



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00787

(22) Data de depozit: 10/10/2018

(41) Data publicării cererii:
29/05/2020 BOPI nr. 5/2020

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• AVICOLA BUCUREȘTI S.A.,
SPLAIUL UNIRII NR.16, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

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

(54) BIOPREPARAT PE BAZĂ DE DROJDIE CAROTENOGENĂ
ÎMBOGĂȚITĂ ÎN ZINC, PENTRU HRANA GĂNILOR
OUĂTOARE, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI UTILIZARE
A ACESTUIA

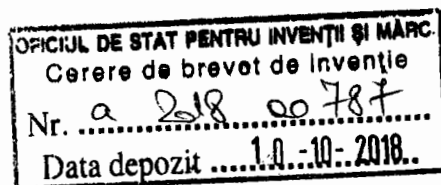
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biopreparat pe bază de drojdie carotenogenă îmbogățită în zinc utilizat într-o rețetă furajeră pentru hrana găinilor ouătoare. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de reactivare a tulpinii producătoare *Rhodotorula glutinis* CCY020-002-033, preparare a culturii inocul lichid, a culturii adaptate la zinc prin însămânțarea a 10% inocul în mediu conținând

0,010...0,015% ZnSO₄ + 7H₂O, incubare la 28...30°C timp de 24...48 h, însămânțarea inocului adaptat și suplimentat, rezultând un biopreparat având un conținut de zinc de 208...612 mg/100 g biomasă uscată și β-caroten de 2,4...7,1 mg/l.

Revendicări: 3





Biopreparat pe baza de drojdie carotenogena imbogatita in zinc, pentru hrana gainilor ouatoare si procedeu de obtinere si utilizare a acestuia

Inventia se refera la un biopreparat de drojdie carotenogena pe baza de biomasa de *Rhodotorula glutinis* izolata de pe frunze de salcie si indexata CCY 020-002-033, imbogatita in zinc organic, utilizat ca aditiv furajer in hrana gainilor ouatoare pentru cresterea parametrilor de calitate a oului de consum, pastrarea prospetimii oualor pe o durata mai mare de timp, si influenta benefica asupra fertilitatii si la procedeu de obtinere al acestuia.

In prezent sunt cunoscute cateva rapoarte privind efectul suplimentarii mediilor de cultura ale drojdiilor cu ioni metalici asupra obtinerii de biomasa imbogatita in metale, stimularii ratei de crestere si a productiei de carotenoide, pigmenti cu economica crescuta. Drojdiile rosii din genul *Rhodotorula* pot fi surse performante de carotenoide (β -caroten, torulen) si microelemente, datorita capacitatii de a acumula cationi divalenti (Ba, Fe, Mg, Mn, Ca, Zn, Co) din solutiile apoase in biomasa, furnizand elementele necesare in obtinerea alimentelor functionale (**Bhosale et al., 2001; Buzzini et al., 2005; Martinez et al., 2006; Dai et al., 2007, Marova et al., 2011**).

β -Carotenul este un pigment natural cu activitate antioxidanta protejand celulele fata de fotooxidare, datorita reactiei cu speciile reactive de oxigen, care au efect daunator la nivel celular asupra proteinelor (modificari conformationale, pierderea rolurilor enzimelor), lipidelor si acizilor nucleici (ruperea lanturilor de ADN) (**Edge et al., 1997**). Multe dintre proprietatile biologice ale carotenoidelor sunt atribuite efectului lor antioxidant (**Barzegari, Pavon-Djavid, 2014**) si in prezent sunt larg utilizate in alimentatie, medicina, cosmetica si in industria aditivilor furajeri.

Dintre sarurile minerale, zincul este un micronutrient esential in nutritia animalelor, initiand numeroase reactii biochimice si fiziologice in celula, cu rol in metabolismul proteinelor (component stabilizator), acizilor nucleici (replicarea si transcriptia ADN-ului in timpul diviziunii celulare fiind dependenta de zinc), carbohidratilor si al lipidelor si acizilor grasi (**Rebar et al., 2004; Valee et al., 1993**). Pentru a functiona la parametri optimi, peste 300 de enzime cu functii vitale necesita prezenta zincului. Zincul este asociat cu sistemul de aparare, mentine un nivel adecvat de

metalotioneina (proteina care blocheaza absorbtia sistemica a cuprului) si este parte structurala a superoxid dismutazei (SOD), care ajuta la protejarea celulelor impotriva radicalilor liberi (Bogani *et al.*, 2013). Acumularea zincului si a celorlalti ioni metalici din solutiile apoase in drojii se realizeaza prin biosorbtie pasiva, un proces independent de metabolism, care actioneaza prin mecanisme de legare a metalului de membrana celulara (legaturi coordinative, complexare, schimb de ioni, adsorbtie fizica), urmata de biosorbtia activa, faza de transport a zincului in interiorul celulei, dependenta de activitatea pompei protonice ATP-aza, si stocarea lui in sistemul vacuolar (Mowll *et al.*, 1983; Brady *et al.*, 1994; Nilanjana *et al.*, 2008). In acest fel se obtin biocomplexe (compusi organo-minerali), care maresc biodisponibilitatea microelementului in organismul animal si necesita doze mai mici.

Pentru obtinerea de biomasa de drojii imbogatita in minerale, drojdiile trebuie crescute in medii de cultura suplimentate cu concentratii optime de ioni metalici. Sunt cunoscute procedee de obtinere de produse pe baza de biomasa de *Saccharomyces* si *Candida* imbogatita in ioni metalici, prin captarea acestora si legarea de aminoacizi sau peptide cu masa moleculara mica, in timpul fermentatiei submerse: biomasa de *Candida* sp DBVPG37P imbogatita in fier si calciu, folosita ca biofortificant in produsele derivate de panificatie si suplimente alimentare pentru ajustarea deficientei de fier si calciu in organism (RO132485 A2); biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* imbogatita in cupru, zinc si mangan, ca aditiv furajer (RO125200 B1), sau adaptata sa capteze calciul din lactatul de calciu in concentratii de 400...6000 mg/100g fiind folosita pentru reglarea deficitului de calciu din organism (RO131952 A0), biomasa cu un continut de seleniu de maxim 3000 ppm, din care seleniu anorganic este < 50 ppm (RO122013 B1) cu efect profilactic si terapeutic in unele boli, biomasa drojdie furajera inactiva uscata in amestec cu drojdie inactiva imbogatita in zinc (RO130657 A2) ca supliment furajer mineralo-vitaminic-proteic.

Utilizarea resurselor de drojii rosii producatoare de pigmenti carotenoidici in zootehnie este limitata. Brevetul WO2012078256 A1 prezinta o metoda de fortificare in situ a nutreturilor cu astaxantin si β -caroten, prin amestecarea materialului furajer cu drojdiile rosii *Phaffia rhodozyma* si, respectiv, *Sporobolomyces roseus* sau o combinatie a lor si introducerea intr-un mediu de fermentatie, asigurandu-se parametri optimi

(compozitia mediului, temperatura, pH, aerare, agitare, lumina) necesari obtinerii carotenoidelor. Amestecul de fermentatie se usuca, iar continutul de carotenoide este de 100 mg/kg nutret. Prin asimilarea carotenoidelor din nutret este promovata starea de sanatate a animalelor rumegatoare si nerumegatoare.

Problema tehnica pe care o rezolva prezenta inventie se refera la obtinerea unui biopreparat pe baza de biomasa de *Rhodotorula glutinis* indexata CCY 020-002-033, cu functie dubla de sursa de pigmenti carotenoidici naturali, care imbunatatesc rezistenta la boli a gainilor, si de zinc legat organic de biomasa, protejandu-l de antagonisti, a carui biodisponibilitate este mai mare, maximizand absorbtia si eficacitatea lui. Zincul din hrana gainilor este transferat in galbenusul de ou cu o rata de absorbtie care depinde de concentratia lui in mediul de cultura si de interactiunile cu alte ingrediente din dieta. Asigurarea zincului organic determina reducerea continutului de zinc in dejectii, comparativ cu zincul anorganic a carui eliminare este de 70-75%.

Biopreparatul obtinut este un biocomplex organo-mineral care poate fi folosit in premixuri sau retete furajere conventionale, pentru cresterea valorii nutritive a recepturilor de nutret combinat, fiind si o alternativa la premixurile minerale anorganice care contin zinc cu efect poluant. Reteta furajera inovativa, conform inventiei, are pe langa componentele conventionale (porumb, malai, srot de floarea soarelui, ulei vegetal, aminoacizi) si biopreparatul obtinut, in cantitati care sa asigure continutul maxim de zinc de 150 mg/kg de furaj complet, conform Regulamentului CE nr. 1334/2003. Biopreparatul obtinut conform inventiei se poate incorpora in formula furajera prezentata in cantitate de 0,3g.....7,21g biomasa levuriana la 100g furaj, pentru a asigura continutul maxim de zinc de 150 mg/kg de furaj complet, conform Regulamentului CE nr. 1334/2003.

Reteta furajera continand biopreparatul se utilizeaza, conform inventiei, in hrana gainilor ouatoare in scopul obtinerii de oua de consum imbogatite in zinc pe cale nutritionala.

Ca element de noutate mentionam faptul ca tulpina *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033, achizitionata de la Culture Collection of Yeast (CCY), Bratislava, Slovacia, nu a mai fost utilizata pentru obtinerea de biomasa carotenogena imbogatita cu zinc conform procedurii descrise.

Procedeu de obtinere a biopreparatului pe baza de biomasa de drojdie carotenogena imbogatita in zinc, conform inventiei, presupune urmatoarele etape: reactivarea tulpinii producatoare (preinocul), prepararea inoculului, obtinerea culturii adaptate la concentratii mici de zinc, prelevarea inoculului adaptat la zinc, fermentatia propriu-zisa in mediu de cultura suplimentat cu sulfat de zinc heptahidrat, separarea biomasei levuriene, dezintegrarea si uscarea ei.

Testarea noii retete furajere, comparativ cu o reteta conventionala, s-a realizat pe loturi de gaini Lohmann Brown prin hranirea ad-libitum cu nutreturi combinate fabricate conform celor 2 retete furajere, cea inovativa si cea conventionala.

Avantajele aplicarii inventiei sunt:

- utilizarea tulpinii de drojdie carotenogena *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033, depozitata in Culture Collection of Yeast (CCY), Bratislava, Slovacia.
- obtinerea de biomasa carotenogena de *Rhodotorula glutinis* imbogatita in zinc
- prin dezintegrarea biomasei obtinute creste biodisponibilitatea carotenoizilor si a zincului organic
- obtinerea unui biopreparat nou, sursa organica de zinc dar si de β -caroten, care, introdus in compozitia noii retete furajere de nutreturi combinate determina imbogatirea oualor de consum in zinc
- reteta furajera noua continand biopreparatul imbunatateste rezistenta la boli a pasarilor, influenteaza pozitiv fertilitatea si imbogateste galbenusul oualor in zinc
- se poate utiliza ca atare, sub forma liofilizata, pentru a asigura necesarul de zinc, doza de utilizare fiind mai mica deoarece zincul fiind organic are o biodisponibilitate mai mare
- bioproces simplu si eficient
- procedeu cu impact ecologic, utilizarea acestui produs este sigura si prietenoasa pentru mediul inconjurator prin scaderea cantitatii de zinc din dejectii
- biomasa levuriana imbogatita in zinc se poate dezvolta si pe substrat furajer industrial semisolid, reprezentat prin ingrediente conventionale (malt, srot de soia, melasa, lapte praf) utilizate in recepturi furajere (nutreturi combinate).

Exemplul 1

Obtinerea biopreparatului pe baza de biomasa de drojdie carotenogena imbogatita in zinc

Reactivarea tulpinii producatoare (cultura stoc)

Coloniile de *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 se insamanteaza pe mediu YMA (Yeast Malt Agar) (g/L: 70 malt extract, 15 agar) sau YPD (g/L: 10 extract de drojdie, 20 peptona, 20 dextroza, 15-20 agar), in tub inclinat, se incubeaza la 28⁰....30⁰C, 2...4 zile si se pastreaza la frigider, la 4⁰C, la intuneric.

Prepararea inoculului de laborator

Inoculul de laborator se prepara prin transferarea, in conditii aseptice, a 2...4 anse de celule de *Rhodotorula* (aproximativ 1.3x10⁷ cells/mL) din cultura stoc in 20 mL de mediu lichid steril ATCC 200 (g/100 mL: extract de drojdie 0.3, malt extract 0.3, peptona 0.5, dextroza 1), incubare pe un agitator orbital timp de 24....72 ore, la 28⁰....30⁰C si 150.....200 rpm, pentru multiplicare pe substratul nutritiv corespunzator. Se realizeaza doua repicari succesive.

Adaptarea inoculului la mediu cu zinc

Cultura de inocul adaptata la mediul cu zinc se obtine prin insamantarea a 30 mL mediu ATCC continand 0,010%..... 0,015% ZnSO₄+7H₂O cu 10% suspensie inocul de laborator, incubare la 28⁰....30⁰C si 150.....200 rpm, 24....48 ore. Dupa doua repicari succesive, cultura de inocul adaptata la zinc a constituit materialul de insamantare a mediului de fermentatie (dezvoltare, multiplicare)

Obtinerea biopreparatului de drojdie carotenogena imbogatita in zinc

Mediul de fermentatie continand 2%...4% glucoza, 0,5....1% extract de drojdie, 0,4....0,6% (NH₄)₂SO₄, 0,3.....1% KH₂PO₄, 0,02.....0,05% MgSO₄.7H₂O, suplimentat cu 0,025%....0,050% ZnSO₄.7H₂O, dupa 14-16 ore de cultivare, in 2 etape pe parcursul fermentatiei, pH 6, se insamanteaza cu o alicota de 10% inocul adaptat, raportat la volumul total al mediului de fermentatie, si se incubeaza la 28⁰...30⁰C, 150...200 rpm, 5 zile.

Prelucrarea mediului de cultura

Biomasa de drojdie carotenogena imbogatita cu zinc se separa de mediul de cultura prin centrifugare, timp de 15 minute, la 4500 rpm la 20⁰C, se spala de doua ori cu apa distilata pentru indepartarea reziduurilor minerale din mediu aderente pe suprafata celulelor, se supune dezagregarii prin inghetare lenta pentru cresterea accesibilitatii la β-caroten si ionii de zinc si se usuca la 60⁰C in etuva cu vid pana la o umiditate < 10%.

Biopreparatul rezultat are urmatoarele caracteristici:

- aspect: pulbere
- culoare: bej-roz
- miros: caracterisric
- umiditate la 105⁰C: maxim 7%
- continut de β -caroten de 2,47,1 mg/L
- continut de zinc de 208.....612 mg/100g biomasa uscata (comparativ cu drojdia parentala care contine 7,67 mg/100 g)

Exemplu 2

Testarea noii retete furajere de nutreturi combinate

Reteta furajera inovativa structurata pe materii prime conventionale, la care se adauga ca aditiv furajer drojdie carotenogena imbogatita in zinc, s-a folosit comparativ cu o reteta conventionala, in furajarea, timp de 8 saptamani, a 2 loturi de gaini ouatoare Lohmann Brown in varsta de 48 de saptamani. La formularea retetei s-au avut in vedere cerintele nutritionale pentru gainile ouatoare (NRC,1994), cerintele producatorului hibridului Lohmann Brown si cantitatea de zinc din biopreparat confirmata prin analize chimice.

Compozitia retetei furajere inovative de nutreturi combinate

Materii prime	g %
Malai	19,12
Porumb (corn) 8%	30,94
Srot floarea soarelui 36%	6,67
Sun pro 45%	26,40
Ulei vegetal	4,70
Lizina	0,48
DL-metionina Degussa	0,04
L-treonina ADM	0,05
Carbonat de calciu 36%	8,47
Fosfat monosodic	1,06
Sare	0,27
Bicarbonat de sodiu	0,15
Biomin 0,5%	1,00
Colorant	0,05
Drojdie	0,37,21

Compozitia chimica a nutretului combinat este urmatoarea

Nutrienti	Valoare U.M.
Substanta uscata	88,66%
Energie metabolizabila	2850 Kcal/kg
Proteina bruta	18,70 %
Grasime bruta	6,39 %
Celuloza bruta	5,76 %
Calciu	3,70 %
Fosfor total	0,70 %
Fosfor accesibil	0,42 %
Sodiu	0,18 %
Clor	0,32 %
Lizina	0,98 %
Metionina	0,46 %
Metionina + cisteina	0,80 %
Treonina	0,72 %
Triptofan	0,23%
Acid linoleic (C18:2)	3,73 %
Energie metabolizabila/proteina bruta	Raport 152,41

Gainile au fost cazate in doua hale cu suprafata de 1200 mp fiecare, prevazute cu sistem de furajare, adapare, ventilatie, iluminat. Pe perioada experimentală iluminatul incandescent s-a derulat după o schemă cu 16 ore/24. Apa si hrana, constituita din nutreturile combinate fabricate conform celor 2 retete furajere, au fost asigurate ad-libitum.

**Biopreparat pe baza de drojdie carotenogena imbogatita in zinc, pentru hrana
gainilor ouatoare si procedeu de obtinere si utilizare a acestuia**

Revendicari

1. Biopreparat pe baza de biomasa de drojdie carotenogena *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 imbogatita in zinc, realizat conform revendicarii 1, cu un continut de zinc de 208.....612 mg/100g biomasa uscata si de β -caroten de 2,47,1 mg/L.
2. Procedeu de obtinere a biopreparatului pe baza de biomasa de drojdie carotenogena *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 imbogatita in zinc, conform revendicarii 1, caracterizat prin aceea ca parcurge urmatoarele etape:
 - reactivarea tulpinii producatoare *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033
 - prepararea culturii inocul lichid in flacoane cu ATCC 200 incubate pe un agitator orbital timp de 24....72 ore, la 28⁰....30⁰C si 150.....200 rpm
 - obtinerea culturii adaptate la zinc prin insamantarea a 10% suspensie inocul in mediu continand 0,010%..... 0,015% ZnSO₄+7H₂O, incubare la 28⁰....30⁰C si 150.....200 rpm, 24....48 ore
 - obtinerea biopreparatului de drojdie carotenogena imbogatita in zinc prin insamantarea inoculului adaptat in mediului de cultura continand 2%....4% glucoza, 0,5....1% extract de drojdie, 0,4....0,6% (NH₄)₂SO₄, 0,3.....1% KH₂PO₄, 0,02.....0,05% MgSO₄·7H₂O, suplimentat cu 0,025%....0,050% ZnSO₄·7H₂O, dupa 14-16 ore de cultivare, in 2 etape pe parcursul fermentatiei, pH 6, si incubare la 28⁰....30⁰C, 150...200 rpm, 5 zile.
 - prelucrarea mediului de fermentatie constand in separarea biomasei levuriene, dezintegrarea si uscarea ei
3. Reteta furajera de utilizare a biopreparatului pe baza de biomasa de drojdie carotenogena *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 imbogatita in zinc conform revendicarii 1, pentru obtinerea oului de consum imbogatit in zinc, caracterizata prin aceea ca are in compozitie 0,3g.....7,21g biomasa levuriana la 100g furaj, pentru a asigura continutul maxim de zinc de 150 mg/kg de furaj complet, conform Regulamentului CE nr. 1334/2003.