



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00783

(22) Data de depozit: 02/11/2016

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI
PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• ROVINARU CAMELIA,
CALEA FERENTARI NR.3, BL.75, ET.7,
AP.29, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• PASARIN DIANA GEORGIANA,
ALEEA MASA TĂCERII, BL. B, ET. 1,
AP. 18, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE ADAPTARE A DROJDIEI KLUYVEROMYCES
MARXIANUS PENTRU CREȘTEREA RANDAMENTULUI
DE OBȚINERE DE BIOMASĂ**

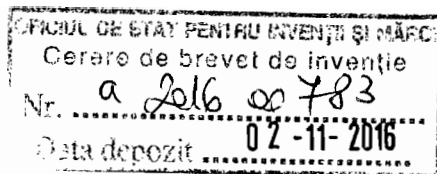
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de recuperare a unei biomase din zerul rezultat de la fabricarea brânzeturilor, utilizată ca aditiv furajer cu efect imunomodulator. Procedeu conform invenției constă în adaptarea tulpinii de drojdie Kluyveromyces marxianus NRRLY1195, prin cultivarea succesivă, în condiții de aerobioză, pe medii de cultură de tip permeat de zer acid îmbogățit cu două surse de azot și o sursă de potasiu, extract de drojdie 0,2...0,5%, în 20 de pasaje seriale, reprezentând inocul pentru următorul mediu, de permeat de zer acid

îmbogățit cu două surse de azot și o sursă de potasiu în concentrații duble, extract de drojdie 0,4...0,10% în 30 de pasaje seriale, reprezentând inocul pentru următorul mediu, de zer acid hidrolizat, îmbogățit cu o sursă de potasiu, în 30 de pasaje seriale pentru multiplicarea drojdiei cu acumulare de biomasă care se recoltează după perioada de fermentație, și se usucă prin liofilizare.

Revendicări: 1





30

PROCEDEU DE ADAPTARE A DROJDIEI *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* PENTRU CRESTEREA RANDAMENTULUI DE OBTINERE DE BIOMASA

Prezenta invenție se referă la biomasa de drojdie neconventională *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 1195 și la un procedeu de adaptare a acesteia prin cultivarea pe un substrat de zer acid hidrolizat îmbogățit cu săruri minerale și prin modificarea parametrilor tehnologici în scopul consumării integrale a lactozei din compoziția zerului. Problema pe care o rezolvă constă în valorificarea unui produs secundar de la fabricarea branzeturilor prin bioconversie în produse cu valoare adăugată.

Problema pe care o rezolvă constă în valorificarea unui produs secundar de la fabricarea branzeturilor prin bioconversie în produse cu valoare adăugată. Biomasa levuriana recuperată este o sursă valoroasă de proteine, care poate înlocui proteina vegetală și animală, și poate fi utilizată ca aditiv furajer cu efect imunomodulator datorat prezenței beta glucanilor în peretele celular.

Kluyveromyces marxianus are număr de depozit NRRL Y 1195, este depozitată în colecția de culturi de la ARS Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL și are capacitatea de a asimila lactoza, sursa de carbon, datorită prezenței enzimei β – galactozidază.

Alegerea mediului de cultură pentru cultivarea drojdiilor reprezintă o etapă cheie, deoarece poate influența aspectele economice ale procesului de producție. De regulă, ca sursă de carbon, azot și fosfor necesare pentru multiplicarea celulelor de drojdie, se apelează la ingrediente ieftine, ca de exemplu hidrolizatele vegetale și unele subproduse ale industriei alimentare (melasă, zeruri etc) (Prescott și colab., Microbiology. WCB Publishers, 1996).

În contextul actualei crize mondiale a resurselor materiale și energetice, care afectează puternic industria alimentară, valorificarea produselor secundare din această industrie, ca materii prime pentru obținerea de substanțe utile, se impune ca o strategie prioritara.

Zerul este fracțiunea lichidă, care se separă în urma precipitării și înlăturării caseinei din lapte, în timpul fabricării branzeturilor. Reprezintă 90-95% din volumul laptelui prelucrat și conține cca. 55% din substanța uscată a laptelui. Ca regulă generală, pentru obținerea unui kg de brânză se generează în jur de 9 L de zer. Din peste 10 milioane tone de branzeturi fabricate la nivel mondial, rezultă circa 8,5 milioane tone de zer. (Spalatel C, 2012).

Aproape jumătate din producția de zer nu este tratată și este deversată ca efluent. Datorită volumului mare și încărcăturii organice datorată prezenței lactozei (consumul de oxigen biologic –BOD- de 30-50g/L și de oxigen chimic –COD- de 60-80g/L, față de limita de 0,7 g/L a unităților menajere) deversarea lui în mediul înconjurător ridică mari probleme de



1

poluare (modifică structura fizică și chimică a solului), crescând presiunea asupra producătorilor, prin înăsprirea legislației privind evacuarea efluenților reziduali (Spalatel C, 2012).

Zerul poate fi utilizat ca substrat în obținerea drojdiilor, importante surse de proteine (care pot înlocui proteina vegetală și animală), enzime și vitamine cu aplicații în industria alimentară ca suplimente nutritive, aditivi alimentari, aromatizanti, sau aditivi furajeri. Prin asimilarea compusilor organici din zer se reduce conținutul de substanțe dizolvate, încât prin separarea mecanică a biomasei proteice brute aceasta poate fi valorificată în alimentație și furajare, iar lichidul rezultat poate fi deversat în receptorii naturali fără implicații ecologice (Stroia C, 2008, Stroia C, 2008 – Valorificarea pe cale biotehnologică a zerului, *Sesiunea cercurilor științifice studentesti*, Galați)

Zerul, ca substrat de cultură, prezintă următoarele avantaje:

- este accesibil în cantități mari datorită producerii continue de produse lactate
- este ușor asimilabil de drojdiile care pot metaboliza lactoza (sursă de carbon și energie), transformând-o, prin respirație, în CO_2 și H_2O , iar energia eliberată favorizează creșterea și înmulțirea celulelor cu acumulare de biomasă
- are preț de cost scăzut

Kluyveromyces marxianus se numără printre microorganismele considerate GRAS (generally regarded as safe) și este folosită pe scară industrială pentru producerea de biomasă din zer. Această tulpină prezintă următoarele avantaje (Bekatorou Argyro, 2006, Production of Food Grade Yeasts, *Food Grade Yeasts, Food Technol. Biotechnol.*, 44 (3), 407–415):

- are cea mai mare rată de creștere dintre toate microorganismele eucariote, timp de dublare ~ 70 minute
- prezintă termotoleranță (poate crește până la temperatura de 52°C)
- are capacitate de a asimila o gamă largă de zaharuri, în special lactoza și inulina
- secreta enzime litice
- are predominant metabolism oxidativ care permite generarea de biomasă cu randament mare

Se știe că la această tulpină de drojdie, în timpul pasajelor de la cultura stoc până la cultivarea pe diferite medii, apar rapid mutații spontane, care contribuie la o mare capacitate de adaptare și la o rată de dezvoltare înaltă.

În prezent, se cunosc procedee de adaptare a drojdiilor la medii cu compoziții chimice diferite, utilizând substraturi de sinteză sau naturale, ieftine, pentru obținerea de produse utile.



Este cunoscut un procedeu de obtinere de drojdie cromiata prin adaptarea tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* la niveluri variate de concentratii de clorura cromica (RO123279B1/2011). Tulpina adaptata in prealabil la concentratii mai mari de 15000 ppm clorura cromica, a fost cultivata submers in mediu de cultura care contine glucoza, extract de drojdie, clorura cromica si saruri minerale pentru obtinerea unui bioproduct de drojdie cromiata.

Brevetul WO2011/140649A1 prezinta o co-cultura de drojdii si bacterii (*Kluyveromyces marxianus* 150709-01, *Saccharomyces unisporus* 150709-02 *Lactobacillus fermentum* 150709-03) adaptata sa creasca in simbioza pe un substrat pe baza de carbohidrati simpli (zer de la obtinerea branzei proaspete, zer deshidratat, permeat de zer, permeat delactozat), suplimentat cu sursa de azot reprezentata de saruri de amoniac/uree, pentru obtinerea unei biomase destinate uzului uman si veterinar.

Dezavantajul suplimentarii permeatului de zer cu doua surse de azot necesare fermentatiei consta in faptul ca azotul amoniacal este asimilat mai lent decat azotul din aminoacizi. Pe de alta parte, prezenta sulfatului de amoniu in mediu duce la scaderea pH-ului, deoarece drojdia asimileaza NH_3 si elibereaza H_2SO_4 , care scade pH-ul.

Tulpina de *Kluyveromyces marxianus* NRRLY 1195 este adaptata, conform inventiei, la un mediu minimal de baza care contine o sursa unica de azot provenit din aminoacizii din zer. Se elimina necesitatea imbogatirii zerului cu surse de azot care, alaturi de sursa de carbon, sunt indispensabile cresterii si dezvoltarii unui microorganism.

Tulpina de drojdie *Kluyveromyces marxianus* NRRLY 1195 folosita pentru adaptare a fost pastrata pe mediu ATCC agarizat, la temperatura de 4°C . S-a urmarit adaptarea tulpinii pe un substrat ieftin, minim prelucrat, care, datorita prezentei peptidelor si a aminoacizilor liberi in compozitie si, in prezenta unui adaos redus de saruri minerale, sa permita consumul activ al lactozei, cu acumulare de biomasa, cu randament crescut. Importanta cantitatii si calitatii azotului influenteaza metabolismul lactozei si capacitatea fermentativa a tulpinilor de drojdii (Pintado ME, 1999, J.Diary Science, 82, 2315)

Pentru adaptarea naturala specifica, cresterea tulpinii s-a realizat in pasaje seriale, prin cultivarea, de-a lungul mai multor generatii, pe diferite medii de cultura pe baza de zer si prin modificarea parametrilor de crestere (temperatura, pH, rpm), in scopul obtinerii unei tulpini viguroase, eficienta din punct de vedere tehnologic si economic, care sa asigure exprimarea caracteristicilor specifice

Procedeu, conform inventiei, este urmatorul:

1. Activarea inoculului prelevat dintr-o cultura pura stoc de *Kluyveromyces marxianus* NRRLY 1195 de pe un mediu inclinat, prin cultivarea lui pe mediu



sintetic ATCC 200 lichid, in conditii aseptice, si incubare in termostat, in conditii de aerobioza, la 28°C, 150 rpm, 24 ore. Prelevarea de inocul pentru etapa urmatoare.

- inocularea a 5%...10% suspensie, cu o concentratie de 10^6 ... 10^7 celule/mL, pe un substrat de permeat de zer cu adaos de extract de drojdie 0,2...0,5%, la temperatura de 30°C-35°C, pH=4-5, agitare 100-250 rpm, timp 24-72 ore in vederea pregatirii echipamentului enzimatic în funcție de condițiile de mediu și de nutriții disponibili. Prelevarea de inocul aflat in faza lag de dezvoltare pentru etapa urmatoare.
- inocularea si multiplicarea drojdiei pe mediu de permeat de zer acid lichid, imbogatit cu concentratii crescatoare de solutii de saruri minerale si surse de azot, de-a lungul mai multor generatii (pasaje). Prelevarea de inocul aflat in faza lag de dezvoltare pentru etapa urmatoare.
- inocularea si multiplicarea drojdiei pe mediu de zer acid hidrolizat imbogatit cu sursa de potasiu, de-a lungul mai multor generatii (pasaje), in vederea obtinerii unei tulpini de drojdie viguroasa, cu capacitate ridicata de multiplicare.
- fermentatia pentru toate pasajele se realizeaza in sistem submers, in baloane de sticla continand mediul de cultura si 5%...10% v/v inocul, in sistem batch, la temperatura de 30°C-35°C, pH=4-5, agitare 100-250 rpm, timp 24-72 ore.
- inocularea si multiplicarea tulpinii de drojdie adaptata enzimatic (prin cultivarea succesiva pe mediile mentionate) pe mediu minimal de crestere adaptativ reprezentat prin zer acid hidrolizat suplimentat cu sursa de potasiu, la valori ale parametrilor tehnologici care asigura acumularea optima de biomasa
- evaluarea adaptarii drojdiei determinand cantitatea de biomasa exprimata in g s.u./volum cultura prin masurarea OD la 640 nm, la interval de cateva ore si realizarea curbei de crestere
- separarea biomasei levuriene prin centrifugare, spalarea cu apa distilata si uscarea ei prin liofilizare

Elementele de noutate in obtinerea biomasei levuriene sunt:

- succesiunea etapelor de cultivare, desfasurate in pasaje seriale, intr-o anumita ordine, pornind de la materia prima, pe diferite medii de cultura pe baza de zer si anumiți parametri tehnologici, in care biomasa rezultata dintr-o etapa este folosita ca inocul in etapa urmatoare



[Handwritten signature]

- prepararea unui mediu de cultura adaptativ minimal, cu o compozitie chimica in care sursa de azot este usor accesibila si asimilabila, furnizata prin hidroliza proteica a zerului
- obtinerea unor cantitati mari de biomasa prin adaptarea drojdiei prin aplicarea de metode culturale specifice

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta intr-un procedeu de acumulare de biomasa proteica de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 1195, adaptata enzimatic la zerul acid hidrolizat, substrat minimal ieftin, pentru a metaboliza eficient lactoza, crescand valoarea adaugata a zerului.

Comparativ cu brevetele citate, activitatea inventiva se refera la elementele caracteristice noi care conduc la rezolvarea problemei tehnice.

Prin aplicarea procedeuului conform inventiei se obtin urmatoarele avantaje:

- valorificarea unui produs secundar de la fabricarea branzeturilor (zer) prin bioconversie in produse cu valoare adaugata
- materie prima cu cost de achizitie scazut, ceea ce duce la obtinerea unui produs cu valoare adaugata, cu pret convenabil
- bioproces simplu si eficient
- obtinerea unui inocul viguros de drojdie, cu capacitate mare de multiplicare intr-o perioada scurta de timp, pe un mediu ieftin
- acumularea de biomasa este stimulata prin metode culturale, prin adaptarea metabolismului în funcție de nutrienții disponibili in mediu si parametri de crestere
- biomasa levuriana recuperata este o sursa valoroasa de proteine, care poate inlocui proteina vegetala si animala, si poate fi utilizata ca aditiv furajer cu efect imunomodulator datorat prezentei beta glucanilor in peretii celulari
- reducerea consumului de materii prime (extract de drojdie, saruri minerale) necesare prepararii substratului adecvat dezvoltarii drojdiei
- procedeu cu impact ecologic, utilizarea acestui produs secundar industrial diminuind deversarea lui ca efluent in mediul inconjurator si, implicit pericolul poluarii

Se da in continuare un exemplu de realizare a inventiei:

Caracterizarea morfo-fiziologica si biochimica a tulpinii

Organizare celulara este de tip eucariot. Celulele tulpinii *Kluyveromyces marxianus* se prezinta sub forma sferica sau ovala, individuale sau cu 1-2 muguri apicali sau laterali, si au dimensiuni cuprinse intre 2 – 6,5×3,8 – 8 μm. Peretele celular este constituit din polizaharide



cu structuri ramificate, cele mai importante fiind β -glucani (polimeri de unitati de D-glucoza) si α - manan (polimer al D-manozei), enzime glicoproteice (invertaza, fosfataza acida, hidrolaze), lipide cu rol arhitectural (mono, di si trigliceride), acizi grasi liberi, fosfolipide si chitina (polimer β (1-4) de N-acetil glucozamina). Plasmalema (membrana trilamelara) este puternic cutata si delimiteaza continutul celular in care se gasesc constituentii protoplasmatici (Lazar V, 2004, *Microbiologie generala*, Editura Universitatii din Bucuresti, p. 176-180; Dumitru, IF, 2002, Drojdii, Biotehnologii clasice si moderne, *Ars Docendi*, Bucuresti).

Tulpina, cultivata pe mediu solid, se caracterizeaza prin colonii netede, a caror consistenta este de pasta groasa, diametrul cuprins intre 3-4mm, cu un contur circular, cu aspect cremos, neted, mat, de culoare alb-crem. Pe medii lichide dezvoltata sediment, alcatuit din celule individuale sau microcolonii rezultate prin asocierea intima a celulelor apartinand la diferite generatii. Formeaza inel la suprafata mediului, spumeaza si tulbura uniform mediul. Se cultiva usor pe mediile naturale si artificiale ce contin zaharuri ca sursa de carbon si energie; fermenteaza glucoza, galactoză, zaharoză (rareori), lactoză, rafinoză (rareori) si rareori (usor) maltoza si trehaloză. Asimileaza compusii de carbon din glucoza, galactoză, L – sorboza, zaharoză, maltoza, celobioza, trehaloză, lactoză, etanol, glicerol, ribitol, D – manitol, D – glucitol, rafinoza (rareori), meleziatoza, inulina, D – xiloza, α - metil – D – glucozida, acidul DL – lactic, acidul succinic. Temperatura de dezvoltare este cuprinsa intre 12-47⁰C, optimul termic fiind cuprins intre 25-30⁰C. Prefera un pH acid cuprins intre 4,5-6,5

Reactivarea inoculului de drojdie *Kluyveromyces marxianus* NRRLY 1195

Celulele de drojdii se reactiveaza prin inoculare de pe mediul ATCC 200 solid (extract de drojdie 0,3%; extract de malt 0,3%; glucoza 1%; peptona 0,5%; agar 2%, apa distilata pana la 100 mL) in mediu ATCC 200 lichid (extract de drojdie 0,3%; extract de malt 0,3%; glucoza 1%; peptona 0,5%; apa distilata pana la 100 mL), in conditii aseptice, si incubare in termostat la 28⁰C, 150 rpm, pentru 24 ore, in conditii de aerobioza.

Initierea multiplicarii drojdiei

Se initiaza cresterea culturii de drojdie in baloane Erlenmeyer de 300...500 mL, continand 50...100 mL de permeat de zer acid imbogatit cu extract de drojdie 0,2%...0,5%, in care se introduc 5%...10% inocul reactivat cu o concentratie de 10⁷ celule/mL. Se incubeaza intr-un aparat de agitare-termostatare UNIMAX 1010 pentru 24 ore, la 150 rpm si la temperatura de 28⁰C, in conditii de aerobioza. Se realizeaza 10 pasaje seriale. Se preleveaza inocul pentru primul mediu adaptativ.



Adaptarea drojdiei si obtinerea de biomasa

Procedeul de adaptare naturala specifica a tulpinii de drojdie cu acumulare de biomasa cuprinde cultivarea succesiva pe medii de cultura adaptative, in conditii de aerobioza, cultura aflata in faza exponentiala de crestere dezvoltata pe primul mediu de cultura constituie inocul pentru mediul urmator. Mediile adaptative sunt urmatoarele:

- Permeat de zer acid imbogatit cu doua surse de azot si o sursa de potasiu: extract de drojdie 0,2...0,5%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1...0,2%; KH_2PO_4 0,05...0,1%. Mediu de cultura pentru multiplicarea drojdiei; 20 pasaje seriale; inocul pentru mediul 2
- Permeat de zer acid imbogatit cu doua surse de azot si o sursa de potasiu in concentratii duble: extract de drojdie 0,4...0,10%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2...0,4%; KH_2PO_4 0,1...0,2%. Mediu de cultura pentru multiplicarea drojdiei; 30 pasaje seriale; inocul pentru mediul 3
- Zer acid hidrolizat imbogatit cu sursa de potasiu: KH_2PO_4 0,2...0,4%; 30 pasaje seriale; Mediu de cultura pentru multiplicarea drojdiei cu acumulare de biomasa

Fermentatia se realizeaza in sistem submers, in baloane Erlenmeyer continand 300.....500 mL mediu de cultura si 5%.....10% v/v inocul, modul de operare fiind sistemul batch. Conditiiile de fermentare: temperatura 30....35⁰C, pH 4...5, agitare 100....250 rpm, timp 24....72 ore. Pe masura ce se adapteaza, aspectul celulelor de drojdie se schimba, capatand o forma oblonga. La sfarsitul perioadei de fermentatie, biomasa de drojdie se recolteaza prin centrifugarea culturii la 9000 rpm, 20 minute, se spala cu apa distilata si se centrifugheaza repetat, pana la decolorarea supernatantului, apoi se usuca prin liofilizare.

In prezenta oxigenului, cultura creste mai repede, iar procesul de adaptare se imbunatateste.

Tulpina de drojdie *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 1195 adaptata enzimatic prin metode culturale si prin modificari ale parametrilor de crestere si tulpina *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 1195 parentala s-au inoculat in mediu de cultura adaptativ pe baza de zer acid hidrolizat, in vederea stabilirii, comparativ, a capacitatii de formare a biomasei. Cantitatea de biomasa a fost evaluata in functie de procentul de s.u. obtinut si de consumul lactozei din zer. Rezultatele se prezinta in tabelul 1.



Tabel 1 Parametri de cultura pentru obtinerea de biomasa de drojdii lactice pe zer acid hidrolizat

Tulpini de drojdii	Temp. (°C)	pH	Agitare (rpm)	Marime inocul (%)	Cantitate lactoza % metabolizata dupa 24 ore	s.u (%)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y 1195 parentala	30	5	150	10	45	11,20
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y 1195 adaptata enzimatic prin metode culturale specifice	30	5	150	10	100	19,87

Cantitatea initiala de lactoza (4,25%w/w) a fost metabolizata diferit de catre cele doua drojdii, in 24 de ore. Din tabel reiese ca tulpina *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 1195 adaptata enzimatic prin metode culturale are capacitate de multiplicare ridicata cu acumulare de biomasa, comparativ cu tulpina parentala.

Biomasa levuriana recuperata este o sursa valoroasa de proteine, care poate inlocui proteina vegetala si animala, si poate fi utilizata ca aditiv furajer cu efect imunomodulator datorat prezentei beta glucanilor in peretii celulari.



**PROCEDEU DE ADAPTARE A DROJDIEI *Kluyveromyces marxianus* NRRLY1195
PENTRU CRESTEREA RANDAMENTULUI DE OBTINERE DE BIOMASA**

Revendicare

1. Un procedeu de adaptare a tulpinii de drojdie *Kluyveromyces marxianus* NRRLY1195 la un mediu adaptativ de zer hidrolizat, caracterizat prin aceea ca parcurge urmatoarelor etape:

a. reactivarea inoculului prelevat dintr-o cultura pura stoc de *Kluyveromyces marxianus* NRRLY 1195 de pe un mediu inclinat, prin cultivarea lui pe mediu sintetic ATCC 200 lichid, in conditii aseptice, si incubare in termostat, in conditii de aerobioza, la 28⁰C, 150 rpm, 24 ore

b. prelevarea de inocul din aceasta suspensie si inocularea a 5%...10% suspensie, cu o concentratie de 10⁶...10⁷ celule/mL, pe un substrat de permeat de zer cu adaos de extract de drojdie 0,2...0,5%, la temperatura de 30⁰-35⁰C, pH=4-5, agitare 100-250 rpm, timp 24-72 ore in vederea pregatirii echipamentului enzimatic in functie de conditiile de mediu si de nutritiei disponibili; 10 pasaje seriale. Prelevarea de inocul aflat in faza lag de dezvoltare pentru primul mediu adaptativ.

c. insamantarea inoculului din etapa b) pe mediu de permeat de zer acid imbogatit cu doua surse de azot si o sursa de potasiu: extract de drojdie 0,2...0,5%; (NH₄)₂SO₄ 0,1...0,2%; KH₂PO₄ 0,05...0,1%. Mediu de cultura pentru multiplicarea drojdiei; 20 pasaje seriale; inocul pentru mediul 2 adaptativ

d. insamantarea inoculului din etapa c) pe mediu de permeat de zer acid imbogatit cu doua surse de azot si o sursa de potasiu in concentratii duble: extract de drojdie 0,4...0,10%; (NH₄)₂SO₄ 0,2...0,4%; KH₂PO₄ 0,1...0,2%. Mediu de cultura pentru multiplicarea drojdiei; 30 pasaje seriale; inocul pentru mediul 3 adaptativ

e. insamantarea inoculului din etapa d) pe mediu de zer acid hidrolizat imbogatit cu sursa de potasiu: KH₂PO₄ 0,2...0,4%; 30 pasaje seriale; Mediu de cultura pentru multiplicarea drojdiei cu acumulare de biomasa

f. separarea biomasei obtinute in etapa e) prin centrifugarea culturii la 9000 rpm, 20 minute, spalarea cu apa distilata si centrifugarea repetata, pana la decolorarea supernatantului, apoi usucarea prin liofilizare

g. fermentatia se realizeaza in sistem submers, in baloane Erlenmeyer continand 300.....500 mL mediu de cultura si 5%.....10% v/v inocul, modul de operare fiind sistemul batch.

h. conditiile de fermentare: temperatura 30....35⁰C, pH 4...5, agitare 100....250 rpm, timp

