



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00714

(22) Data de depozit: 24/09/2018

(41) Data publicării cererii:  
30/08/2019 BOPI nr. 8/2019

(71) Solicitant:

- UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOME ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- PHARMACORP INNOVATION S.R.L., SPLAIUL UNIRII NR. 313, ET. 2, CAM.6, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE " CAROL DAVILA" BUCUREȘTI, STR.DIONISIE LUPU, NR.37, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE TEXTILE PIELĂRIE (INCDTP), STR. ION MINULESCU NR.93, SECTOR 3, COD 031215, BUCUREȘTI, B, RO;
- AGSIRA S.R.L., STR. NICOLAE BĂLCESCU NR. 54, HALA NR. 2 SAT ISALNIȚA, COMUNA ISALNIȚA, DJ, RO

(72) Inventatori:

- BĂRBULESCU IULIANA DIANA, ALEEA MACULUI NR.1, BL. FA 22, SC.A, ET.2, AP.5, SLATINA, OT, RO;

- TEODORESCU RĂZVAN IONUȚ, STR.SOFIA, NR.68, OTOPENI, IF, RO;
- GHICA MIHAELA VIOLETA, CALEA CRÂNGAȘI NR.26-28, BL.48-49, SC.A, AP.4, ET.2, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- BEGEA MIHAELA, STR.GRĂDIȘTEA NR.3, BL.A 9, SC.A, ET.1, AP.4, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- ALBU KAYA MĂDĂLINA GEORGIANA, BDUL.TINERETULUI, NR.21, BL.Z6, SC.1, ET.7, AP.48, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- NEGRILĂ NICOLAE RADIAN, STR.AMARADIA, NR.81, SC.1, AP.4, CRAIOVA, DJ, RO;
- MARINESCU SIMONA IOANA, ȘOS.IANCULUI, NR.68, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- TUDOR VALERICA, STR.MĂRGĂRITARULUI, NR 14, BL.P53, SC.1, ET.1, AP.4, OTOPENI, IF, RO;
- POPA LĂCRĂMIOARA, STR.PICTOR ȘTEFAN DUMITRESCU NR.3, BL.2, SC.1, ET.5, AP.23, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- CÎRÎC ALEXANDRU, STR. GLADIOLELOR NR. 10, BL. 5, ET. 6, AP. 50, SAT ROȘU, COMUNA CHIAJNA, IF, RO;
- DINU - PÎRVU CRISTINA ELENA, STR.GHEORGHE LAZĂR NR.1, ET.1, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) BIOMASE DE DROJDII DE BERE ȘI SUSPENSII DERIVATE DIN BIOMASE, ȘI PROCEDEE DE OBTINERE A ACESTORA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor preparate de biomase de drojdii de bere uscate, și a unor suspensii derivate de la acestea, utilizate ca surse de hrană pentru animale. Procedeu conform invenției constă în prepararea culturii de întreținere preinocul solid și inocul lichid a drojdiei *S. pasteurianus* NCYC 515, fiind folosit pentru însămânțarea mediului de fermentație, separarea mediului fermentat, purificarea biomasei umede care se folosește pentru uscare prin liofilizare, sau pentru amestecare în faza umedă cu

drojdia uzată de bere, urmată de uscare prin liofilizare, eventual, se prepară în continuare suspensii care au în formulare apă distilată, ca fază lichidă, biomasă uscată de drojdie de bere, ca fază solidă, agar-agar, ca agent de creștere a viscozității, și carboximetilceluloză sodică, și un agent de umectare uzual.

Revendicări: 4

Figuri: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



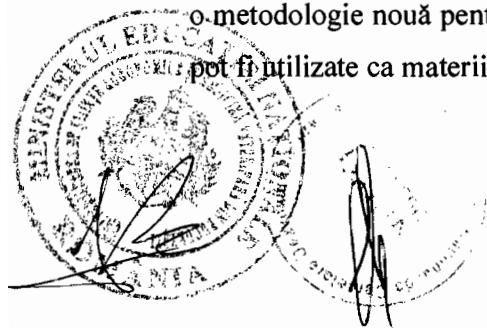
OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARCI  
Cerere de brevet de invenție  
Nr. a 2018 0714  
Data depozit 24-09-2018

**DESCRIEREA INVENȚIEI**  
**BIOMASE DE DROJDII DE BERE SI SUSPENSII DERIVATE DIN BIOMASE ȘI**  
**PROCEDEE DE OBTINERE A ACESTORA**

Invenția se referă la obținerea de biomase de drojdii de bere ce valorifică drojdia uzată de bere de la fabricile de bere și a unor suspensii derivate de la acestea, care pot fi folosite datorită compoziției bogate în proteină, vitamine, ca sursă de hrană în rețetele furajere ale animalelor.

În prezent este cunoscut brevetul CA19760267372 19761203 care se referă la obținerea de suplimente furajere pentru animale din drojdia uzată de bere. Prezenta invenție se referă la noi suplimente pentru animale și la un nou procedeu de preparare a acestora. ("Improvements in animal feeds", JOHN D. Harvey R., C. Chalk). Prezenta invenție "Procedeu de producere a unei alimentări continue de celule de drojdie de bere pentru promovarea rapidă și activă a fermentației" se referă la un supliment pentru hrana animalelor derivate din drojdia de bere uzată, obținută în general ca produs secundar din procesele de fabricare a berii. Noul supliment de hrană asigură un mijloc util și economic de utilizare a subprodusului de bere menționat în forma sa lichidă. Invențiile biotehnologice sunt invențiile care se referă la un produs care constă din sau care conține un material biologic ori care se referă la un procedeu prin care este obținut, prelucrat sau utilizat materialul biologic.

Studii recente au demonstrat că drojdia uzată de bere ocupă o poziție semnificativă și în nutriția umană datorită avantajelor sale nutriționale ridicate. (Clare Kerby, 2017, An Overview of the Utilisation of Brewery By-Products as Generated by British Craft Breweries). Conform celor mai recente date furnizate drojdia uzată de bere (BSY) are o acțiune asupra dezvoltării bune a copiilor și a potențialului de îmbunătățire a sănătății prin conținutul său de beta-glucani (Zhu et al., 2010, Zechner-Krpan et al., 2010) al., 2016; Liepins și colab., 2015; Sadovoy și colab., 2017; Natakankitkul și colab., 2016). BSY reprezintă cel de-al doilea produs secundar al fabricării berii (Suruceanu et al., 2013; Kerby și Vriesekoop, 2017). Cu toate acestea, cea mai mare parte a BSY produsă de companiile în Europa (aproximativ 125 000 tone/an) se vinde sub formă sa umedă, furajele ieftine pentru agricultori - numai 10% sunt prelucrate prin uscare instalațiilor din cauza costurilor implicate. Este cunoscut LIFE YEAST (LIFE16 ENV/ES/000158), proiect care și-a propus să dezvolte o metodologie nouă pentru a procesa (hidroliza) BSY în elemente constitutive valoroase care pot fi utilizate ca materii prime cu o valoare de piață ridicată în 2006 o gamă largă de aplicații



industriale. Acestea sunt: extractul de drojdie (CYE), peretele celular de drojdie (YCW), drojdia parțial autolizată (PAY) și peptide bioactive.

Invenția prezintă avantaj întrucât drojdia uzată de la fabricile de bere este un subprodus deoarece fi valorificat pentru obținerea de produse noi cu valoare nutrițională ridicată și nu reprezintă un deșeu care ar putea duce la poluarea mediului înconjurător. Elimină dezavantajul de a fi colectată ca deșeu care ar duce la costuri suplimentare ale produsului.

*Invenția se referă la un grup unitar de produse și de procedee noi, prin care să se obțină produse noi cu aplicabilitate în hrana animalelor.*

**Problema tehnică pe care o rezolvă problema** constă în urmărirea următoarelor etape:

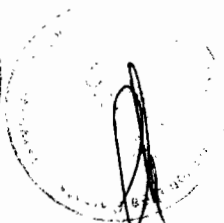
**-Obținerea de biomase de drojdie de bere activă** – ca materie primă prin valorificarea drojdiei uzate de bere.

**-Obținerea de suspensii derivate din biomasele de drojdie de bere** care utilizează produsul obținut prin cultivarea drojdiei *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515, din probele de drojdie uzate uscate de la fabrică și de suspensii derivate din preparatele obținute prin amestecul lichid în diferite rapoarte dintre drojdie de bere *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 cu drojdia uzată de bere. Colecția Națională de Culturi de Drojdie (NCYC) este cea mai mare colecție din Marea Britanie a culturilor de drojdie, deține peste 4000 tulpini colectate de peste 70 de ani.

Procedeul de obținere constă în parcurgerea următoarelor etape:

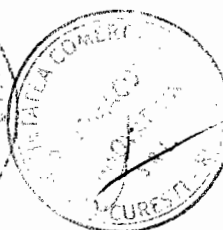
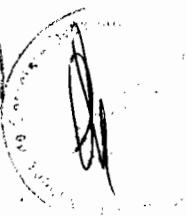
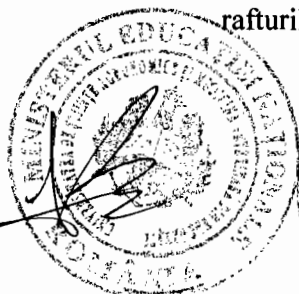
**I. Obținerea de biomasa de drojdie de *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 atât sub forma umedă cât și uscată activă**

- Obținerea materialului biologic - *Saccharomyces pasteurianus* NYC 515 care poate fi utilizată pentru obținerea de biomasa de drojdie active;
- Obținerea culturii liofilizată *Saccharomyces pasteurianus* NYC 515 – a fost selectată această tulpină de la Colectia de Microorganisme NCYC - aparține International Depositary Authority;
- Obținerea culturii pure în plăci Petri obținute din cultura liofilizată *Saccharomyces pasteurianus* NYC 515 – fiola cu cultura liofilizată se deschide în condiții aseptice și peste ea se adaugă mediu 0.5 ml YM (extract de malt, extract de drojdie) lichid. Se resuspendă ușor cultura uscată și se transferă într-o eprubetă care conține aproximativ 10 ml din același mediu YM (extract de malt, extract de drojdie). Creșterea culturii de drojdie este, de obicei, stimulată prin aerare și poate fi obținută prin agitare. Se introduce eprubeta cu cultura suspendată și se introduce într-un balon Erlenmeyer.



Acesta se lasa la incubat prin agitare la shaker prin balansare la 25°C la max 50-70 rpm;

- Din suspensia lichida dezvoltata in eprubeta se realizeaza dilutii zecimale in placi Petri cu mediu YPG/YM agarizat si se lasa 5-7 zile la incubat la 30°C pentru obtinerea de colonii pure de drojdie. Dupa 5 zile drojdiile dezvoltate se analizeaza din punct de vedere microscopic si microscopic;
- *Obtinerea culturii de intretinere* obtinuta din culturi pure de *Saccharomyces pasteurianus* NYC 515. Se selecteaza din coloniile pure, se insamanteaza coloniile in tuburi cu mediu inclinat pe baza de YPG agarizat (extract de drojdie, peptona, glucoza, agar-agar), si se incubeaza la 28-30°C pentru 40-48 h;
- *Obtinerea preinocului de laborator*: din cultura stoc de intretinere se insamanteaza cultura preinocul pe mediu inclinat pe baza de (extract de drojdie, peptona, zaharoza, agar agar) si se incubeaza la 28-30°C pentru 40-48 h;
- *Cultura inocul lichid* se prepara din ½ tuburi de cultura preinocul, prin insamantarea a 100-150 ml mediu lichid pe baza de zaharoza/zahar alimentar, peptona si extract de drojdie, ce contine  $10^7$ - $10^9$  celule/ml, cu substanta uscata de aprox 2g, si care se prezinta de culoare galbuie;
- *Fermentatia propriu zisa* se realizeaza prin insamantarea in raport de 10-15 % (v/v) inocul lichid a mediului de fermentatie pe baza de zaharoza/zahar alimentar care se adauga la 0 ore de cultivare si apoi pe parcurs in 2-4 portii dizolvate si sterilizate in prealabil, saruri de  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Mg^{2+}$ , la care se mentine constant pH-ul dorit (4.5; 5.1) cu o solutie amoniacala 5% care este ajustat permanent automat cu o pompa peristaltica legata la bioreactor, temperatura de 28-30°C, debit de aer și agitare variabilă;
- *Prelucrarea mediului fermentat* se realizeaza prin centrifugare 3500-4500 rpm timp de 10 minute, purificari succesive cu apa distilata sterila urmata de centrifugari, pentru eliminarea reziduurilor obtinandu-se o crema de drojdie umeda cu aspect crem deschis. O parte inainte de ametecl in faza lichida se poate usca prin liofilizare.
- *Procesul de liofilizare* a fost optimizat la 40 de ore, astfel: probele au fost initial inghetate la 0°C timp de 10 ore, apoi continuă inca 8 ore cu liofilizarea la presiunea de 0,1 mbar și temperatura de 0°C. Pe parcursul liofilizării temperatura se mărește treptat, ajungând la +10°C în 8 ore, la +20°C în 8 ore și la +30°C în 2 ore. Etapa finală a durat 4 ore, păstrându-se aceeași presiune de 0.011 mbar, iar temperatura finală a rafturilor a ajuns la 35°C.

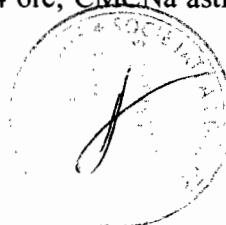


**II.Obtinerea biomaselor de de drojdii de bere** care valorifica drojdia uzata de la fabrica de bere, prin amestec in faza lichida. Se amesteca in diferite rapoarte crema de drojdie umeda de *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 cu biomasa umeda de drojdie uzata de la fabrica de bere si se supune uscarii prin liofilizare.

**III.Obtinerea de suspensii derivate** din preparatele pe baza de drojdie de bere care utilizeaza produsul obtinut prin cultivarea drojdiei *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515, din probele de drojdii uzate de bere uscate de la fabrica si de suspensii derivate din preparatele obtinute prin amestecul in diferite rapoarte dintre drojdie de bere *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 cu drojdia uzata de bere.

Suspensiile au în formulare apă distilată ca fază lichidă, iar ca fază solidă biomasă uscată de drojdie de bere. Ca agenți de creștere ai vâscozității s-au folosit agar-agar și carboximetilceluloză sodică (CMCNa), iar ca agent de umectare tween 20.

- ✓ Agar-agar este agent de creștere a vâscozității, cunoscut și sub denumirea de „gelatina vegetală”. Se utilizează în procente de până la 10% la prepararea suspensiilor de uz oral, ca agent de îngroșare în patiserie și în domeniul microbiologiei ca mediu de cultură pentru microorganisme.
  - ✓ CMCNa (carboximetilceluloza sodică) este sarea de sodiu a policarboximeteleterului celulozei. Solubilitatea CMCNa în apă este bună, fiind larg folosită ca agent de creștere a vâscozității și agent antiaglomerant în numeroase formulări de tip sistem dispers. Ca efect terapeutic este utilizat în special pentru acțiunea antiacidă.
  - ✓ Tween 20 este surfactant ne-ionic, din clasa polisorbaților. Prezintă numeroase aplicații, fiind considerat netoxic și neiritant. În concentrații mici (0,1-0,5%) este folosit cu succes ca emulgator, agent de dispersare în formulări farmaceutice, în prepararea unor alimente și în industria produselor cosmetice.
- **Suspensia este alcătuită din următoarele componente**, exprimate în procente gravimetrice raportate la 100 mL de suspensie: a) 4 g biomasă uscată de drojdie de bere umectată cu b) 0,4 g tween 20; c) 0,2 g carboximetilceluloză sodică ce se adaugă sub formă de soluție vâscoasă 1% în apă distilată, soluție preparată în prealabil; d) 1,0 g agar-agar ce se adaugă sub formă de soluție vâscoasă 5% în apă distilată, soluție preparată în prealabil; e) apă distilată adăugată sub continuă agitare până la obținerea a 100 mL de suspensie.
- **Procedul de obținere** al suspensiilor constă în aceea că: (1) se prepară în prealabil o soluție vâscoasă de carboximetilceluloză sodică 1% astfel: carboximetilceluloza sodică se lasă la îmbibat în 10 mL de apă distilată, timp de 24 ore; CMCNa astfel îmbibată se



dispersează în restul de apă distilată sub continuă agitare până la obținerea unei soluții vâscoase, omogene, de concentrație 1%; (2) se prepară în prealabil o soluție vâscoasă de agar-agar 5% astfel: agar-agar se dizolvă în apă distilată ușor încălzită, sub continuă agitare, până la obținerea unei soluții vâscoase, omogene, de concentrație 5%; (3) 4 g de biomasă uscată de drojdie de bere, omogenizată în prealabil prin triturare, se umectează cu 0,4 g tween 20 și (4) se adaugă carboximetilceluloză sodică în concentrație de 0,2% ce se amestecă sub formă de soluție vâscoasă de carboximetilceluloză sodică 1% anterior preparată; (5) după omogenizare, se adaugă agar-agar în concentrație de 1% ce se amestecă sub formă de soluție vâscoasă 5% anterior preparată; (6) întregul amestec este apoi omogenizat, adăugând sub continuă agitare restul de apă distilată până la obținerea a 100 mL de suspensie.

**Prin aplicarea procedurii se obțin următoarele avantaje:**

- Obținerea unor biomase de drojdie de bere printr-un procedeu fermentativ simplu - Dacă fabrica de bere nu funcționează, drojdie uzată nu se mai produce, este necesară producerea separată a drojdiei de bere la fermentator.
- Pot fi utilizate și alte tulpini de drojdie de bere
- Posibilitatea de a obține un nou preparat de drojdie care valorifică drojdie de bere uzată
- Valorificarea superioară a drojdiei de bere ca subprodus rezultat din procesul tehnologic de fabricare a berii;
- Se poate aplica și procedeu de uscare în pat fluidizat;

**Se prezintă în continuare 2 exemple de realizare a invenției:**

**Exemplu 1**

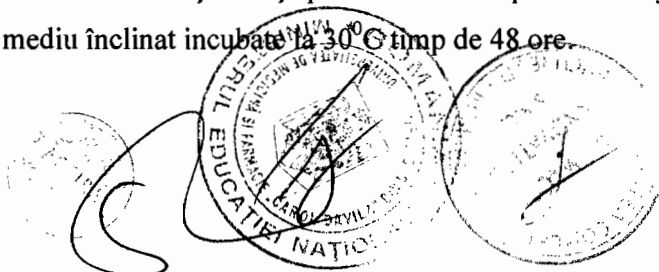
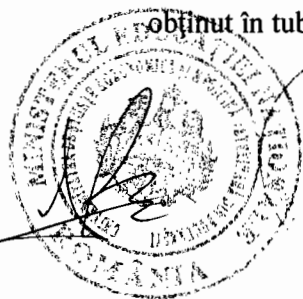
Au fost obținute colonii de drojdie pure din cultura liofilizată achiziționată de la NCYC – *S. pasteurianus* NCYC 515. Coloniile izolate au servit formării de culturi stoc de întreținere și apoi au fost utilizate pentru obținerea de cultura preinocul pentru obținerea inoculului lichid.

Cultura de întreținere – reprezintă cultura de drojdie – *S. pasteurianus* NCYC 515.

-Mediu de cultură pentru întreținerea tulpinilor de drojdie luate în lucru și prepararea preinoculului a constat în: zaharoză, extract de drojdie, extract de malț și peptonă, agar-agar.

Cultura de întreținere se obține din însămânțarea mediului (extract de malț 2% și peptonă 0.3%, glucoză, agar 2.5-3 %) în plăci cu 1 ml de cultura *S. pasteurianus* NCYC 515. Se selectează coloniile și se formează cultura stoc de întreținere. Din cultura de întreținere se formează cultura preinocul. Culturile de întreținere și preinocul ale tulpinii de drojdie s-au

obținut în tuburi cu câte 10 ml mediu înclinat incubate la 30°C timp de 48 ore.





-Culturile inocul lichid s-au obținut în flacoane Erlenmayer de 500 ml cu câte 100 ml mediu, incubate la temperatura 28-30°C, pe agitator rotativ 140-170 rpm, timp de 20 ore (peste noapte) insamantate in raport de 1-2 tuburi/flacon cultura preinocul dezvoltata anterior.

#### -Prepararea inoculului

Inocul lichid pe baza de cultura de drojdie de <i>Saccharomyces pasteurianus</i> NCYC 515	
Mediu de cultura pentru dezvoltare inocul	
Extract de drojdie	0,5 g %
Zaharoza	7 g %
Peptona	0,5 g %
Apa distilata	100 ml

Ingredientele se dizolva in apa distilata si se sterilizeaza dupa un procedeu cunoscut.

- **Fermentatia propriu zisa** se realizeaza prin insamantarea in raport de 10-15 % (v/v) inocul lichid a mediului de fermentatie pe baza de zaharoza/zahar alimentar care se adauga la 0 ore de cultivare si apoi pe parcurs in 2-4 portii dizolvate si sterilizate in prealabil, saruri de  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Mg^{2+}$ , la care se mentine constant pH-ul dorit (5.1) cu o solutie amoniaca 5% care este ajustat permanent automat cu o pompa peristaltica legata la bioreactor, temperatura de 30°C, debit de aer și agitare variabilă.

Mediu fermentatie	g%
Extract de drojdie	0,6
KCl	0,05
$NH_4H_2PO_4$	0,1
Zaharoza/zahar alimentar	6
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,05

#### Monitorizarea on-line si of line a parametrilor tehnologici

Durata de cultivare (h)	pH	SU	OBSERVATII
0	5,17	9	s-a luat proba aseptice
4	5,1	8	s-a luat proba aseptice
8	5,1	5-5,5	s-a luat proba aseptice
12	5,1	2,5	Adaos 1PM zaharoza (100g)
16	5,1	3	Adaos 1PM zaharoza (100g)
20	5,1	3	s-a luat proba aseptice
21	5,1	2-2,5	s-a luat proba finala aseptice stop



**Prelucrare postfermentativa:**

**Separarea mediului fermentat:** Cel mai simplu și rapid mod de a efectua separarea biomasei de drojdie de mediul de fermentație este aplicarea centrifugării, 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.

**Spălarea biomasei:** Pentru îndepărtarea mediului de cultură reținut între celulele de drojdie este necesară spălarea de două- trei ori cu apă distilată a biomasei separate. Spălarea se efectuează prin agitare energetică urmată de centrifugare și descărcarea apei de spălare. S-a obținut 54 g/l biomasa umedă.

Obținerea amestecului de crema de biomasa de drojdie *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 cu drojdia uzată de bere. O parte din drojdie a fost supusă uscării iar alta parte a fost supusă amestecului cu drojdia de bere uzată în diferite rapoarte conform tabelului de mai jos:

**Amestecuri**

Probe	Denumire	Rata de amestec biomasa umedă de drojdie de <i>Saccharomyces pasteurianus</i> NCYC 515 cu drojdie uzată de bere
0	1	2
amestec 1	A1.2 (M2+M4)	1:1 (M2:M4)
amestec 2	A2.2 (M2+M4)	1:2 (M2:M4)
amestec 3	A3.2 (M2+M4)	1:3 (M2:M4)
proba martor	Biomasa de drojdie <i>Saccharomyces pasteurianus</i> NCYC 515 5.1pH; 30°C (umedă)	M2
proba martor	Drojdie bere uzată (umedă)	M4

**Uscare prin liofilizare atât a probelor martor cât și a amestecurilor s-a efectuat după următorul program:** Procesul de liofilizare a fost optimizat la 40 de ore, astfel: probele au fost inițial înghetate la 0°C timp de 10 ore, apoi continuă încă 8 ore cu liofilizarea la presiunea de 0,1 mbar și temperatura de 0°C. Pe parcursul liofilizării temperatura se mărește treptat, ajungând la +10°C în 8 ore, la +20°C în 8 ore și la +30°C în 2 ore. Etapa finală a durat 4 ore, păstrându-se aceeași presiune de 0.011 mbar, iar temperatura finală a rafturilor a ajuns la 35°C.






Produsul martor de biomasa de drojdie *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 si produsul martor de drojdie de bere, prezinta urmatoarele caracteristici:

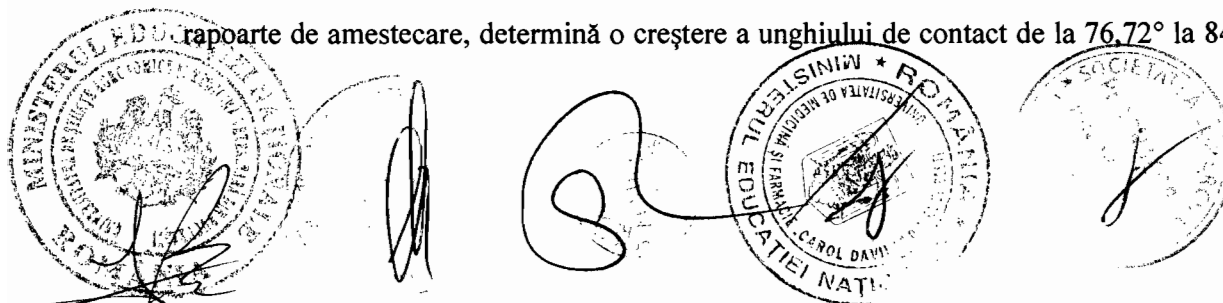
Proba nr.	Azot, %	Proteina, %	Umiditate, %	Proteina, % s.u.	Viabilitate, ufc/g
M2	7.04	44.03	10.58	49.24	$1,7 \times 10^9$
M4	7.55	47.21	11.86	53.56	$4,2 \times 10^3$

Proba nr.	Proteina	Umiditate	Proteina, % s.u.
A1.2	46.43	8.89	50.96
A2.2	46.65	11.25	52.56
A3.2	47.05	11.34	53.07
M2	44.03	10.58	49.24
M4	47.21	11.86	53.56

Biomasele uscate de drojdie de bere obținute prin liofilizare au fost caracterizate din punct de vedere al capacității de umectare cuantificată prin valoarea unghiului de contact. Metoda de determinare a unghiului de contact se bazează pe utilizarea rutinei „contact angle method” la un aparat de determinări fizico-chimice tip CAM 101 (KSV Scientific Instruments). Biomasa uscată de drojdie de bere triturată în prealabil, a fost etalată pe o lamă de microscop, pe care anterior s-a aplicat o bandă dublu adezivă, pentru a permite obținerea unui strat uniform, compact și subțire de pulbere. Mediul de dispersie utilizat a fost apa distilată. Determinările au fost efectuate la temperatura camerei. S-a utilizat seringă Hamilton 1000μl cu acul C209-22 (Biolin Scientific). După dispensarea picăturii de apă distilată din seringă pe suprafața biomasei uscate de drojdie de bere, forma picăturii a fost monitorizată cu o cameră digitală conectată la aparatul CAM 101 (KSV Instruments Ltd., Finlanda), înregistrându-se unghiul de contact. Pentru evaluarea unghiului de contact (unghiul format de tangenta la suprafața lichid/gaz și suprafața liberă a solidului, în punctul de intersecție al celor trei faze) s-a aplicat ecuația Young care descrie din punct de vedere matematic forma picăturii. Unghiul de contact se exprimă în grade.

În Figura 1 sunt prezentate imagini ale formei picăturii obținute la determinarea unghiului de contact pentru biomasele uscate de drojdie de bere *codate* A1.2, A2.2, A3.2, M2 și M4.

Biomasele uscate de drojdie de bere codate A1.2, A2.2, A3.2, M2 și M4 prezintă caracter hidrofil, valorile obținute pentru unghiul de contact fiind mai mici decât 90°. Caracterul cel mai hidrofil este înregistrat pentru biomasa de drojdie de bere codată M2. Se observă că adaosul de drojdie de bere de la fabrică (M4) la drojdia de bere M2, în diferite rapoarte de amestecare, determină o creștere a unghiului de contact de la 76,72° la 84,85°, și



implicit a caracterului hidrofob, comparativ cu valoarea unghiului de contact înregistrată la drojdia M2.

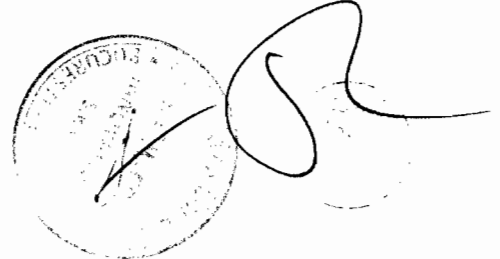
**-Obținerea de suspensii derivate** din preparatele pe baza de drojdie de bere care utilizează produsul obținut prin cultivarea drojdiei *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515, din probele de drojdie uzate uscate pe valturi de la fabrică și de suspensii derivate din preparatele obținute prin amestecul în diferite rapoarte dintre drojdie de bere *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 cu drojdia uzată de bere.

Au fost preparate suspensii care au în formulare apă distilată ca fază lichidă, iar ca fază solidă biomasă uscată de drojdie de bere. Ca agenți de creștere ai vâscozității s-au folosit agar-agar și carboximetilceluloză sodică (CMCNa), iar ca agent de umectare tween 20.

### Exemplul 1.1

În această invenție suspensia este constituită din **următoarele componente**, exprimate în procente gravimetrice raportate la 100 mL de suspensie: a) 4 g biomasă uscată de drojdie de bere, **codată A1.2**, umectată cu b) 0,4 g tween 20; c) 0,2 g carboximetilceluloză sodică ce se adaugă sub formă de soluție vâscoasă 1% în apă distilată, soluție preparată în prealabil; d) 1,0 g agar-agar ce se adaugă sub formă de soluție vâscoasă 5% în apă distilată, soluție preparată în prealabil; e) apă distilată adăugată sub continuă agitare până la obținerea a 100 mL de suspensie.

**Procedul de obținere** al suspensiei conform invenției constă în aceea că: (1) se prepară în prealabil o soluție vâscoasă de carboximetilceluloză sodică 1% astfel: carboximetilceluloza sodică se lasă la îmbibat în 10mL de apă distilată, timp de 24 ore; CMCNa astfel îmbibată se dispersează în restul de apă distilată sub continuă agitare până la obținerea unei soluții vâscoase, omogene, de concentrație 1%; (2) se prepară în prealabil o soluție vâscoasă de agar-agar 5% astfel: agar-agar se dizolvă în apă distilată ușor încălzită, sub continuă agitare, până la obținerea unei soluții vâscoase, omogene, de concentrație 5%; (3) 4 g de biomasă uscată de drojdie de bere, **codată A1.2**, cu un raport de amestecare 1:1 între biomasa umedă de drojdie de bere *S. pasteurianus* NCYC 515 (5.1; 30°C) (M2) și drojdia de bere de la fabrică (M4), omogenizată în prealabil prin triturare, se umectează cu 0,4 g tween 20 și (4) se adaugă carboximetilceluloză sodică în concentrație de 0,2% ce se amestecă sub formă de soluție vâscoasă de carboximetilceluloză sodică 1% anterior preparată; (5) după omogenizare, se adaugă agar-agar în concentrație de 1% ce se amestecă sub formă de soluție vâscoasă 5% anterior preparată; (6) întregul amestec este apoi omogenizat, adăugând sub continuă agitare restul de apă distilată până la obținerea a 100 mL de suspensie.



**Exemplul 1.2**

Suspensia a fost obținută prin procedeul descris în Exemplul 1.1, exceptând faptul că biomasa uscată de drojdie de bere, **codată A 2.2** biomasa uscată de drojdie *S. pasteurianus* NCYC 515 (5.1; 30°C) și drojdia uzată de bere are un **raport de amestecare 1:2** între drojdia de bere obținută *S. pasteurianus* NCYC 515 (5.1; 30°C) (M2) și drojdia de bere de la fabrică (M4).

**Exemplul 1.3**

Suspensia a fost obținută prin procedeul descris în Exemplul 1.1, exceptând faptul că biomasa uscată de drojdie de bere, **codată A 3.2** biomasele uscate de drojdie *S. pasteurianus* NCYC 515 (5.1; 30°C) și drojdia uzată de bere are un **raport de amestecare 1:3** între drojdia de bere obținută *S. pasteurianus* NCYC 515 (5.1; 30°C) (M2) și drojdia de bere de la fabrică (M4).

**Exemplul 1.4**

Suspensia a fost obținută prin procedeul descris în Exemplul 1.1, exceptând faptul că biomasa uscată de drojdie de bere, **codată M2** este drojdia de bere obținută *S. pasteurianus* NCYC 515 (5.1; 30°C).

**Exemplul 1.5**

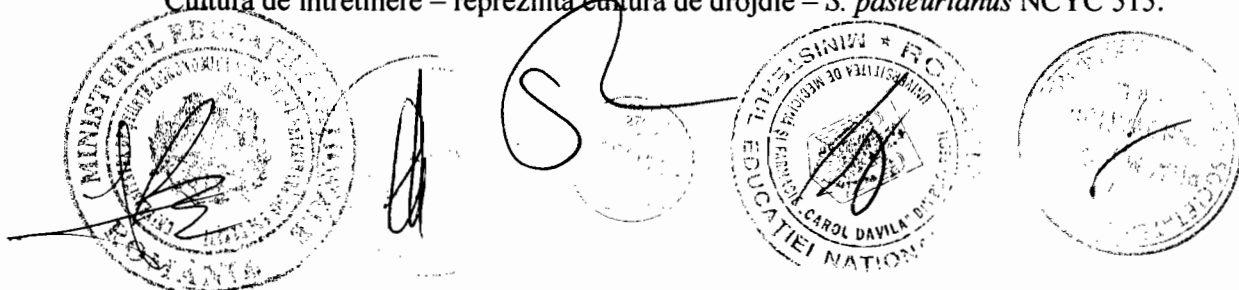
Suspensia a fost obținută prin procedeul descris în Exemplul 1.1, exceptând faptul că biomasa uscată de drojdie de bere, **codată M4** este drojdia de bere uzată obținută la fabrica de bere (*S. cerevisiae*).

La 24 ore de la preparare, suspensiile conform invenției (Exemplele 1.1-1.5) au prezentat sediment și supernatant ușor decelabile. Sedimentul se redispersează ușor. După 48 ore, se observă un început de tasare a sedimentului, volumul de sedimentare scăzând. La 5 zile de la momentul preparării, redispersarea se produce mai ușor decât în cazul determinărilor efectuate la 48 ore de la preparare. Astfel, gradul de redispersabilitate este cuprins între 90-95% la 24 de ore de la preparare, între 90-95% la 48 de ore de la preparare, respectiv 95% pentru toate suspensiile la 5 zile de la preparare. Gradul de floclurare este cuprins între 1,00 și 1,44 la 24 ore de la preparare, respectiv între 0,90 și 1,14 la 48 ore de la preparare.

**Exemplu 2**

Au fost obținute colonii de drojdii pure din cultura liofilizat achiziționată de la NCYC – *S. pasteurianus* NCYC 515. Coloniile izolate au servit formării de culturi stoc de intretinere și apoi au fost utilizate pentru obținerea de cultura preinocul pentru obținerea inoculului lichid.

Cultura de intretinere – reprezintă cultura de drojdie – *S. pasteurianus* NCYC 515.



-Mediu de cultură pentru întreținerea tulpinilor de drojdie luate în lucru și prepararea preinoculului a constat în: zaharoză, extract de drojdie, extract de malț și peptonă, agar-agar.

Cultura de întreținere se obține din însămânțarea mediului (extract de malț 2 % și peptonă 0.3%, glucoza, agar 2.5-3 %) în plăci cu 1 ml de cultura *S. pasteurianus* NCYC 515. Se selectează coloniile și se formează cultura stoc de întreținere. Din cultura de întreținere se formează cultura preinocul. Culturile de întreținere și preinocul ale tulpinii de drojdie s-au obținut în tuburi cu câte 10 ml mediu înclinat incubate la 30°C timp de 48 ore.

-Culturile inocul lichid s-au obținut în flacoane Erlenmayer de 500 ml cu câte 100 ml mediu, incubate la temperatura 28-30°C, pe agitator rotativ 140-170 rpm, timp de 20 ore (peste noapte) însămânțate în raport de 1-2 tuburi/flacon cultura preinocul dezvoltată anterior.

#### Mediu inocul

Inocul lichid pe baza de cultura de <i>Saccharomyces pasteurianus</i> NCYC 515	
Mediu de cultura pentru dezvoltarea inoculului	
Extract de drojdie	0,5 g %
Zaharoza	7 g %
Peptonă	0,5 g %
Apa distilată	100 ml

Ingredientele se dizolvă în apă distilată și se sterilizează după un procedeu cunoscut.

- Fermentatia propriu zisă se realizează prin însămânțarea în raport de 10-15 % (v/v) inocul lichid a mediului de fermentație pe baza de zaharoza/zahar alimentar care se adaugă la 0 ore de cultivare și apoi pe parcurs în 2-4 porții dizolvate și sterilizate în prealabil, săruri de  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Mg^{2+}$ , la care se menține constant pH-ul dorit (4.5) cu o soluție amoniacală 5 % care este ajustat permanent automat cu o pompă peristaltică legată la bioreactor, temperatura de 28°C, debit de aer și agitare variabilă.

Mediu fermentație	g%
Extract de drojdie	0,7
KCl	0,05
$NH_4H_2PO_4$	0,1
Zaharoza/zahar alimentar	6
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,05

#### Monitorizarea on-line și of line a parametrilor tehnologici

Durata de cultivare (h)	pH	s.u	Observatii
0	4,5	8,5-9	s-a luat proba aseptice
4	4,5	8	s-a luat proba aseptice
8	4,5	6,3-6,5	s-a luat proba aseptice
12	4,5	2,5-2,7	s-a luat proba aseptice
13	4,5	2,5	Adaos IPM zaharoza (100g)



Handwritten signature.

Handwritten signature.



16	4,5	2,7-3	s-a luat proba aseptice
18	4,5	3,5	Adaos 1PM zaharoza (100g )
22	4,5	4	Stop s-a luat proba aseptice

### Prelucrare postfermentativa:

**Separarea mediului fermentat:** Cel mai simplu și rapid mod de a efectua separarea biomasei de drojdie de mediul de fermentație este aplicarea centrifugării, prin care se realizează separarea celulelor de drojdie de mediul de cultură și de metaboliți. O separare buna s-a realizat la 3500 - 4500 rpm timp de 10 minute, utilizand o centrifuga Sorvall.

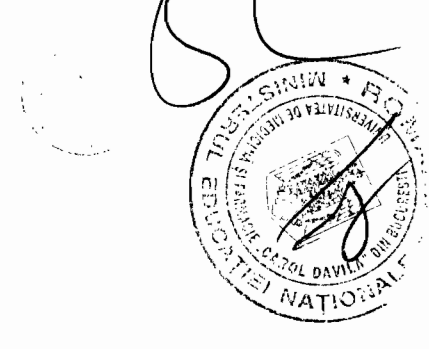
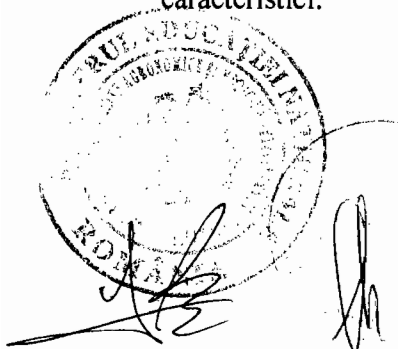
**Spălarea biomasei :** Pentru îndepărtarea mediului de cultură reținut între celulele de drojdie este necesară spălarea de doua- trei ori cu apă distilată a biomasei separate. Spălarea se efectuează prin agitare energetică urmată de centrifugare și descărcarea apei de spălare. S-a obtinut 44 g/l biomasa umeda.

Obținerea amestecului de crema de biomasa de drojdie *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 cu drojdia uzata de bere. O parte din drojdie a fost supusa uscarii iar alta parte a fost supusa amestecului cu drojdia de bere uzata in diferite rapoarte conform tabelului de mai jos:

Probe	Proba de biomasa <i>Saccharomyces pasteurianus</i> NCYC 515 4.5pH; 28°C	Rata de amestec biomasa umeda de drojdii de <i>Saccharomyces pasteurianus</i> NCYC 515 cu drojdie uzata de bere
0	1	2
amestec 1	A1.1 (M1+M4)	1:1 (M1:M4)
amestec 2	A2.1 (M1+M4)	1:2 (M1:M4)
proba martor	drojdie martor de <i>Saccharomyces pasteurianus</i> NCYC 515	M1
proba martor	Drojdie bere uzata	M4

Procesul de liofilizare a fost optimizat la 40 de ore, astfel: probele au fost initial inghetate la 0°C timp de 10 ore, apoi continuă inca 8 ore cu liofilizarea la presiunea de 0,1 mbar și temperatura de 0°C. Pe parcursul liofilizării temperatura se mărește treptat, ajungând la +10°C în 8 ore, la +20°C în 8 ore și la +30°C în 2 ore. Etapa finală a durat 4 ore, păstrându-se aceeași presiune de 0.011 mbar, iar temperatura finală a rafturilor a ajuns la 35°C.

Produsul martor de biomasa uscata prin liofilizare de drojdie *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515, cat si de drojdie uscata de drojdie uzata de bere prezinta urmatoarele caracteristici:



Proba nr.	Azot, %	Proteina, %	Umiditate, %	Proteina, % s.u.	Viabilitate, ufc/g
M1	7.78	48.66	9.19	53.58	$6,4 \times 10^8$
M4	7.55	47.21	11.86	53.56	$4,2 \times 10^3$

Proba nr.	Proteina	Umiditate	Proteina, % s.u.
A1.1	46.98	11.41	53.03
A2.1	47.66	10.07	53
M1	48.66	9.19	53.58
M4	47.21	11.86	53.56

Biomasele uscate de drojdie de bere obținute prin liofilizare au fost caracterizate din punct de vedere al capacității de umectare cuantificată prin valoarea unghiului de contact. Metoda de determinare a unghiului de contact a fost descrisă anterior în cazul Exemplului 1.

În Figura 2 sunt prezentate imagini ale formei picăturii obținute la determinarea unghiului de contact pentru biomasele uscate de drojdie de bere *codate* A1.1, A2.1, M1 și M4.

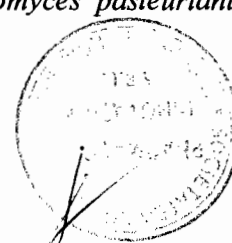
Biomasele uscate de drojdie de bere *codate* A1.1, A2.1, M1 și M4 prezintă caracter hidrofil, valorile obținute pentru unghiul de contact fiind mai mici decât  $90^\circ$ . Caracterul cel mai hidrofil este înregistrat pentru biomasa de drojdie de bere *codată* M1. Se observă că adaosul de drojdie de bere de la fabrică (M4) la drojdia de bere M1 în diferite rapoarte de amestecare determină o creștere a unghiului de contact, și implicit a caracterului hidrofob, comparativ cu valoarea unghiului de contact înregistrată la drojdia M1. De asemenea, se observă că rapoartele de amestecare de 1:1, respectiv 1:2 conduc la valori apropiate ale unghiului de contact comparativ cu cea înregistrată la drojdia de bere de la fabrică (M4).

**-Obținerea de suspensii derivate** din preparatele pe baza de drojdie de bere care utilizează produsul obținut prin cultivarea drojdiei *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515, din probele de drojdie uzate uscate pe valturi de la fabrica și de suspensii derivate din preparatele obținute prin amestecul în diferite rapoarte dintre drojdie de bere *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 cu drojdia uzată de bere.

Au fost preparate suspensii care au în formulare apă distilată ca fază lichidă, iar ca fază solidă biomasă uscată de drojdie de bere. Ca agenți de creștere ai vâscozității s-au folosit agar-agar și carboximetilceluloză sodică (CMCNa), iar ca agent de umectare tween 20.

### Exemplul 2.1

Suspensia a fost obținută prin procedeul descris în Exemplul 1.1, exceptând faptul că biomasa uscată de drojdie de bere, **codată A 1.1 biomasa uscată** (*Saccharomyces pasteurianus*)





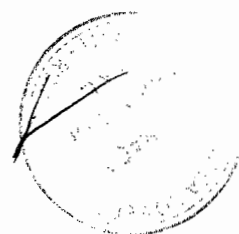
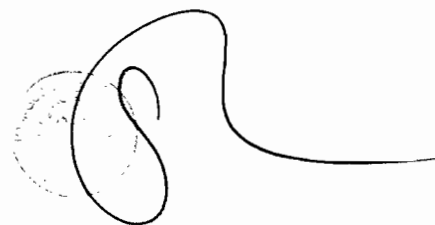
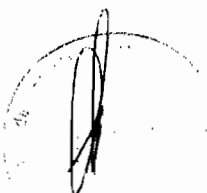
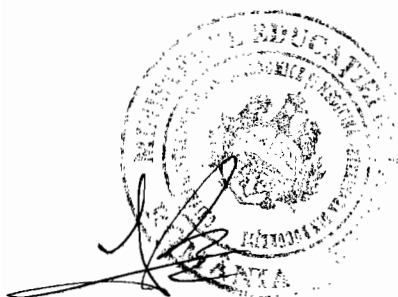
NCYC 515 dezvoltata la 28°; pH 4.5 cu drojdie uzata de bere) are un **raport de amestecare 1:1** între biomasa umeda de drojdia de bere obținută (*Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 dezvoltata la 28°; pH 4.5 ) (M1) și drojdia de bere de la fabrică (M4).

### Exemplul 2.2

Suspensia a fost obținută prin procedeul descris în Exemplul 1.1, exceptând faptul că biomasa uscată de drojdie de bere, **codată A 2.1**(biomasa uscata de *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 dezvoltata la 28°; pH 4.5 cu biomasa de drojdie uzata de bere) are un **raport de amestecare 1:2** între drojdia de bere obținută (biomasa umeda de *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 dezvoltata la 28°; pH 4.5) (M1) și drojdia de bere de la fabrică (M4).

### Exemplul 2.3

Suspensia a fost obținută prin procedeul descris în Exemplul 1.1, exceptând faptul că biomasa uscată de drojdie de bere, **codată M1** este drojdia de bere obținută din *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 dezvoltata la 28°; pH 4.5. La 24 ore de la preparare, suspensiile conform invenției (Exemplele 2.1-2.3 și Exemplul 1.5) au prezentat sediment și supernatant ușor decelabile. Gradul de redispersabilitate este de 95% la 24 de ore de la preparare, între 95-100% la 48 de ore de la preparare, respectiv 95% pentru toate suspensiile la 5 zile de la preparare. Gradul de floclare este cuprins între 0,91 și 1,28 la 24 ore de la preparare, respectiv între 0,88 și 1,08 la 48 ore de la preparare.



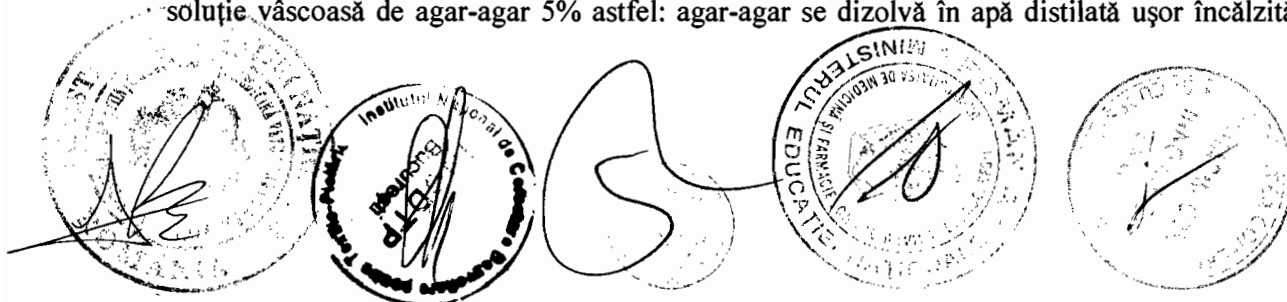
## REVENDICARI

1. Preparate de biomase de drojdii uscate active avand un continut de proteina, % s.u 50-53, **caracterizat prin aceea ca** este constituit dintr-un amestec in forma umeda din diferite rapoarte (1:1;1:2;1:3) de biomasa de drojdie uzata de bere si biomasa de drojdie de *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515.

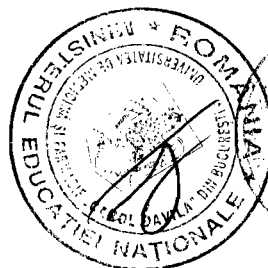
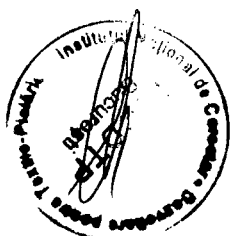
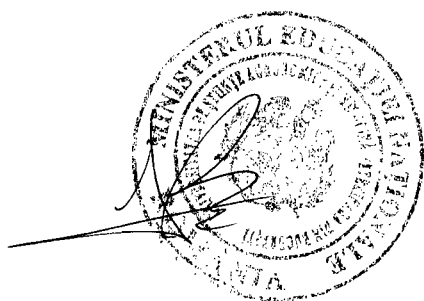
2. Preparate pe baza de biomase drojdii umede de *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 cu o compozitie conform revendicarii 1 **caracterizat prin aceea ca** se realizeaza prin insamantarea in raport de 10-15 % (v/v) inocul lichid a mediului de fermentatie pe baza de zaharoza/zahar alimentar care se adauga la 0 ore de cultivare si apoi pe parcurs in 2-4 portii dizolvate si sterilizate in prealabil, saruri de  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Mg^{2+}$ , la care se mentine constant pH-ul dorit (4.5; 5.1) cu o solutie amoniacala 5 % care este ajustat permanent automat cu o pompa peristaltica legata la bioreactor, temperatura de 28-30°C, debit de aer și agitare variabilă si apoi dupa 21h - 22h de cultivare, dupa care se realizeaza purificarea mediului fermentat, rezultand crema de drojdii care se amesteca in diferite rapoarte cu drojdia uzata de bere si este supusa uscarii prin liofilizare/valturi.

3. Suspensii derivate din preparatele pe baza de drojdie de bere uscate care utilizeaza produsul obținut prin cultivarea drojdiei *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515, din probele de drojdii uzate de la fabrica si de suspensii derivate din preparatele obtinute prin amestecul in diferite rapoarte dintre drojdie de bere *Saccharomyces pasteurianus* NCYC 515 cu drojdia uzata de bere, **caracterizat prin aceea că este alcătuită din următoarele componente**, exprimate în procente gravimetrice raportate la 100 mL de suspensie: a) 4 g biomasa uscată de drojdie de bere umectată cu b) 0,4 g tween 20; c) 0,2 g carboximetilceluloză sodică ce se adaugă sub formă de soluție vâscoasă 1% în apă distilată, soluție preparată în prealabil; d) 1,0 g agar-agar ce se adaugă sub formă de soluție vâscoasă 5% în apă distilată, soluție preparată în prealabil; e) apă distilată adăugată sub continuă agitare până la obținerea a 100 mL de suspensie.

4. **Procedee de obținere** al suspensiilor definite în revendicarea 3 **constă în aceea că:** (1) se prepară în prealabil o soluție vâscoasă de carboximetilceluloză sodică 1% astfel: carboximetilceluloza sodică se lasă la îmbibat în 10 mL de apă distilată, timp de 24 ore; CMCNa astfel îmbibată se dispersează în restul de apă distilată sub continuă agitare până la obținerea unei soluții vâscoase, omogene, de concentrație 1%; (2) se prepară în prealabil o soluție vâscoasă de agar-agar 5% astfel: agar-agar se dizolvă în apă distilată ușor încălzită,



sub continuă agitare, până la obținerea unei soluții vâscoase, omogene, de concentrație 5%; (3) 4 g de biomasă uscată de drojdie de bere, omogenizată în prealabil prin triturare, se umectează cu 0,4 g tween 20 și (4) se adaugă carboximetilceluloză sodică în concentrație de 0,2% ce se amestecă sub formă de soluție vâscoasă de carboximetilceluloză sodică 1% anterior preparată; (5) după omogenizare, se adaugă agar-agar în concentrație de 1% ce se amestecă sub formă de soluție vâscoasă 5% anterior preparată; (6) întregul amestec este apoi omogenizat, adăugând sub continuă agitare restul de apă distilată până la obținerea a 100 mL de suspensie.



DESENE

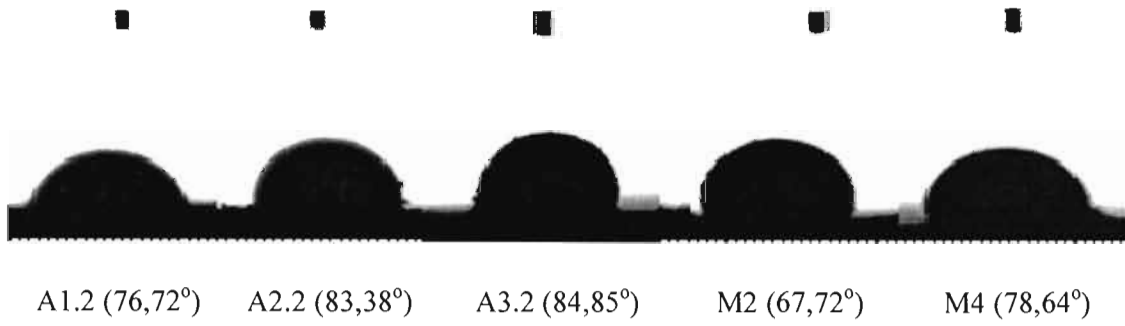
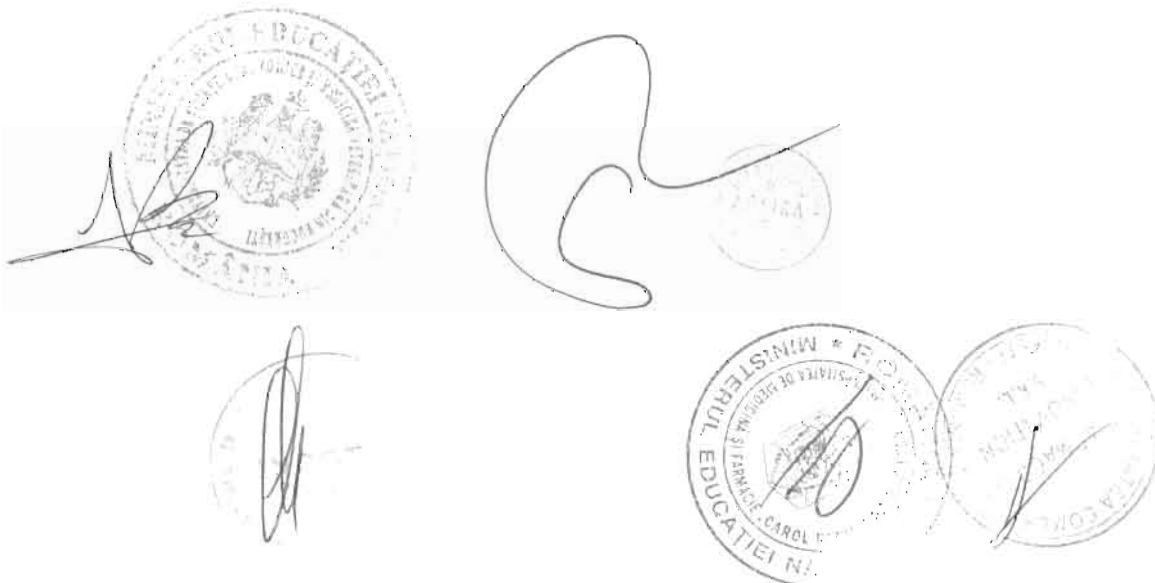


FIGURA 1



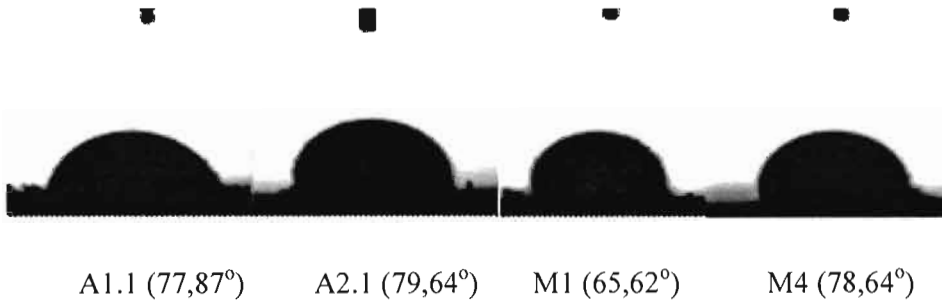


FIGURA 2

