfat de cupru (73,6 ppm la momentul 0 de cultivare);
41 sulfat de zinc (100 ppm la momentul 0 de cultivare); sulfat de mangan (180 ppm adăugat la
momentul 0 de cultivare).

43 Prelucrarea mediului de cultură fermentat se realizează la un pH final de 3,8, prin
separare pentru eliminarea reziduurilor celulare rămase neprocesate și apoi centrifugare,
45 pasteurizare pentru inactivare celulară, după care se usucă până la umiditate 5%, obținându-
se biopreparatul pe bază de biomasă de drojdie (DCW -14 g/l), îmbogățit în cupru, zinc și
47 mangan.

RO 125200 B1

Biopreparatul obținut în urma separării prin centrifugare conține următoarele concentrații de minerale, determinate prin metoda spectrofotometrică de absorbție atomică (AAS) și prin spectrometrie de masă cuplată inductiv (ICP-MS), conform metodologiei ICCF:

1

3

Biopreparat pe bază de drojdie	Cupru (ppm)	Zinc (ppm)	Mangan (ppm)
îmbogățită în cupru, zinc și mangan	1016	1123,8	33,1

5

RO 125200 B1

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere a unui biopreparat de *S.cerevisiae*, îmbogățit în cupru, zinc și mangan, **caracterizat prin aceea că** celulele de *S.cerevisiae* rezistente la 1000 ppm ZnSO₄, soluție de concentrație 1%, la 1000 ppm Cu SO₄, soluție de concentrație 1%, la 1250 ppm Mn SO₄, soluție de concentrație 1%, cu o viabilitate celulară de $2,14 \times 10^4$ ufc/ml sunt prelucrate pentru obținerea preinocului și apoi a inoculului de laborator, inocul care este folosit ca material de însământare pentru mediul de fermentație, la care se adaugă, la momentul 0 al cultivării, următoarele săruri minerale: 73,6 ppm sulfat de cupru, 100 ppm sulfat de zinc și 180 sulfat de mangan, și se corectează pH-ul la 5...5,5 pe parcursul cultivării, obținându-se în cele din urmă biopreparatul, care se purifică fie prin filtrare pe membrană clarifiantă, fie prin centrifugare la 3000 rpm, timp de 20 min, apoi se pasteurizează și se usucă, obținându-se o biomasă de drojdie uscată cu concentrație de 14 g/l, care conține 1016...1145,8 ppm Cu, 1123,8...1143,4 ppm Zn și 33,1...33,9 ppm Mn.

5

7

9

11

13



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 368/2012