



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00783**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2021** BOPI nr. **12/2021**

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

(73) Titular:
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**C. ROVINARU, D. PĂSĂRIN ȘI M. DESLIU,
"ADAPTATION OF A
NON-CONVENTIONAL YEAST STRAIN
WHICH METABOLISE LACTOSE BY
ESTABLISHMENT OF CULTURE MEDIA
COMPOSITION BASED ON WHEY",
PROCEEDINGS OF THE CONFERENCE
AGRI-FOOD SCIENCES, PROCESSES
AND TECHNOLOGIES AGRI-FOOD XXV,
SIBIU, ROMÂNIA,
PP. 26-34, 2015; WO 2011/140649 A1**

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



RO 132585 B1

1 Prezența invenției se referă la un procedeu de adaptare a biomasei de drojdie neconvențională *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 1195 prin cultivarea pe un substrat de zer acid
3 hidrolizat îmbogățit cu săruri minerale și prin modificarea parametrilor tehnologici în scopul consumării integrale a lactozei din compoziția zerului.

5 Problema pe care o rezolvă constă în valorificarea unui produs secundar de la fabricarea brânzeturilor prin bioconversie în produse cu valoare adăugată. Biomasa levuriană
7 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
9 glucanilor în pereții celulari.

11 *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
13 Research, Peoria, IL și are capacitatea de a asimila lactoza, sursa de carbon, datorită prezenței enzimei β -galactozidaza.

15 Alegerea mediului de cultură pentru cultivarea drojdiilor reprezintă o etapă cheie, deoarece poate influența aspectele economice ale procesului de producție. De regulă, ca
17 sursa 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
19 industriei alimentare (melasă, zeruri etc) (**Prescott și colab., Microbiology. WCB Publishers, 1996**).

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

25 Zerul este fracțiunea lichidă, care se separă în urma precipitării și înlăturării caseinei din lapte, în timpul fabricării brânzeturilor. Reprezintă 90-95% din volumul laptelui prelucrat
27 și conține circa 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 brânzetur
29 fabricate la nivel mondial, rezultă circa 8,5 milioane tone de zer. (Spalatelu C., 2012).

31 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
33 oxigen biologic -BOD- de 30-50g/L și de oxigen chimic -COD- de 60-80 g/L, față de limita 0,3 g/L a unei ape menajere) deversarea lui în mediul înconjurător ridică mari probleme de
35 poluare (modifică structura fizică și chimică a solului), crescând presiunea asupra producătorilor, prin înăsprirea legislației privind evacuarea efluenților reziduali (**Spălățelu C., 2012**).

37 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
39 alimentară ca suplimente nutritive, aditivi alimentari, aromatizanți, sau aditivi furajeri. Prin asimilarea compușilor organici din zer se reduce conținutul de substanțe dizolvate, încât prin
41 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 studențești, Galați**).

Zerul, ca substrat de cultură, prezintă următoarele avantaje:

43 - este accesibil în cantități mari datorită producerii continue de produse lactate este ușor asimilabil de drojdiile care pot metaboliza lactoza (sursa de carbon și energie),
45 transformând-o, prin respirație, în CO₂ și H₂O, iar energia eliberată favorizează creșterea și înmulțirea celulelor cu acumulare de biomasa;

47 - are preț de cost scăzut.

RO 132585 B1

<i>Kluyveromyces marxianus</i> 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):	1 3 5
- are cea mai mare rată de creștere dintre toate microorganismele eucariote, timp de dublare ~ 70 min;	7
- prezintă termotoleranță (poate crește până la temperatura de 52°C);	
- are capacitate de a asimila o gamă largă de zaharuri, în special lactoză și inulină;	9
- secretă enzime litice;	
- are predominant metabolism oxidativ care permite generarea de biomasă cu randament mare.	11
Se știe că la această tulpina 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.	13 15
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.	17
Este cunoscut un procedeu de obținere de drojdie cromiată prin adaptarea tulpinii <i>Saccharomyces cerevisiae</i> la niveluri variate de concentrații de clorură cromică (RO 123279B1/2011). Tulpina adaptată în prealabil la concentrații mai mari de 15000 ppm clorura cromică, a fost cultivată submers în mediu de cultură care conține glucoză, extract de drojdie, clorura cromică și săruri minerale pentru obținerea unui bioprodus de drojdie cromiată.	19 21 23
Brevetul WO 2011/140649 A1 prezintă o co-cultură de drojdii și bacterii (<i>Kluyveromyces marxianus</i> 150709-01, <i>Saccharomyces unisporus</i> 150709-02 <i>Lactobacillus fermentum</i> 150709-03) adaptată să crească în simbioză pe un substrat pe bază de carbohidrați simpli (zer de la obținerea brânzei proaspete, zer deshidratat, permeat de zer, permeat delactozat), suplimentat cu sursa de azot reprezentată de săruri de amoniac/uree, pentru obținerea unei biomase destinate uzului uman și veterinar.	25 27 29
Dezavantajul suplimentării permeatului de zer cu două surse de azot necesare fermentației constă în faptul că azotul amoniacal este asimilat mai lent decât azotul din aminoacizi. Pe de altă parte, prezența sulfatului de amoniu în mediu duce la scăderea pH-ului, deoarece drojdia asimilează NH ₃ și eliberează H ₂ SO ₄ , care scade pH-ul.	31 33
Tulpina de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRLY 1195 este adaptată, conform invenției, la un mediu minimal de bază care conține o sursă unică de azot provenit din aminoacizii din zer. Se elimină necesitatea îmbogățirii zerului cu surse de azot care, alături de sursa de carbon, sunt indispensabile creșterii și dezvoltării unui microorganism.	35 37
Tulpina de drojdie <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRLY 1195 folosită pentru adaptare a fost păstrată pe mediu ATCC agarizat, la temperatura de 4°C. S-a urmărit adaptarea tulpinii pe un substrat ieftin, minim prelucrat, care, datorită prezenței peptidelor și a aminoacizilor liberi în compoziție și, în prezența unui adaos redus de săruri minerale, să permită consumul activ al lactozei, cu acumulare de biomasă, cu randament crescut. Importanța cantității și calității azotului influențează metabolismul lactozei și capacitatea fermentativă a tulpinilor de drojdii (Pintado ME, 1999, J.Diary Science, 82, 2315).	39 41 43 45
Pentru adaptarea naturală specifică, creșterea tulpinii s-a realizat în pasaje seriale, prin cultivarea, de-a lungul mai multor generații, pe diferite medii de cultură pe bază de zer și prin modificarea parametrilor de creștere (temperatura, pH, rpm), în scopul obținerii unei tulpini viguroase, eficientă din punct de vedere tehnologic și economic, care să asigure exprimarea caracteristicilor specifice.	47 49

RO 132585 B1

1 Procedeul de adaptare a tulpinii de drojdie *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 1195
la un mediu adaptativ de zer hidrolizat, conform invenției, este următorul:

3 a. reactivarea inoculului prelevat dintr-o cultură pură stoc de *Kluyveromyces*
marxianus NRRL Y 1195 de pe un mediu înclinat, prin cultivarea lui pe mediu sintetic ATCC
5 200 lichid, în condiții aseptice, și incubare în termostat, în condiții de aerobioză, la 28°C, 150
rpm, 24 h;

7 b. prelevarea de inocul din suspensia de la punctul a) și inocularea a 5...10%
suspensie, cu o concentrație de 10^6 ... 10^7 celule/mL, pe un substrat de permeat de zer cu
9 adaos de extract de drojdie 0,2...0,5%, la temperatura de 30-35°C, pH = 4-5, agitare 100-250
rpm, timp 24-72 h în 10 pasaje seriale, în vederea pregătirii echipamentului enzimatic în
11 funcție de condițiile de mediu și de nutrienții disponibili, urmat de prelevarea de inocul aflat
în faza lag de dezvoltare pentru primul mediu adaptativ;

13 c. însămânțarea inoculului din etapa b) și multiplicarea drojdiei pe mediu de
permeat de zer acid îmbogățit cu două surse de azot reprezentate de extract de drojdie
15 0,2...0,5% și $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1...0,2% și o sursă de potasiu reprezentată de KH_2PO_4 0,05...0,1%
în 20 de pasaje seriale și prelevare de inocul;

17 d. însămânțarea inoculului din etapa c) și multiplicarea drojdiei pe mediu de
permeat de zer acid îmbogățit cu două surse de azot și o sursă de potasiu în concentrații
19 duble, și anume extract de drojdie 0,4...0,10%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2...0,4% și KH_2PO_4 0,1...0,2%,
în 30 de pasaje seriale și prelevare de inocul;

21 e. însămânțarea inoculului din etapa d) și multiplicarea drojdiei cu acumulare
de biomasă pe mediu de zer acid hidrolizat cu sursă de potasiu KH_2PO_4 0,2...0,4%, în 30 de
23 pasaje seriale, în vederea obținerii unei tulpini de drojdie viguroasă, cu capacitate ridicată
de multiplicare; adaptarea drojdiei este evaluată determinând cantitatea de biomasă expri-
25 mată în g s.u./volum cultura prin măsurarea OD la 640 nm, la interval de câteva ore și
realizarea curbei de creștere;

27 f. separarea biomasei obținute în etapa e) prin centrifugarea culturii la 9000
rpm, 20 min, spălarea cu apă distilată și centrifugarea repetată, până la decolorarea
29 supernatantului, apoi uscarea prin liofilizare, unde fermentația pentru toate pasajele se
realizează în sistem submers, în baloane Erlenmeyer conținând 300...500 mL mediu de
31 cultură și 5...10% v/v inocul, modul de operare fiind sistemul batch la o temperatură
30...35°C, pH 4...5, agitare 100...250 rpm, timp de 24...72 h.

33 Elementele de noutate în obținerea biomasei levuriene sunt:

35 - succesiunea etapelor de cultivare, desfășurate în pasaje seriale, într-o anumită
ordine, pornind de la materia primă, pe diferite medii de cultură pe bază de zer și anumiți
37 parametri tehnologici, în care biomasa rezultată dintr-o etapă este folosită ca inocul în etapa
următoare;

39 - prepararea unui mediu de cultură adaptativ minimal, cu o compoziție chimică în care
sursa de azot este ușor accesibilă și asimilabilă, furnizată prin hidroliza proteică a zerului;

41 - obținerea unor cantități mari de biomasă prin adaptarea drojdiei prin aplicarea de
metode culturale specifice.

43 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă într-un procedeu de acumulare
de biomasă proteică de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 1195, adaptată enzimatic la zerul
acid hidrolizat, substrat minimal ieftin, pentru a metaboliza eficient lactoza, crescând valo-
45 rea adăugată a zerului.

47 Comparativ cu brevetele citate, activitatea inventivă se referă la elementele carac-
teristice noi care conduc la rezolvarea problemei tehnice.

RO 132585 B1

Prin aplicarea procedurii conform invenției se obțin următoarele avantaje:	1
- valorificarea unui produs secundar de la fabricarea brânzeturilor (zer) prin bioconversie în produse cu valoare adăugată;	3
- materie primă cu cost de achiziție scăzut, ceea ce duce la obținerea unui produs cu valoare adăugată, cu preț convenabil;	5
- bioproces simplu și eficient;	
- obținerea unui inocul viguros de drojdie, cu capacitate mare de multiplicare într-o perioadă scurtă de timp, pe un mediu ieftin;	7
- acumularea de biomasă este stimulată prin metode culturale, prin adaptarea metabolismului în funcție de nutrienții disponibili în mediu și parametri de creștere;	9
- biomasa levuriană 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 pereții celulari;	11
- reducerea consumului de materii prime (extract de drojdie, săruri minerale) necesare preparării substratului adecvat dezvoltării drojdiei;	13
- procedeu cu impact ecologic, utilizarea acestui produs secundar industrial diminuând deversarea lui ca efluent în mediul înconjurător și, implicit pericolul poluării.	15
Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.	17
<i>Caracterizarea morfo-fiziologică și biochimică a tulpinii</i>	19
Organizare celulară este de tip eucariot. Celulele tulpinii <i>Kluyveromyces marxianus</i> se prezintă sub formă sferică sau ovală, individuale sau cu 1-2 muguri apicali sau laterali și au dimensiuni cuprinse între 2-6,5 x 3,8-8 μm. Peretele celular este constituit din polizaharide cu structuri ramificate, cele mai importante fiind β-glucani (polimeri de unități de D-glucoza) și α-manan (polimer al D-manozei), enzime glicoproteice (invertaza, fosfataza acidă, hidrolaze), lipide cu rol arhitectural (mono, di și trigliceride), acizi grași liberi, fosfolipide și chitina (polimer β (1-4) de N-acetil glucozamina). Plasmalema (membrana trilamelară) este puternic cutată și delimitează conținutul celular în care se găsesc constituenții protoplasmatici (Lazar V., 2004, Microbiologic generala, Editura Universității din București, p. 176-180; Dumitru, IF, 2002, Drojdii, Biotehnologii clasice și moderne, Ars Docendi, București).	21
Tulpina, cultivată pe mediu solid, se caracterizează prin colonii netede, a căror consistență este de pastă groasă, diametrul cuprins între 3-4 mm, cu un contur circular, cu aspect cremos, neted, mat, de culoare alb-crem. Pe medii lichide dezvoltă sediment, alcătuit din celule individuale sau microcolonii rezultate prin asocierea intimă a celulelor aparținând la diferite generații. Formează inel la suprafața mediului, spumează și tulbura uniform mediul. Se cultivă ușor pe mediile naturale și artificiale ce conțin zaharuri ca sursă de carbon și energie; fermentează glucoza, galactoza, zaharoza (rareori), lactoza, rafinoza (rareori) și rareori (ușor) maltoza și trehaloza. Asimilează compușii de carbon din glucoză, galactoza, L-sorboza, zaharoza, maltoza, celobioza, trehaloza, lactoza, etanol, glicerol, ribitol, D-manitol, D-glucitol, rafinoza (rareori), melezitoza, inulina, D-xiloza, α-metil - D - glucozida, acidul DL - lactic, acidul succinic. Temperatura de dezvoltare este cuprinsă între 12-47°C, optimul termic fiind cuprins între 25-30°C. Preferă un pH acid cuprins între 4,5-6,5.	23
<i>Reactivarea inoculului de drojdie Kluyveromyces marxianus NRRLY 1195</i>	25
Celulele de drojdie se reactivează prin inoculare de pe mediul ATCC 200 solid (extract de drojdie 0,3%; extract de malț 0,3%; glucoză 1%; peptonă 0,5%; agar 2%, apă distilată până la 100 mL) în mediu ATCC 200 lichid (extract de drojdie 0,3%; extract de malț 0,3%; glucoză 1%; peptonă 0,5%; apă distilată până la 100 mL), în condiții aseptice, și incubare în termostat la 28°C, 150 rpm, pentru 24 h, în condiții de aerobioză.	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 132585 B1

1 *Inițierea multiplicării drojdiei*

3 Se inițiază creșterea culturii de drojdie în baloane Erlenmeyer de 300...500 mL,
5 conținând 50...100 mL de permeat de zer acid îmbogățit cu extract de drojdie 0,2...0,5%, în
7 care se introduc 5...10% inocul reactivat cu o concentrație de 10^7 celule/mL. Se incubează
într-un aparat de agitare-termostatare UNIMAX 1010 pentru 24 h, la 150 rpm și la tem-
peratura de 28°C, în condiții de aerobioză. Se realizează 10 pasaje seriale. Se prelevează
inocul pentru primul mediu adaptativ.

9 *Adaptarea drojdiei și obținerea de biomasă*

11 Procedul de adaptare naturală specifică a tulpinii de drojdie cu acumulare de
biomasă cuprinde cultivarea succesivă pe medii de cultură adaptative, în condiții de aero-
bioză, cultura aflată în faza exponențială de creștere dezvoltată pe primul mediu de cultură
constituie inocul pentru mediul următor.

13 Mediile adaptative sunt următoarele:

15 - permeat de zer acid îmbogățit cu două surse de azot și o sursă 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 cultură pentru
multiplicarea drojdiei; 20 pasaje seriale; inocul pentru mediul 2;

17 - 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%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2...0,4%; KH_2PO_4 0,1...0,2%.
19 Mediu de cultură pentru multiplicarea drojdiei; 30 pasaje seriale; inocul pentru mediul 3;

21 - zer acid hidrolizat îmbogățit cu sursa de potasiu: KH_2PO_4 0,2...0,4%; 30 pasaje
seriale;

23 Mediu de cultură pentru multiplicarea drojdiei cu acumulare de biomasă. Fermentația
se realizează în sistem submers, în baloane Erlenmeyer conținând 300...500 mL mediu de
25 cultură și 5...10% v/v inocul, modul de operare fiind sistemul batch. Condițiile de fermentare:
temperatura 30...35°C, pH 4...5, agitare 100...250 rpm, timp 24...72 h. Pe măsură ce se
27 adaptează, aspectul celulelor de drojdie se schimbă, căpătând o formă oblonga. La sfârșitul
perioadei de fermentație, biomasă de drojdie se recoltează prin centrifugarea culturii la
29 9000 rpm, 20 min, se spală cu apă distilată și se centrifughează repetat, până la decolorarea
supernatantului, apoi se usucă prin liofilizare.

31 În prezența oxigenului, cultura crește mai repede, iar procesul de adaptare se
îmbunătățește.

33 Tulpina de drojdie *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 1195 adaptată enzimatic prin
metode culturale și prin modificări ale parametrilor de creștere și tulpina *Kluyveromyces*
35 *marxianus* NRRL Y 1195 parentală s-au inoculat în mediu de cultură adaptativ pe bază de
zer acid hidrolizat, în vederea stabilirii, comparativ, a capacității de formare a biomasii.
37 Cantitatea de biomasă a fost evaluată în funcție de procentul de s.u. obținut și de consumul
lactozei din zer. Rezultatele se prezintă în tabelul 1.

39 *Parametri de cultură pentru obținerea de biomasă* 41 *de drojdie lactice pe zer acid hidrolizat*

Tabelul 1

43 Tulpini de drojdie	Temp.(°C)	pH	Agitare (rpm)	Mărime inocul (%)	Cantitate lactoză % metabolizată după 24 h	s.u (%)
45 <i>Kluyveromyces marxianus marxianus</i> NRRL Y 1195 parentală	30	5	150	10	45	11,20
47 <i>Kluyveromyces marxianus marxianus</i> NRRL Y 1195 adaptată enzimatic prin metode culturale specifice	30	5	150	10	100	19,87

RO 132585 B1

Cantitatea inițială de lactoză (4,25%w/w) a fost metabolizată diferit de către cele două drojdii, în 24 h. Din tabel reiese că tulpina <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y 1195 adaptată enzimatic prin metode culturale are capacitate de multiplicare ridicată cu acumulare de	1
biomasă, comparativ cu tulpina parentală.	3
Biomasa levuriană 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 pereții celulari.	5
	7

1

Revendicare

3

Procedeu de adaptare a tulpinii de drojdie *Kluyveromyces marxianus* NRRLY1 195 la un mediu adaptativ de zer hidrolizat, **caracterizat prin** succesiunea următoarelor etape:

5

a. reactivarea inoculului prelevat dintr-o cultură pură stoc de *Kluyveromyces marxianus* NRRLY 1195 de pe un mediu înclinat, prin cultivarea lui pe mediu sintetic ATCC 200 lichid, în condiții aseptice, și incubare în termostat, în condiții de aerobioză, la 28°C, 150 rpm, 24 h;

9

b. prelevarea de inocul din suspensia de la punctul a) și inocularea a 5...10% suspensie, cu o concentrație 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 30-35°C, pH = 4-5, agitare 100-250 rpm, timp 24-72 h în 10 pasaje seriale, urmat de prelevarea de inocul aflat în faza lag de dezvoltare pentru primul mediu adaptativ;

11

13

c. însămânțarea inoculului din etapa b) și multiplicarea drojdiei pe mediu de permeat de zer acid îmbogățit cu două surse de azot reprezentate de extract de drojdie 0,2...0,5% și $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1...0,2% și o sursă de potasiu reprezentată de KH_2PO_4 0,05...0,1% în 20 de pasaje seriale și prelevare de inocul;

15

17

d. însămânțarea inoculului din etapa c) și multiplicarea drojdiei pe mediu de permeat de zer acid îmbogățit cu două surse de azot și o sursă de potasiu în concentrații duble, și anume extract de drojdie 0,4...0,10%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2...0,4% și KH_2PO_4 0,1...0,2%, în 30 de pasaje seriale și prelevare de inocul;

19

21

e. însămânțarea inoculului din etapa d) și multiplicarea drojdiei cu acumulare de biomasă pe mediu de zer acid hidrolizat cu sursă de potasiu KH_2PO_4 0,2...0,4%, în 30 de pasaje seriale;

23

25

f. separarea biomasei obținute în etapa e) prin centrifugarea culturii la 9000 rpm, 20 min, spălarea cu apă distilată și centrifugarea repetată, până la decolorarea supernatantului, apoi uscarea prin liofilizare, unde fermentația pentru toate pasajele se realizează în sistem submers, în baloane Erlenmeyer conținând 300...500 mL mediu de cultură și 5...10% v/v inocul, modul de operare fiind sistemul batch la o temperatură 30...35°C, pH 4...5, agitare 100...250 rpm, timp de 24...72 h.

27

29

