



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2016 00764**

(22) Data de depozit: **27/10/2016**

(41) Data publicării cererii:
27/04/2018 BOPI nr. **4/2018**

(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

(54) **BIOINGREDIENT PE BAZĂ DE BIOMASĂ DE DROJDII
ÎMBOGĂȚITE ÎN FIER, ȘI PROCEDEU DE OBTINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un bioingredient pe bază de biomasă de drojdii îmbogățite în fier, utilizat în panificație. Procedeu, conform invenției, constă în prepararea culturii de întreținere a drojdiei *Candida sp. DBVPG37P*, prepararea culturii inocul lichid, însă-mânțarea mediului de fermentație cu inoculul lichid

utilizând o soluție 3% de pirofosfat feric, separarea biomasei, purificarea și uscarea prin liofilizare, rezultând un produs având un conținut mediu de fier de 950...1100 mg/kg.

Revendicări: 5



DESCRIERE

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI
Cerere de brevet de inventie
Nr. a 2016 00764
Data depozit 27-10-2016

BIOINGREDIENT PE BAZA DE BIOMASA DE DROJDII IMBOGATITE IN FIER SI PROCEDEU DE OBTINERE

Inventia se refera la obtinerea unui bioingredient pe baza de biomasa de drojdie nou identificata si cu numar de depozit *Candida sp.* DBVPG37P, imbogatita in fier pirofosfat.

Obtinerea si utilizarea de biomase de drojdii imbogatite in fier (fier pirofosfat), 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.

Este cunoscut faptul că drojdia îmbogățită cu fier fortificata branza proaspata a fost absorbita 72-82%, precum și absorbită sub formă de sulfat feros, indicând faptul că drojdia lizată în timpul digestiei și eliberat de fier sale. (Magalie Sabatier, ichard Hurrell, Mathias Hoppler, et al, Iron bioavailability from fresh cheese fortified with iron-enriched yeast, European Journal of Nutrition, pp 1–10).

Difosfat feric (pirofosfat feric) – se regaseste in regulamentul REGULAMENTUL (CE) NR. 1170/2009 AL COMISIEI din 30 noiembrie 2009 de modificare a Directivei 2002/46/CE.

Este cunoscut produsul "Lipofer", cu o structura de tip lipozomal, în care fierul este înglobat în fosfolipide de tipul lecitinei (lecitina vegetala nonalergenica).

Compozitie:lipofer; -Difosfat feric eq. 15 mg. fier. Acest produs contine pirofosfat de fier. Drojdiile de tipul *S.cerevisiae* pot fi utilizate ca supliment pentru hrană umană și animală. *Saccharomyces cerevisiae* a fost cultivată într-un bioreactor care utilizează drojdii suplimentate cu 497 mg feros sulfat L⁻¹, iar biomasa rezultată încorporează 8 Fe. g⁻¹ mg substanță uscată. Această biomasă a menținut puterea de fermentare cât și caracteristicile de panificație.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in obtinerea unui bioingredient pe baza de biomasa de drojdii izolate din biomasa de vin alb, imbogatite in fier cu ajutorul drojdiei noi identificate *Candida sp.* DBVPG37P.

Solutia tehnica pe care o rezolva inventia consta in obtinerea unui bioingredient pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in fier pentru a fi folosit ca biofortificant in produsele derivate de panificatie si in suplimente alimentare pentru a ajusta deficienta de fier si din organism, deficienta care poate provoca anemie, cancer, diabet. (I.D. BARBULESCU, S.I. MARINESCU et al, "Reducing Sugar in Food as an Option for Lowering the Risk of Diabetes, *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 21, No. 2, 2016).

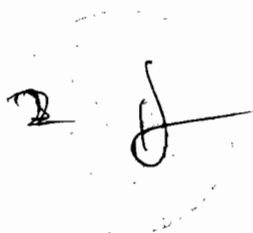
Bioingredientul conform inventiei, este constituit din biomasa de drojdie imbogatita in fier, iar procedeul de obtinere al biomasei, conform inventivei, contine urmatoarele faze:

- a) Obtinerea preinoculului de laborator
- b) Obtinerea inoculului lichid
- c) Fermentatia propriu-zisa a mediului de cultura insamantat cu inoculul lichid care utilizeaza drept sursa de fier, fier pirofosfat

Prin aplicarea inventiei se obtin urmatoarele avantaje:

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

- 1) Bioingredientul obtinut prezinta fier total determinat prin tehnica ICP-OES in biomasa de drojdie in concentratie de 950-1100 mg/kg;
- 2) Bioingredientul pe baza de biomasa de drojdie imbogatita in fier poate fi folosita pentru obtinerea de produse derivate de panificatie si pentru suplimente alimentare;
- 3) Bioingredientul utilizeaza in timpul fermentatiei utilizeaza solutie de 3 % fier pirofosfat, ingredient care se regaseste in regulamentul suplimentelor alimentare;
- 4) Bioingredientul martor pe baza de drojdie – prezinta un miros si culoare placuta si ar putea fi folosita si in vinificatie si cosmetic;
- 5) Bioingredientul final pe baza de bioamsa de drojdii imbogatite in fier nu prezinta miros farmaceutic ca spre exemplu seleniu, ci dimpotriva prezinta un miros placut;
- 6) Bioingredientul poate fi utilizat in pentru a echilibra deficitul de fier din organism, deoarece poate regal echilibrul mineral care poate duce la provocarea unor boli



(anemie, cancer).

- 7) Procedeu de obținere prezintă avantajul că durata de cultivare este mai mică comparativ cu alte procese.

Exemplu 1

Se da în continuare un exemplu de obținere a produsului pe baza de biomasă de drojdie îmbogățită în fier:

Obținerea de colonii izolate de drojdie s-a realizat prin aplicarea tehnicii diluțiilor succesive;

-diluții zecimale pe plăci petri pe MP agarizat media (malt extract, peptonă de soia, agar agar);

Identificarea drojdiei noi – izolate – atasăm secvența identificată

Identificarea drojdiei ca, *Candida sp.* prin tehnica secvențierii AND. Domeniile D1/D2 ale ADNr 26S în două cazuri regiunile a ADNr ITS1 și ITS2, incluzând gena ARNr 5.8S a tulpinii au fost secvențiate.

Cultura de întreținere - *Candida sp.*, cu deposit ascension form DBVPG37P după identificare a fost utilizată pentru obținerea culturii stoc de întreținere;

Preinoculul (cultura statică) se prepară din cultura de întreținere a unei colonii de *Candida sp.*, cu deposit ascension form DBVPG37P selectată anterior prin cultivarea 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 drojdie	5,0
❖ extract de malt	20,0
❖ zahar.....	20
❖ zaharoza.....	20 g
❖ agar – agar	25,0
❖ apă distilată	1000 ml

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

Au fost însemnate tuburile înclinate cu cultura de drojdie identificată *Candida sp* DBVPG37P și s-au dezvoltat pentru 48 de ore la 30°C. (Barbulescu, 2016).

Prepararea inoculului de laborator la shaker 140-240 rpm – generatia1:

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, care s-a incubat apoi la temperatura de 30°C timp de 15-22 ore cu agitare (170 rpm) (inoculul YSP), pe baza de extract de drojdie, peptona si zaharoza/zahar alimentar.

Bioproces fermentativ pentru obtinerea de biomasa de drojdie imbogatita in calciu si fier

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⁺

Prepararea solutie de fier pirofosfat- se dizolva sub agitare la rece in vas dublu cu gheata timp de o ora o solutie de 3% fier pirofosfat.

-Solutia de fier pirofosfat 3 g % a fost adaugata in portii a cate 10 ml pe parcursul fermentatiei; Se adauga cand pH –ul este corecatat cu o solutie amoniacala 5.5-6.0.

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

Reglarea pH-ului s-a reglat pana la o anumita ora de cultivare a procesului cu o solutie amoniacala 5 %.

Pe parcursul fermentatiei s-au urmarit parametrii tehnologici:

- ✓ Durata de cultivare: 10-14 h;
- ✓ Temperatura: 28-30°C;
- ✓ pH pe parcursul cultivarii: 4-6.2.;
- ✓ Rata de agitare: 300 rpm-550 rpm.

Durata (h)	pHA	SUA (g%)	pHB	SUB 9g%)	Fe pirofosfat (ml)	DCW g%	Fe total din biomasa(mg/kg)
0	6.9	7	6.9	7	0		
1	4.95	4.7	4.8	5.2	0		
7	5.95	4.5	5.96	5	0		
8	5.88		5.9	4.7	20		
9	5.25	3.5	4.8	4.5	40		
10	4.95	2.5	4.45	3.5	40		
	4.4	2.2	4.4	3	40		
Final	4.3	2	4.15	3	40	0.5-0.7	950-1100

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 realizează separarea celulelor de drojdie de mediul de cultură și de metaboliți.

O separare bună s-a realizat la 3500 - 4500 rpm timp de 10 minute, utilizând o centrifugă Sorvall (4 x 400 ml).

Spălarea biomasei

Pentru îndepărtarea mediului de cultură reținut între celulele de drojdie, precum și a sărurilor Fe rămase neprocesate, este necesară spălarea cu apă distilată a biomasei separate.

Liofilizare

- ✓ Uscarea drojdiilor s-a efectuat prin procesul de liofilizare;
- ✓ Drojdiile au fost turnate în cutii Petri;
- ✓ Liofilizarea s-a făcut timp de 48 de ore, în mai multe etape;

Bioingredientul conform invenției, prezintă următoarele caracteristici:

S-a observat faptul că, adaosul de calciu împreună cu sursa de zahăr, pe parcursul fermentației, duce la captarea fierului în biomasa de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P în concentrații între 950-1100 mg/kg analiză realizată prin ICP-OES.

A fost testată în paralel și proba martor.

BIOINGREDIENT PE BAZA DE BIOMASA DE DROJDII IMBOGATITE IN FIER SI PROCEDEU DE OBTINERE

REVENDICARI

1. Bioingredient pe baza de biomasa de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in fier **caracterizat prin aceea ca**, prin continutul mediu de fier, nu prezinta risc pentru sanatate, deoarece utilizeaza fier pirofosfat in timpul fermentatiei.
2. Bioingredient pe baza de biomasa de drojdie imbogatite in fier **caracterizat prin aceea ca** utilizeaza biomasa de drojdii *Candida sp.* DBVPG37P care au proprietatea de a capta fier concentratii de la 950-1100mg/kg prin ICP-OES.
3. Bioingredient pe baza de biomasa de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in fier **caracterizat prin aceea ca** poate fi folosit pentru obtinerea unor suplimente alimentare care sa echilibreze deficitul de fier din organism.
4. Procedeu de obtinere a unui bioingredient pe baza de biomasa de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in fier 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 nivel de flacoane agitate, pornind de la cultura de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P
 - Prepararea bioingredientului pe baza de biomasa de drojdii *Candida sp.* DBVPG37P imbogatite in fier 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.
5. Procedeu de obtinere a unui bioingredient de biomasa de drojdie *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in fier conform revendicarii 5, **caracterizat prin aceea ca**, utilizeaza pentru bionconversia microbiana o solutie de pirofosfat feric solutie 3% (40-45ml)/ sarja, adaugata gradual impreuna cu solutii sterile de zaharoza/zahar alimentar (150g/300ml).

