



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00600**

(22) Data de depozit: **29/08/2016**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. **6/2017**

(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 FA22, SC. A, AP. 5,
SLATINA, OT, RO;
• **MARINESCU SIMONA-IOANA**,
ȘOS. IANFULUI NR. 68, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **FRINCUI MIHAI**,
SAT POROSCHIA, COMUNA POROSCHIA,
TR, RO

(54) **BIOINGREDIENT PE BAZĂ DE BIOMASĂ
DE DROJDIE ADAPTATĂ, ÎMBOGĂȚITĂ ÎN CALCIU,
ȘI PROCEDU DE OBȚINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un bioingredient utilizat ca supliment alimentar, și la un procedeu pentru obținerea acesteia. Bioingredientul conform invenției este constituit din biomasă de drojdie din tulpini de drojdie izolate din must de vin, cunoscute, adaptate să capteze calciu în concentrații de 400...6000 mg/100 g și o concentrație de proteină mai mare de 40 g/100 g. Proceduul conform invenției constă în prepararea unei culturi

de întreținere de *Saccharomyces cerevisiae*, prepararea culturii inocul generația 1, din care este dezvoltată generația 2, după care se însămânțează mediul de fermentație, rezultând bioingredientul care se separă și se prelucrează.

Revendicări: 8



BIOIGREDIENT PE BAZA DE BIOMASA DE DROJDIE ADAPTATA, IMBOGATITA IN CALCIU SI PROCEDEU DE OBTINERE

Inventia se refera la obtinerea unui produs pe baza de biomasa de drojdie de adaptata la calciu si imbogatita in calciu, care nu prezinta risc pentru sanatate si care are capacitatea de a regla deficitul de calciu din organismul uman. Drojdiile sunt cunoscute pentru abilitatea lor de a capta diferite forme de minerale in structura lor. Sunt cunoscute cercetari actuale privind obtinerea pe baza de drojdii imbogatite in minerale (seleniu, crom, zinc), prin care acestea in timpul fermentatiei submerse sunt legate de proteinele din biomasa obtinuta.

Este cunoscut faptul privind obtinerea de biomasa de drojdie imbogatita in crom (Barbulescu D. si altii RO 123279B1), drojdiile adaptate au o capacitate marita de asimilare a metalelor in biomasa.

In prezent se cunosc procedee de obtinere de biomasa de drojdie cromiata, drojdie imbogatita in crom si seleniu care utilizeaza o tulpina de drojdie *Saccharomyces cereviae* adaptata la concentratii ridicate de crom (Barbulescu D. si altii RO 123279B1).

Este cunoscut procedeul de obtinere de biomasa de drojdie imbogatita in crom si seleniu (RO125079 B1).

Persoanele cu boala celiaca au o nevoie tot mai mare de calciu, comparativ cu populatia generala adulta. Adultii cu boala celiaca au nevoie de o doza de calciu între 1000 miligrame (mg) și 1500 mg în fiecare zi.

Obtinerea si utilizarea de biomase de drojdii imbogatite in forme organice de calciu prin intermediul unor procedee biotehnologice este avantajos in scopul eliminarii formelor anorganice si organice de sinteza chimica (calciu sulfat, calciu lactate, calciu propionat).

Pentru drojdiile cu calciu privind adaptarea la calciu, nu exista studii in pragul actual al cunoasterii.

Seleniul este singurul element mineral care inlocuieste sulful din structura metioninei, singurul care formeaza legatura covalenta, formand selenometionina. Este cunoscut faptul ca prezenta selenitului de sodiu adaugat in timpul fermentatiei cu drojdii adaptate la seleniu se capteaza in forma organica in concentratii ridicate in biomasa finala.

Cromul, spre deosebire de seleniu, formeaza legaturi coordinative precum

factorul GTF.

Biomasa de drojdii imbogatita cu calciu conform inventiei, elimina dezavantajul utilizarii produselor de sinteza, ca spre exemplu: pantotenat de calciu, propionat de calciu, sulfat de calciu, lactat de calciu.

Este cunoscuta inventia care se bazeaza pe utilizarea tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* ZGFH-66 CGMCC No.1116 utilizand-o pentru fermentarea berii in prezenta calciului in vederea obtinerii de biomasa de drojdie cu calciu (CN 200410032718 A).

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in obtinerea unui bioingredient pe baza de biomasa de drojdii izolate din must de vin, imbogatite in calciu cu ajutorul drojdiilor adaptate (4e) la diferite forme ce calciu organic (calciu lactat).

Solutia consta in obtinerea unui bioingredient pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in calciu pentru a fi folosit ca biofortificant si supliment alimentar pentru a ajusta deficienta de calciu din organism, deficienta care poate provoca diferite boli.

Pentru obtinerea bioingredientului este necesara adaptarea drojdiilor la lactat de calciu (4 e) in vederea izolarii lor pentru obtinerea unor culturi de drojdii adaptate la lactat de calciu.

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

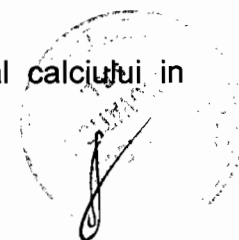
- a) Obtinerea preinoculului de laborator
- b) Obtinerea culturii adaptate
- c) Obtinerea inoculului de laborator
- d) Fermentatia propriu-zisa a mediului de cultura insamantat cu inoculul de laborator si care utilizeaza drept sursa de calciu pentru bioconversie, calciu lactat.

Prin aplicarea inventiei se obtin urmatoarele avantaje:

Bioingredientul obtinut utilizeaza o tulpina de drojdie izolata din must de vin si cunoscuta, dar adaptata la diferite forme de calciu. Un patern identic al tulpinii 4 e a fost identificat cu tulpina *S. cerevisiae* CBS 1171^T, ca si control (M.S. Cappello, G. Bleve, F. Grieco, 2004).

Pot fi utilizate si alte drojdii similare izolate din biomasa de must de vin.

- 1) Bioingredientul obtinut prezinta un grad ridicat de asimilare al calciului in



38
22

biomasa de drojdie (400 – 6000 mg/100g).

- 2) Bioingredientul pe baza de biomasa de drojdie cu calciu poate fi folosit pentru obtinerea de suplimente alimentare.
- 3) Bioingredientul pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in calciu poate fi adaugat ca bioingredient ca biofortificant si in suplimente alimentare.
- 4) Bioingredientul pe baza de drojdie imbogatita in calciu utilizeaza tulpini adaptate la calciu, care prezinta un grad ridicat de asimilare al calciului in biomasa finala.
- 5) Bioingredientul utilizeaza in timpul fermentatiei lactat de calciu care este folosit ca atare ca si stimulator de crestere al painii in industria de panificatie.
- 6) Tulpina adaptata a prezentat o eficienta crescuta privind asimilarea calciului si nu este modificata genetic comparativ cu cea martor in urma analizei REP-PCR.

Exemplu 1

Se da in continuare un exemplu de obtinere a bioingredientului pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in calciu.

Obtinerea culturii adaptate de calciu (4e):

Proba martor (4) si adaptata (4e) au fost testate prin analize de REP-PCR.

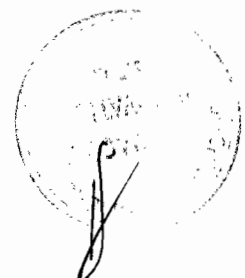
Probele Control 4, și cea adaptata la calciu - 4e au facut parte din același grup de testare (testare grupa 1) prin folosirea de primeri: BOX A1R, GTG5, Eric1, Eric2 și BOXA2R.

Obtinerea preinoculului de laborator

Preinoculul (cultura statică) se prepară din cultura de întreținere a unei colonii de *S.cerevisiae* selectata si adaptata anterior prin cultivarea pe mediu YMS-agar la temperatura de 28-30°C timp de 48 ore.

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

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



25
21

Prepararea inoculului de laborator – generatia 1:

Preinoculul este apoi utilizat la prepararea inoculului lichid astfel: cultura dintr-un tub/2tuburi înclinat este folosită la obținerea inoculului, care se incubează apoi la temperatura de 30°C timp de 15-22 ore cu agitare (150 240rpm) (inoculul YSP), pe baza de extract de drojdie si extract de malt si zahar alimentar.

Mediu inocul 2– YPS: Extract de drojdie;Peptona hy-soy; Sucroza; Apa distilata – 100 ml.

Intr-un fermentator 4l Vu (Vt = 6l), mediu de cultura ce contine g % (v/v): extract de drojdie 0.3...0.7, zahar alimentar initial (150 g/3.2 l initial), saruri de Mg²⁺, K⁺ si NH₄⁺. Solutia de calciu lactat 9 g % - 300 ml a fost adaugata in portii de cate 50 ml pe parcursul procesului; este insamantata cu drojdia adaptata cu inocul 1/2 dezvoltat anterior, la urmatoorii parametri tehnologici:

- ✓ Durata de cultivare: 12-20 h;
- ✓ Temperatura: 30°C;
- ✓ pH pe parcursul cultivarii: 4-5;
- ✓ Rata de agitare: 300 rpm-550 rpm.

Dupa separarea biomasei de drojdie imbogatita in calciu prin centrifugare la 4000 rpm timp de 10 min, aceasta s-a purificat prin spalari repetate pentru indepartarea reziduurilor metalice extracelulare neprocesate si apoi a fost supusa uscarii prin liofilizare.

Separarea mediului fermentat

Cel mai comod și rapid mod de a efectua separarea biomasei de drojdie de mediul de fermentație este aplicarea centrifugării, 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.

Liofilizare

- ✓ Uscarea drojdiilor s-a efectuat prin procesul de liofilizare;



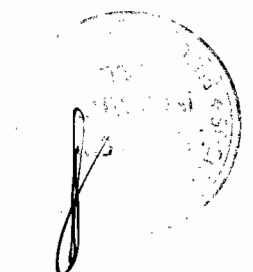
34
28

- ✓ 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;
- ✓ Atat temperatura de pe rafturile liofilizatorului cat si cea din proba este masurata de senzori de temperatura;
- ✓ S-a realizat o solutie de calciu care s-a adaugat pe parcursul cultivarii;
- ✓ Pe parcursul cultivarii s-a realizat corectia mediului de fermentatie cu o solutie bazica in vederea pastrarii pH-ului in intervalul 4.2-5.0.

Bioingredientul, conform invetiei, prezinta urmatoarele caracteristici:

S-a observat faptul ca, adaosul de calciu impreuna cu sursa de zahar, pe parcursul fermentatiei, duce la captarea a 400 – 6694 mg/100 g Ca total.

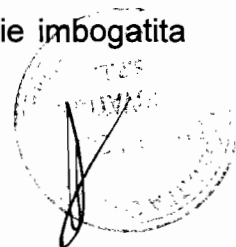
Proba	Determinare Calciu (mg/100g)	Proteina g/100	Pb (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Bacterii Coliforme	Drojdi	Mucegaiuri
Biomasa de drojdie – martor adaptat Martor 4e –fara adaos de calciu	43.12	48.89	0.0026	0.011	Sub10	5.5 x 10 ⁶	Sub 10
Biomasa de drojdie imbogatita in calciu Martor 4e cu adaos de calciu	400 – 6694 mg/100	50	0.0026	0.011	Sub 10	7.3 x 10 ⁶	Sub 10



BIOINGREDIENT PE BAZA DE BIOMASA DE DROJDIE ADAPTATA IMBOGATITA IN CALCIU SI PROCEDEU DE OBTINERE

REVENDICARI

1. Bioingredient pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in calciu **caracterizat prin aceea ca**, prin continutul moderat de calciu, nu prezinta risc pentru sanatate, deoarece utilizeaza lactat de calciu in timpul fermentatiei.
2. Bioingredient pe baza de biomasa de drojdie imbogatite in calciu **caracterizat prin aceea ca** utilizeaza tulpini adaptate de drojdii care au proprietatea de a capta calciu in concentratii de la 400- 6000 (mg/100g) si o concentratie de proteina mai mare de 40 g/100.
3. Bioingredient pe baza de biomasa de drojdie imbogatite in calciu **caracterizat prin aceea ca** metalele grele sunt limita maxima admisa si prin faptul ca este lipsit de contaminare.
4. Bioingredient pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in calciu **caracterizat prin aceea ca** poate fi folosit pentru obtinerea unor suplimente alimentare care sa echilibreze deficitul de calciu din organism.
5. Procedeu de obtinere a unui bioingredient pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in calciu din culturi de drojdii adaptate, **caracterizat prin aceea ca** este constituit din urmatoarele faze:
 - a) Prepararea culturii de intretinere a drojdiei (4) si adaptata treptat la diferite surse de calciu;
 - b) Adaptarea se poate realiza atat in tuburi cat si dupa o fermentatie in prezenta calciului (4e);
 - e) Prepararea culturii inocul generatia 1 la nivel de flacoane agitate, pornind de la cultura de drojdie adaptata la diferite saruri anorganice si organice de calciu;
 - f) Prepararea unui inocul lichid generatia 2 la nivel microfermentator dezvoltat din inocul 1 in anumite situatii;
 - g) Prepararea bioingredientului pe baza de biomasa de drojdii imbogatite in calciu prin insamantarea mediului de fermentatie cu inocul generatia 1 sau 2, separarea biomasei si prelucrarea acesteia.
6. Procedeu de obtinere a unui bioingredient de biomasa de drojdie imbogatita



in calciu conform revendicarii 5, **caracterizat prin aceea ca**, utilizeaza pentru bionconversia microbiana o solutie de lactat de calciu solutie 9% (300 ml)/ sarja, adaugata gradual impreuna cu solutii de zaharoza.

7. Procedeu de obtinere a unui bioingredient de biomasa de drojdie imbogatite in calciu conform revendicarii 5, **caracterizat prin aceea ca**, utilizeaza solutii de zaharoza in portii mici (60 g zahar alimentar dizolvat in 200 ml apa distilata si sterilizata) si portii mari (100 g de zahar alimentar dizolvat in 300 ml apa distilata si sterilizata), adaugate treptat in conditii aseptice.
8. Bioingredient pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in calciu **caracterizat prin aceea ca**, dupa analiza genetica REP-PCR, tulpina adaptata (4e) nu este modificata genetic fata de cea martor.

