



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00014**

(22) Data de depozit: **12/01/2017**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2021** BOPI nr. **11/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. **5/2017**

(73) Titular:
• **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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CN 1683516; MD 4086

(54) **BIOINGREDIENT PE BAZĂ DE BIOMASĂ DE DROJDIE
ACTIVĂ, ÎMBOGĂȚITĂ ÎN CALCIU ȘI PROCEDEU
DE OBTINERE**



RO 131852 B1

1 Inventția se referă la obținerea unui produs pe bază de biomasă de drojdie nou
identificată *Candida sp.* și cu număr de depozit DBVPG37P, îmbogățită în calciu care are
3 capacitatea de a regla deficitul de calciu din organismul uman și prezintă un miros și o aromă
plăcută.

5 Persoanele cu boală celiacă au deficiență în calciu, comparativ cu populația generală
adultă. Adulții cu boală celiacă au nevoie de o doză de calciu între 1000 mg și 1500 mg în
7 fiecare zi. Este cunoscut faptul că calciul este un element esențial pentru formarea și menți-
nerea sănătății oaselor. Osteoporoza reprezintă o afecțiune scheletică sistemică caracte-
9 rizată de o masă osoasă scăzută și deteriorare a țesutului osos o dată cu creșterea con-
secutivă a fragilității osoase și susceptibilitate la fracturi.

11 Obținerea și utilizarea de biomase de drojdii îmbogățite în calciu (lactat de calciu)
ingrediente care se regăsesc în REGULAMENTUL (CE) NR. 1170/2009 AL COMISIEI din
13 30 noiembrie 2009) prin intermediul unor procedee biotehnologice, este avantajoasă în
scopul eliminării formelor anorganice și organice de sinteza chimică.

15 Nu există studii în stadiul actual al cunoașterii privind obținerea prin biosinteză de
biomasă de drojdie activă cu calciu cu tulpina a nou identificată *Candida sp.* DBVPG37P.

17 Este cunoscut faptul că biomasa de drojdii îmbogățită cu calciu conform invenției
RO A/00600/29/08/16, elimină dezavantajul utilizării produselor de sinteză, ca spre exemplu:
19 pantotenat de calciu, propionat de calciu, sulfat de calciu, lactat de calciu ce utilizează o
tulpină de drojdie adaptată la calciu. Tulpina identificată și cu nr. de colecție conform IDA
21 DBVPG37P nu a mai fost folosită la obținerea de biomasa de drojdie îmbogățită în calciu
activă și care prezintă o aromă plăcută. Drojdiile au capacitatea de a acumula numeroase
23 microelemente (fier, zinc, crom, seleniu etc).

Obținerea de biomasă de drojdie îmbogățită în calciu prin drojdiile adaptate la calciu
25 pot avea o capacitate mărită de asimilare a calciului în biomasă și nu sunt modificate genetic.

27 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unui produs pe bază
de biomasă de drojdii izolate din biomasa de vin alb, îmbogățite în calciu cu ajutorul drojdiei
noi identificate *Candida sp.*, care are număr de depozit DBVPG 37P și care nu a fost
29 adaptată la calciu pentru aceasta.

31 Soluția tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unui produs pe bază
de biomasă activă de drojdie *Candida sp.* DBVPG 37P, îmbogățită în calciu pentru a fi folosit
ca bio-fotificant în produsele derivate de panificație și pentru a ajusta deficiența de calciu din
33 organism, deficiența care poate provoca diferite boli în organism.

35 Produsul, conform invenției, este obținut printr-un procedeu caracterizat prin
aceea că:

37 - se prepară un preinocul, prin dezvoltare timp de 30-48 h, la o temperatură de 30°C,
a unei culturi de întreținere a unei colonii de *Candida sp.* DBVPG37P selectată anterior prin
cultivarea pe mediu YMSP-agar, la o temperatură de 28-30°C, timp de 30-48 h;

39 - se prepară un inocul lichid 1 și/sau 2 din preinocul, care se incubează pe mediu
YSP, la o temperatură de 30°C, agitare la 170-240 rpm, timp de 15-22 h și apoi se trece pe
41 mediu YPS;

43 - într-un fermentator de 6l Vt și 4l Vu, se însămânțează cu inoculul lichid un mediu
de cultură care conține în g%(v/v): extract de drojdie 0,3-0,7, zahăr inițial 100-150 g/3,2l,
săruri de Mg²⁺ și K⁺, cu adaosul pe parcurs a soluțiilor de lactat de calciu și zaharoză, când
45 are loc fermentarea propriu-zisă la pH = 4,0 reglat cu o soluție amoniacală de 5%, agitare
la 200-550 rpm, la o temperatură de 28-30°C, timp de 14-16 h;

RO 131852 B1

| | |
|---|----------|
| - se separă biomasa îmbogățită în calciu prin centrifugare la 3000-4500 rpm, într-o centrifugă Sorvall de 4 × 400 ml, timp de 10-15 min, apoi se spală de trei ori cu apă distilată, prin agitare energetică, pentru îndepărtarea sărurilor de Ca reziduale, urmată de centrifugare și descărcarea apei de spălare, și se usucă prin liofilizare, timp de 48 h, în mai multe etape. | 1 3 |
| Soluția de lactat de calciu se adaugă gradual, sub formă de soluție 9 g%, folosind o seringă cu filtre sterile în 5-6 porții de câte 50 ml pe parcursul procesului. | 5 |
| Soluția de zaharoză se adaugă, cu pompa peristaltică în porții mari de 100 g zaharoză dizolvată în 300 ml apă distilată, prin agitare cu încălzire și apoi sterilizată la 105°C. | 7 |
| Liofilizarea constă în două operații: înghețarea probelor în etape succesive și sublimarea gheții cu ajutorul vidului înaintat. | 9 |
| Bioingredientul direct obținut prin procedeul definit mai sus prezintă un grad de asimilare a calciului în biomasa de drojdie de 8200-18000 mg/kg și o concentrație celulară uscată de drojdie activă de 1 g%. | 11 13 |
| Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje: | |
| - produsul obținut utilizează o tulpină de drojdie izolată din vin alb și identificată ca nouă, ca și <i>Candida sp.</i> , cu nr. de depozit DBVPG37P. | 15 |
| - produsul obținut prezintă calciu în biomasa de drojdie; | 17 |
| - produsul pe bază de biomasă de drojdie activă <i>Candida sp.</i> DBVPG37P, îmbogățită în calciu poate fi folosită pentru obținerea de produse derivate de panificație și pentru suplimente alimentare; | 19 |
| - produsul pe bază de biomasă de drojdie îmbogățită active <i>Candida sp.</i> DBVPG37P, în calciu poate fi adăugat ca bioingredient în panificație; | 21 |
| - produsul pe bază de drojdie îmbogățită în calciu utilizează tulpina <i>Candida sp.</i> DBVPG37P prezintă calciu asimilat în biomasă în concentrații de până la 18000 ppm. Asimilarea este influențată de modul de adaos al soluției de lactat de calciu în timpul fermentației; | 23 25 |
| - produsul pe bază de drojdie îmbogățită în calciu ar putea fi inactivat pentru a putea să fie folosit în hrana animalelor sau ar putea fi utilizat ca supliment alimentar în concentrațiile conform legislației în vigoare; | 27 |
| - produsul utilizează în timpul fermentației utilizează lactat de calciu care este folosit ca atare ca stimulator de creștere al pâinii în industria de panificație; | 29 |
| - produsul fără adaos de calciu poate fi folosit ca sursă de vitamine sub formă activă sau inactivă; | 31 |
| - drojdia martor activă de <i>Candida sp.</i> DBVPG37P fără calciu prezintă un miros plăcut, o culoare alb-bej, cu o viabilitate ridicată și ar putea fi folosită și ca drojdie inactivă ca sursă de proteină sau ca drojdie activă instant pentru produsele de panificație; | 33 35 |
| - drojdia martor fără calciu <i>Candida sp.</i> DBVPG37P ar putea fi obținută și în formă inactivă și ar prezenta avantajul utilizării în hrana câinilor și peștilor ca sursă de proteină și vitamine; | 37 |
| - bioingredientul martor pe bază de drojdie prezintă un miros și culoare plăcute și ar putea fi folosit atât în panificație, produse derivate de panificație cât și în vinificație și cosmetică. | 39 41 |
| Se dă în continuare un exemplu de obținere a produsului pe bază de biomasă de drojdie activă <i>Candida sp.</i> DBVPG37P de îmbogățită în calciu. | 43 |
| Exemplu | |
| Obținerea de colonii izolate de drojdie <i>Candida sp.</i> DBVPG37P s-a realizat prin aplicarea tehnicii diluțiilor succesive. Diluții zecimale s-au realizat pe plăci Petri cu mediu MP agarizat (extract de malț, peptonă de soia, agar-agar). | 45 47 |

RO 131852 B1

1 Identificarea drojdiei ca, *Candida sp.* s-a realizat prin tehnica secvențierii ADN.
2 Domeniile D1/D2 ale ADNr 26S în două cazuri regiunile a ADNr ITS1 și ITS2, incluzând gena
3 ARNr 5.8S a tulpinii au fost secvențiate și s-a obținut depozitul DBVPG37P.

4 *Candida sp.*, cu nr. de depozit DBVPG37P după identificare a fost utilizată pentru
5 obținerea culturii stoc de intretinere.

6 Preinoculul (cultura statică) se prepară dintr-o cultură de întreținere a unei colonii de
7 *Candida sp.* DBVPG37P selectată anterior prin cultivarea pe mediu YMSP-agar la
8 temperatura de 28-30°C, timp de 30-48 h.

9 Mediul YMSP ((g/l):

- 10 - extract de drojdie (*yeast extract*) 5,0;
- 11 - extract de malț 20,0;
- 12 - zahar (sucroză) 20,0;
- 13 - agar-agar 25,0-30,0;
- 14 - apă distilată 1000 ml.

15 S-au repartizat 5-7 ml de mediu steril agarizat pe tub înclinat. S-au obținut tuburi
16 înclinate agarizate solide.

17 *Fermentația*

18 Au fost însămnâțate tuburile înclinate cu cultura de drojdie identificată *Candida sp.*
19 DBVPG37P și s-au dezvoltat pentru 30-48 h la 30°C. Prepararea inoculului de laborator la
20 shaker 140-240 rpm.

21 Preinoculul este apoi utilizat la prepararea inoculului lichid astfel: cultura *Candida sp.*
22 DBVPG37P dezvoltată un tub/2 tuburi înclinate a fost folosită la obținerea inoculului 150 ml
23 mediu/flacon Erlenmayer 500 ml (pe bază de zaharoză/zahar 6-7 g%; extract de drojdie
24 0,5-0,7 g%; peptonă 0,3-0,5 g%), care s-a incubat apoi la temperatura de 30°C timp de
25 15-22 h cu agitare (170-240 rpm). Într-un fermentator 4l Vu (Vt = 6l), mediu de cultură ce
26 conține g% (v/v): extract de drojdie 0,3-0,7, zahăr inițial (100-150 g/3,2 L), săruri de Mg²⁺ și
27 K⁺.

28 Soluția de calciu lactat 9 g%-300 ml a fost adăugată în porții de câte 50 ml pe
29 parcursul procesului în 5-6 porții cu seringă de 50 ml ce a utilizat filtre sterile de dimensiuni
30 de 2,5 μm.

31 Soluția de zaharoză a fost adăugată în porții mari (100 g dizolvate în 300 ml apă și
32 sterilizate la 105°C).

33 Reglarea pH-ului s-a făcut când s-a atins valoarea de 4,0, cu o soluție amoniacală
34 de 5%. Pe parcursul fermentației s-au urmărit parametri tehnologici:

- 35 - durata de cultivare: 14-16 h;
- 36 - temperatura: 28-30°C;
- 37 - pH pe parcursul cultivării: 4-5,5;
- 38 - rata de agitare: 200-550 rpm.

39 *Separarea mediului fermentat*

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

43 O separare bună s-a realizat la 3000-4500 rpm timp de 10-15 min, utilizând o
44 centrifugă Sorvall (4 x 400 ml).

45 *Spălarea biomasei*

46 Pentru îndepărtarea mediului de cultură reținut între celulele de drojdie, precum și a
47 sărurilor de Ca rămase neprocesate, este necesară spălarea de trei ori cu apă distilată a
48 biomasei separate. Spălarea se efectuează prin agitare energetică urmată de centrifugare și
49 descărcarea apei de spălare.

RO 131852 B1

Uscarea prin 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 h, în mai multe etape.

Produsul conform invetiei, prezintă următoarele caracteristici:

S-a observat faptul că, adaosul de calciu împreună cu sursa de zahăr, pe parcursul fermentației, duce la captarea calciului 8200-18000 mg/kg în biomasa de drojdie activă *Candida sp.* DBVPG37P;

Aspect: Pulbere de culoare bej deschis, cu miros plăcut de drojdie, cu miros și aromă plăcută, nu râncedă.

Afost testată în paralel și proba martor.

| Proba | Proteina g/100 | Bacterii Coliforme | Drojdi | Mucegaiuri | Concentrația de calciu asimilat în biomasă | DCW (g%) |
|--|----------------|--------------------|-----------------------|------------|--|----------|
| Biomasă activă de drojdie <i>Candida sp.</i> DBVPG37P îmbogățită în calciu | 40-50 | Sub 10 | 0,5 x 10 ⁵ | Sub 10 | 8200-18000 mg/kg | 07-1 g% |

Pentru proba martor fără adaos de calciu a fost folosită aceeași tulpină 9 *Candida sp.* cu număr de depozit DBVPG37P.

Candida sp. DBVPG37P după identificare a fost utilizată pentru obținerea culturii stoc de întreținere.

Preinoculul (cultura statică) se prepară dintr-o cultură de întreținere a unei colonii de *Candida sp.* DBVPG37P selectată anterior prin cultivarea pe mediu YMSP-agar la temperatura de 28-30°C timp de 48 h.

Mediul YMSP ((g/l):

- extract de drojdie (yeast extract) 5,0;
- extract de malț 20,0;
- zahar (sucroză) 20,0;
- agar-agar 25,0-30,0;
- apă distilată 1000 ml.

S-au repartizat 5-7 ml de mediu steril agarizat pe tub inclinat. S-au obținut tuburi înclinate agarizate solide. Au fost însămânțate tuburile înclinate cu cultura de drojdie identificată *Candida sp.* DBVPG37P și s-au dezvoltat pentru 48 h la 30°C. (RO A/00709/06/10/2016 cu titlul "Produs pe bază de biomasă de drojdi, îmbogățită în calciu și fier și procedeu de obținere"). Prepararea inoculului lichid de laborator la shaker 140-240 rpm - generația 1: Preinoculul este apoi utilizat la prepararea inoculului lichid astfel: cultura *Candida sp.* DBVPG37P dezvoltată un tub/2 tuburi înclinate a fost folosită la obținerea inoculului 150 ml mediu/flacon Erlenmayer 500 ml (pe bază de zaharoză/zahăr 6-7 g%; extract de drojdie 0,5-07 g%; peptonă 0,3-0,5 g%), care s-a incubat apoi la temperatura de 30°C timp de 15-22 h cu agitare (170-240 rpm).

RO 131852 B1

1 *Bioproces fermentativ pentru obținerea de biomasă de drojdie martor*

Într-un fermentator 4l Vu (Vt = 6l), mediu de cultură ce conține g% (v/v): extract de
3 drojdie 0,3-0,7, zahăr inițial (100-150 g/3,2 L), săruri de Mg²⁺ și K⁺.

5 Se adaugă soluție amoniacală 5% și se păstrează pH-ul în limita a 4,1-5,2. Soluția
de zaharoză/zahăr se va adăuga porții: 150 g dizolvată în 300 ml apă distilată sterilizată prin
autoclavare.

7 Pe parcursul fermentației s-au urmărit parametri tehnologici:

- temperatura: 28-30°C;

9 - rata de agitare: 200-550 rpm.

11 Fermentația probei martor durează între 14 și 22 h. S-a obținut o biomasă uscată prin
liofilizare de de drojdie activă de 1 g%.

13 Aspect: Pulbere de culoare bej deschis, cu miros plăcut de drojdie, o aromă plăcută,
nu rancedă.

| 15 Proba | Bacterii | Drojdie | Mucegaiuri | DCW (g %) |
|--|----------|-----------------------|------------|-----------|
| 17 Biomasă de drojdie <i>Candida</i> <i>sp. DBVPG37P</i> 19 activă - martor | Sub 10 | 3,4 x 10 ⁶ | Sub 10 | 07-1 g% |

RO 131852 B1

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unui bioingredient pe bază de drojdie activă îmbogățită în calciu, **caracterizat prin aceea că:** 3
- se prepară un preinocul, prin dezvoltare timp de 30-48 h, la o temperatură de 30°C, a unei culturi de întreținere a unei colonii de *Candida sp.* DBVPG37P selectată anterior prin cultivarea pe mediu YMSP-agar, la o temperatură de 28-30°C, timp de 30-48 h; 5
 - se prepară din preinocul un inocul lichid 1 și/sau 2, care se incubează pe mediu YSP, la o temperatură de 30°C, agitare la 170-240 rpm, timp de 15-22 h și apoi se trece pe mediu YPS; 9
 - într-un fermentator de 6 L Vt și 4 L Vu, se însămânțează cu inoculul lichid un mediu de cultură care conține în g%(v/v): extract de drojdie 0,3-0,7, zahăr inițial 100-150 g/3,2 L, săruri de Mg²⁺ și K⁺, cu adaosul pe parcurs a soluțiilor de lactat de calciu și zaharoză, când are loc fermentarea propriu-zisă la pH = 4,0 reglat cu o soluție amoniacală de 5%, agitare la 200-550 rpm, temperatură de 28-30°C, timp de 14-16 h; 11
 - se separă biomasa îmbogățită în calciu prin centrifugare la 3000-4500 rpm, într-o centrifugă Sorvall de 4 × 400 ml, timp de 10-15 min, apoi se spală de trei ori cu apă distilată, prin agitare energetică, pentru îndepărtarea sărurilor de Ca reziduale, urmată de centrifugare și descărcarea apei de spălare, și se usucă prin liofilizare, timp de 48 h, în mai multe etape. 13
2. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, soluția de lactat de calciu se adaugă gradual, sub formă de soluție 9 g%, folosind o seringă cu filtre sterile în 5-6 porții de câte 50 ml pe parcursul procesului. 15
3. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, soluția de zaharoză se adaugă, cu o pompă peristaltică în porții mari de 100 g zaharoză dizolvată în 300 ml apă distilată, prin agitare cu încălzire și apoi sterilizată la 105°C. 17
4. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, liofilizarea constă în două operații: înghețarea probelor în etape succesive și sublimarea gheții cu ajutorul vidului înaintat. 19
5. Bioingredient direct obținut prin procedeul definit în revendicările 1-4, **caracterizat prin aceea că**, prezintă un grad de asimilare a calciului în biomasa de drojdie de 8200-18000 mg/kg și o concentrație celulară uscată de drojdie activă de 1 g%. 21



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Inventții și Mărci
sub comanda nr. 510/2021