



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00014

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

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

(71) Solicitant:
• 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

(54) PRODUS PE BAZĂ DE BIOMASĂ DE DROJDIE ACTIVĂ,
ÎMBOGĂȚITĂ ÎN CALCIU, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs pe bază de biomasă de drojdie activă, îmbogățită în calciu, și la un procedeu pentru obținerea acestuia, utilizat ca supliment alimentar, pentru reglarea deficitului de calciu, și ca bioingredient în produse de panificație, pentru calitățile lor senzoriale. Produsul conform invenției este pe bază de biomasă de drojdie activă, cu tulpina de *Candida* sp., cu numărul de colecție conform IDA DVPG37P, având o concentrație de calciu asimilată de 8200...18000 mg/kg, și o concentrație celulară uscată

de drojdie activă de 1% masic. Procedeu conform invenției constă în izolarea tulpinii din vin alb, prepararea culturii de întreținere, a culturii preinocul, a culturii inocul generația 1 și/sau 2, urmată de însă-mânțarea mediului de fermentație cu inocul generația 1 și/sau 2, separarea mediului fermentat, rezultând biomasă umedă de drojdie, care este purificată și uscată.

Revendicări: 6



DESCRIERE

PRODUS PE BAZA DE BIOMASA DE DROJDIE ACTIVA, IMBOGATITA IN CALCIU SI PROCEDEU DE OBTINERE

Inventia se refera la obtinerea unui produs pe baza de biomasa de drojdie nou identificata *Candida sp.* si cu numar de depozit DBVPG37P, imbogatita in calciu care are capacitatea de a regla deficitul de calciu din organismul uman si prezinta un miros si o aroma placuta.

Persoanele cu boala celiaca au deficiente in calciu, comparativ cu populația generală adultă. Adultii cu boala celiaca au nevoie de o doza de calciu între 1000 miligrame (mg) și 1500 mg în fiecare zi. Este cunoscut faptul ca calciul este un element esențial pentru formarea și menținerea sănătății oaselor. Osteoporoza reprezintă o afecțiune scheletică sistemică caracterizată de o masă osoasă scăzută și deteriorare a tesutului osos o dată cu creșterea consecutivă a fragilității osoase și susceptibilitate la fracturi (MARCU F.M., 2010).

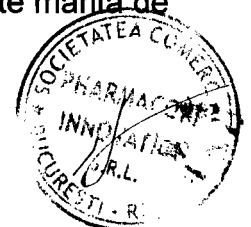
Obținerea și utilizarea de biomase de drojdii imbogatite in calciu (lactat de calciu) ingrediente care se regasesc in REGULAMENTUL (CE) NR. 1170/2009 AL COMISIEI din 30 noiembrie 2009) prin intermediul unor procedee biotehnologice, este avantajoasa in scopul eliminarii formelor anorganice si organice de sinteza chimica.

Nu exista studii in stadiul actual al cunoasterii privind obtinerea prin biosinteza de biomasa de drojdie activa cu calciu cu tulpina a noua identificata *Candida sp.* cu patent deposit form DBVPG37P.

Este cunoscut faptul ca biomasa de drojdii imbogatita cu calciu conform inventiei A/00600/29/08/16, elimina dezavantajul utilizarii produselor de sinteza, ca spre exemplu: pantotenat de calciu, propionat de calciu, sulfat de calciu, lactat de calciu ce utilizeaza o tulpina de drojdie adaptata la calciu. Tulpina identificata si cu nr de colectie conform IDA DBVPG37P nu a mai fost folosita la obtinerea de biomasa de drojdie imbogatita in calciu activa si care prezinta o aroma placuta.

Drojdiile au capacitatea de a acumula numeroase microelemente (fier, zinc, crom, selenium, etc).

Obținerea de biomasa de drojdie imbogatita in calciu (Barbulescu I.D, Marinescu S.I, Frincul M, 2016) prin drojdiile adaptate la calciu pot avea o capacitate marita de



asimilare a calciului in biomasa si nu sunt modificate genetic.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in obtinerea unui produs pe baza de biomasa de drojdii izolate din biomasa de vin alb, imbogatite in calciu cu ajutorul drojdiei noi identificate *Candida sp.*, care are numar de depozit DBVPG 37P si care nu a fost adaptata la calciu pentru aceasta.

Solutia tehnica pe care o rezolva inventia consta in obtinerea unui produs pe baza de biomasa activa de drojdie *Candida sp.* DBVPG 37P, imbogatita in calciu pentru a fi folosit ca bio-fotificant in produsele derivate de panificatie si pentru a ajusta deficienta de calciu din organism, deficienta care poate provoca diferite boli in organism.

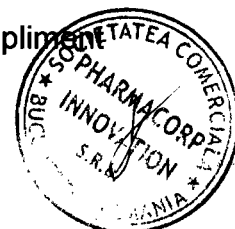
Produsul conform inventiei, este constituit din biomasa de drojdie imbogatita in calciu, iar procedeul de obtinere al biomasei, conform inventivei, contine urmatoarele faze:

- a) Obtinerea preinoculului de laborator
- b) Obtinerea inoculului 1 si /2
- c) Fermentatia propriu-zisa a mediului de cultura insamantat cu inoculul 1 si/2 care utilizeaza drept sursa de calciu pentru bioconversie, calciu lactat

Prin aplicarea inventiei se obtin urmatoarele avantaje:

Produsul obtinut utilizeaza o tulpina de drojdie izolata din vin alb si identificata ca noua, ca si *Candida sp.*, cu data de depozit ascension form DBVPG37P.

- 1) Produsul obtinut prezinta calciu in biomasa de drojdie
- 2) Produsul pe baza de biomasa de drojdie activa *Candida sp.*, cu data de depozit ascension form DBVPG37P. imbogatita in calciu poate fi folosita pentru obtinerea de produse derivate de panificatie si pentru suplimente alimentare.
- 3) Produsul pe baza de biomasa de drojdie imbogatita active *Candida sp.*, cu data de depozit ascension form DBVPG37P. in calciu poate fi adaugat ca bioingredient in panificatie;
- 4) Produsul pe baza de drojdie imbogatita in calciu utilizeaza tulpina *Candida sp.*, cu depozit ascension form DBVPG37P prezinta calciu asimilat in biomasa in concentratii de pana la 18.000 ppm. Asimilarea este influentata de modul de adaos al solutiei de lactat de calciu in timpul fermentatiei.
- 5) Produsul pe baza de drojdie imbogatita in calciu ar putea fi inactivat pentru a putea sa fie folosit in hrana animalelor sau ar putea fi utilizat ca supliment



- alimentar in concentratiile conform legislatiei in vigoare,
- 6) Produsul utilizeaza in timpul fermentatiei utilizeaza lactat de calciu care este folosit ca atare ca si stimulator de crestere al painii in industria de panificatie.
 - 7) Produsul fara adaos de calciu poate fi folosit ca sursa de vitamine sub forma activa sau inactiva
 - 8) Drojdia martor activa de *Candida sp*, cu deposit ascension form DBVPG37P fara calciu prezinta un miros placut, o culoare alb – bej, cu o viabilitate ridicata si ar putea fi folosita si ca drojdie inactiva ca sursa de proteina sau ca drojdie activa instant pentru produsele de panificatie
 - 9) Drojdia martor fara calciu *Candida sp*, cu deposit ascension form DBVPG37P ar putea fi obtinuta si in forma inactiva si ar prezenta avantajul utilizarii in hrana cainilor, pestilor ca sursa de proteina si vitamine;
 - 10) Bioingredientul martor pe baza de drojdie – prezinta un miros si culoare placuta si ar putea fi folosita atat in panificatie, produse derivate de panificatie cat si in vinificatie si cosmetica;
 - 11) Bioingredientul martor pe baza de drojdie – prezinta un miros si culoare placuta si ar putea fi folosita sub forma inactive in produse de vinificatie si cosmetica;

Exemplu 1

Se da in continuare un exemplu de obtinere a produsului pe baza de biomasa de drojdie activa *Candida sp*. DBVPG37P de imbogatita in calciu:

Obținerea de colonii izolate de drojzii *Candida sp*. DBVPG37P s-a realizat prin aplicarea tehnicii diluțiilor succesive; -diluatiile zecimale pe plăci petri pe MP agarizat media (malt extract, peptona de soia, agar agar);

Identificarea drojdiei noi – izolate –se ataseaza secventa nou identificata;

-Identificarea drojdiei ca, *Candida sp*. prin tehnica secventierii AND. Domeniile D1/D2 ale ADNr 26S in doua cazuri regiunile a ADNr ITS1 si ITS2, incluzand gena ARNr 5.8S a tulpinii au fost secventiate si s-a obtinut patent deposit form DBVPG37P.

-Obtinerea culturii de intretinere - *Candida sp*, cu deposit ascension form DBVPG37P dupa identificare a fost utilizata pentru obtinerea culturii stoc de intretinere;

Preinoculul (cultura statică) se prepară din cultura de întreținere a unei colonii de *Candida sp*, cu deposit ascension form DBVPG37P selectata anterior prin cultivarea



pe mediu YMSP-agar la temperatura de 28-30°C timp de 30-48 ore.

Mediul YMSP (yeast extract – malt extract) – agar (g/l)

- extract de drojdie5,0
- extract de malt20,0
- zahar/zaharoza.....20 g
- agar – agar25,0-30,0
- apă distilată1000 ml

-S-au repartizat 5-7 ml de mediu steril agarizat pe tub inclinat. S-au obtinut tuburi inclinate agarizate solide.

Fermentatia:

Au fost insamnatate tuburile inclinate cu cultura de drojdie identificata *Candida sp* DBVPG37P si s-au dezvoltat pentru 30-48 de ore la 30°C.

Prepararea inoculului de laborator la shaker 140-240 rpm

Preinoculul este apoi utilizat la prepararea **inoculului lichid** astfel: cultura *Candida sp*, cu deposit ascension form DBVPG37P dezvoltata un tub/2 tuburi înclinate a fost folosită la obținerea inoculului 150 ml mediu/flacon Erlenmayer 500 ml pe baza de zaharoza/zahar (6-7g %; extract de drojdie 0.5-07g %; peptone 0.3-0.5 g%) , care s-a incubat apoi la temperatura de 30°C timp de 15-22 ore cu agitare (170-240 rpm).

Intr-un fermentator 4l Vu (Vt = 6l), mediu de cultura ce contine g % (v/v): extract de drojdie 0.3...0.7, zahar initial (100-150 g/3.2 l initial), saruri de Mg²⁺, K⁺

-Solutia de calciu lactat 9 g % - 300 ml a fost adaugata in portii de cate 50 ml pe parcursul procesului in 5-6 portii cu **seringa de 50 ml** ce a utilizat filtre sterile de dimensiuni de 2.5µm.

-solutie de zaharoza adaugata in portii mari (100 g dizolvate in 300 ml apa si sterilizate la 105°C).

Reglarea pH-ului s-a reglat cand s-a atins valoarea 4.0, cu o solutie amoniacala 5 %.

Pe parcursul fermentatiei s-au urmarit parametrii tehnologici:

- Durata de cultivare: 14-16 h
- Temperatura: 28-30°C;
- pH pe parcursul cultivarii: 4-5.5;
- Rata de agitare: 200 rpm-550 rpm.

Separarea mediului fermentat

Cel mai simplu și rapid mod de a efectua separarea biomasei de drojdie de mediul de fermentație este centrifugarea, prin care se realizeaza separarea **celulelor de**



drojdie de mediul de cultură și de metaboliți.

O separare buna s-a realizat la 3000 - 4500 rpm timp de 10-15 minute, utilizand o centrifuga Sorvall (4 x 400 ml).

Spălarea biomasei

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

Uscarea prin liofilizare

- Uscarea drojdiilor s-a efectuat prin procesul de liofilizare;
- Acesta consta in doua operatii: inghetarea probelor in etape succesive si sublimarea ghetii cu ajutorul vidului inaintat;
- Drojdiile au fost turnate in cutii Petri;
- Liofilizarea s-a facut timp de 48 de ore, in mai multe etape;

Produsul conform invetiei, prezinta urmatoarele caracteristici:

S-a observat faptul ca, adaosul de calciu impreuna cu sursa de zahar, pe parcursul fermentatiei, duce la captarea calciului 8200-18000 mg/kg in biomasa de drojdie activa *Candida sp.* DBVPG37P

Proba	Proteina g/100	Bacterii Coliforme	Drojii	Muceg aiuri	Concentratia de calciu asimilat in biomasa	DCW (g %)
Biomasa activa de drojdie <i>Candida sp.</i> DBVPG37P de imbogatita in calciu	40-50	Sub10	0.5×10^5	Sub 10	8200-18000 mg/kg	07-1g%

Aspect: Pulbere de culoare bej deschis, cu miros placut de drojdie, cu mirs si aroma placuta nu ranceda.

A fost testata in paralel si proba martor.

EXEMPLU 2: Proba martor –fara adaos de calciu a fost folosita aceiasi tulpina 9 *Candida sp* cu numar de deposit DBVPG 37 P.

Cultura de intretinere - *Candida sp*, cu deposit ascension form DBVPG37P dupa identificare a fost utilizata pentru obtinerea culturii stoc de intretinere;

Preinoculul (cultura statică) se prepară din cultura de întreținere a unei colonii de *Candida sp*, cu deposit ascension form DBVPG37P selectata anterior prin cultivare



pe mediu YMSP-agar la temperatura de 28-30°C timp de 48 ore.

Mediul YMSP (yeast extract – malt extract) – agar (g/l)

- ❖ extract de drojdie5,0
- ❖ extract de malt20,0
- ❖ zahar.....20
- ❖ agar – agar25,0
- ❖ apă distilată1000 ml

S-au repartizat 5-7 ml de mediu steril agarizat pe tub inclinat. S-au obtinut tuburi inclinate agarizate solide. Au fost insamnatate tuburile inclinate cu cultura de drojdie identificata *Candida sp* DBVPG37P si s-au dezvoltat pentru 48 de ore la 30°C.(Barbulescu, 2016, A/00709/6.10.2016 cu titlul "Produs pe baza de biomasa de drojdii, imbogatita in calciu si fier si procedeu de obtinere").

Prepararea inoculului lichid de laborator la shaker 140-240 rpm – generatia 1:

Preinoculul este apoi utilizat la prepararea **inoculului lichid** astfel: cultura *Candida sp*, cu deposit ascension form DBVPG37P dezvoltata un tub/2 tuburi înclinate a fost folosită la obținerea inoculului 150 ml mediu/flacon erlenmayer 500 ml pe baza de zaharoza/zahar (6-7g %; extract de drojdie 0.5-07g %; peptone 0.3-0.5 g%) , care s-a incubat apoi la temperatura de 30°C timp de 15-22 ore cu agitare (170-240 rpm).

Bioproces fermentativ pentru obtinerea de biomasa de drojdie martor

Intr-un fermentator 4l Vu (Vt = 6l), mediu de cultura ce contine g % (v/v): extract de drojdie 0.3...0.7, zahar initial (100-150 g/3.2 l initial), saruri de Mg²⁺, K⁺.

-Se adauga solutie amoniacala 5 % si se pastreaza pH-ul in limita a 4.1-5.2.

-solutia de zaharoza/zahar se va adauga portii: 150 g dizolvata in 300 ml apa distilata sterilizata prin autoclavare.

Pe parcursul fermentatiei s-au urmarit parametrii tehnologici:

- Temperatura: 28-30°C;
- Rata de agitare: 200 rpm-550 rpm.

Fermentatia probei martor dureaza intre 14 si 22 h. S-a obtinut o biomasa uscata prin liofilizare de de drojdie activa de 1g%.

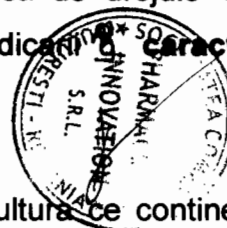
Aspect: Pulbere de culoare bej deschis, cu miros placut de drojdie, o aroma placuta, nu ranceda.

Proba	Bacterii	Drojdie	Mucegaiuri	DCW (g %)
Biomasa de drojdie <i>Candida sp</i> . DBVPG37P activa –martor	Sub10	3.4 x 10 ⁶	Sub 10	07-1g%



REVENDICARI

1. Produs pe baza de biomasa de drojdie activa *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in calciu **caracterizat prin aceea ca**, prin continutul mediu de calciu, nu prezinta risc pentru sanatate, deoarece utilizeaza in timpul fermentatiei calciu lactate;
2. Produs pe baza de biomasa de drojdie active de *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in calciu **caracterizat prin aceea ca** poate fi folosit pentru obtinerea unor suplimente alimentare care sa echilibreze deficitul de calciu din organism.
3. Produs de obtinere a unui produs pe baza de biomasa de drojdie active de *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in calciu din culturi de drojdii de *Canadida sp.*, **caracterizat prin aceea ca** este constituit din urmatoarele faze:
 - Prepararea culturii de intretinere a drojdiei *Candida sp.* DBVPG37P
 - Prepararea culturii inocul lichid 1 nivel de flacoane agitate, pornind de la cultura de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P
 - Prepararea bioprodusului pe baza de biomasa de drojdii *Candida sp.* DBVPG37P imbogate in calciu prin insamantarea mediului de fermentatie cu inocul lichid, separarea biomasei, purificarea prin spalari repetate cu apa distilata sterila si uscarea prin liofilizare obtinand un produs uscat active cu miros placut.
4. Procedeu de obtinere a unui produs de biomasa de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in calciu conform revendicarii **caracterizat prin aceea ca**, parcurge urmatoarele etape:
Fermentatia:
 - Intr-un fermentator 4l Vu (Vt = 6l), mediu de cultura ce contine g % (v/v): extract de drojdie 0.3...0.7, zahar initial (100-150 g/3.2 l initial), saruri de Mg²⁺, K⁺, inoculat cu cultura de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P, cu adaosuri pe parcurs a urmatoarelor solutii:
 - Solutia de calciu lactat 9 g % - 300 ml a fost adaugata cu steringa cu filtre sterile in 5-6 portii de cate 50 ml pe parcursul procesului in 5-6 portii;



- solutie de zaharoza (100g dizolvata in apa distilata prin agitare cu incalzire si apoi sterilizata la 105°C) adaugata cu pompa peristaltica in portii;
- Reglarea pH-ului s-a reglat pana la o anumita ora de cultivare a procesului cu o solutie amoniacala 5 % cand pH-ul ajunge la valoarea 4.0

Prelucarea mediului fermentat:

Separarea mediului fermentat

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

O separare buna s-a realizat la 3000 - 4500 rpm timp de 10-15 minute, utilizand o centrifuga Sorvall (4 x 400 ml).

Spălarea biomasei

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

Uscarea prin liofilizare

- Uscarea drojdiilor s-a efectuat prin procesul de liofilizare;
 - Acesta consta in doua operatii: inghetarea probelor in etape succesive si sublimarea ghetii cu ajutorul vidului inaintat;
 - Liofilizarea s-a facut timp de 48 de ore, in mai multe etape;
 - Obinerea de biomasa activa liofilizata de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P
 - Produs pe baza de biomasa de drojdie activa de *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in calciu **caracterizat prin aceea ca** poate fi folosit asimilat calciu intre 8200-18000 mg/kg ,concentratie celulara uscata de drojdie active de 1 g % si prezinta o aroma placuta.
5. Produs pe baza de biomasa activa de drojdie martor de *Candida sp.* DBVPG37P **caracterizat prin aceea ca**, nu prezinta risc pentru sanatate si se prezinta ca un produs uscat activ prin liofilizare cu proprietati senzoriale deosebite, cu miros si aroma placuta
6. Produs pe baza de biomasa activa de drojdie martor de *Candida sp.* DBVPG37P **caracterizat prin aceea ca** se obtine in concentratii in jur de DCW -1 g %.

