



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00826

(22) Data de depozit: 29/11/2019

(41) Data publicării cererii:
30/10/2020 BOPI nr. 10/2020

(71) Solicitant:
• LABORATOARELE MEDICA SRL,
STR. FRASINULUI NR. 11, OTOPENI, IF,
RO

(72) Inventatori:
• MORARU ANGELA, STR. PETRICANI
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• MORARU IONUȚ, STR. PETRICANI
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• BHRIM GABRIELA ELENA,
STR. PORTULUI NR.45, BL.MUREȘ, SC.2,
ET.3, AP.33, GALAȚI, GL, RO;
• VASILE AIDA MIHAELA, STR. PORTULUI
NR.49, BL.OLT1, ET.2, AP.9, GALAȚI, GL,
RO;
• COTĂRLEȚ MIHAELA,
STR.FURNALIȘTILOR, NR.2, BLE1, SC.4,
ET.3, AP.148, GALAȚI, GL, RO;
• OANCEA ANCA OLGUȚA, STR.PAȘCANI,
NR.5, BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE FERMENTARE A COLOSTRULUI
CU GRANULE AMELIORATE DE KEFIR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs nutraceutic cu activitate biologică reproductibilă. Procedeu, conform invenției, constă în prepararea culturii starter prin cultivare pe colostru a unei tulpini de drojdie producătoare de proteaze și lipaze, inoculate cu min 2, 5 x 10⁸ UFC/ml, respectiv, inoculare cu 0,2 g granule de kefir artisanale și 0,2 g tulpini de bacterii lactice comerciale și dezvoltarea timp de 48 h, rezultând 100 ml cultură starter de laborator, care se utilizează pentru a inocula 1 l colostru reconstituit,

rezultând cultura starter primară, secundară, respectiv, cultura industrială, care se continuă până la atingerea unui nivel de 0,5 mg/ml proteine totale, o activitate antioxidantă de minimum 2,2 microM și un potențial de inhibare a enzimei de conversie a angiotensinei de cel puțin 50%, și uscarea prin pulverizare a produsului culturii industriale.

Revendicări: 2



78

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>a 2019 00826</u>
Data depozit <u>29-11-2019</u>

PROCEDEU DE FERMENTARE A COLOSTRULUI CU GRANULE AMELIORATE DE KEFIR

Prezenta invenție se referă la un procedeu de fermentare a colostrului cu granule ameliorate de kefir, în vederea obținerii unui produs nutraceutic cu activitate biologică reproductibilă.

Sunt cunoscute diferite produse nutraceutice pe bază de colostru. Colostru, prima secreție a glandelor mamare după naștere, este un produs cu un conținut ridicat de peptide bioactive (Korhonen & Pihlanto, 2007, *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 829-843). Disponibilitatea colostrului este însă variabilă, depinzând de rata fătărilor, iar efectele antioxidante, anti-hipertensive și anti-inflamatorii ale colostrului sunt variabile (Lee et al. 2019, *Journal of Dairy Science*, 102(10), 8614-8621), fiind necesare diferite procedee pentru a asigura reproductibilitatea acestora. Cererea de brevet US2017087186 descrie un supliment nutritiv pe bază de concentrat de colostru, în care sunt standardizate diferitele peptide, ca de exemplu: factorul de creștere asemănător insulinei (IGF-1), factorul de creștere transformant - beta 2 (TGF- β 2) sau peptidele bogate în prolină (PRP).

Întrucât concentrarea și standardizarea colostrului în peptide bioactive implică costuri ridicate, sunt necesare alternative mai accesibile și cu eficiență cel puțin similară. Una dintre metodele care asigură o reproductibilitate superioară a activității biologice este fermentarea produselor lactate, în special în cazul utilizării consorțiilor de microorganisme (Netsanet & Augustin, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, doi: 10.1080/10408398.2019.1666250). De ex. fermentarea cu granule de kefir, formate din bacterii lactice și drojdii, determină o amplificare a proprietăților benefice ale produselor lactate, datorită formării de noi tipuri de peptide, cu acțiune sinergică / complementară peptidelor factor de creștere deja existente (Bengoa et al. 2019. *Journal of Applied Microbiology*, 126(3), pp.686-700). Brevetul TWI530292 B se referă la concentrarea din lapte fermentat cu kefir a unei peptide cu masa moleculară de 3 kDa, care are o activitate de tratarea și/sau prevenire a bolilor asociate sindromului metabolic. Și în acest caz aplicarea procedurii propus implică costuri semnificative.

Brevetul EP3031331 prezintă diferite tipuri de produse lactate, cum ar fi smântâna, frișcă, lapte aromatizat și produse lactate lichide aromate, produse lactate fermentate (precum iaurturi, lapte fermentat, kefir, sana, iaurt cu probiotice, lapte bătut), produse



lactate condensate, sau uscate prin pulverizare, proteine din lapte, inclusiv cazeinați, brânză (inclusiv brânză proaspătă și brânză fermentată), unt, suplimentate cu un conținut de 0,01 până la 45% de colostru. La fabricarea produselor lactate menționate pot fi folosite laptele de vacă, capră, oaie, bivoliță sau de iapă. Brevetul nu revendică nici un procedeu de standardizare a activității biologice a produselor lactate.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un procedeu prin care să se amplifice în mod reproductibil activitatea biologică a colostrului, prin fermentare cu granule ameliorate de kefir.

Procedeu conform invenției constă în următoarea succesiune de etape:

- ✓ Se obține 1 litru de cultură starter primară, prin inocularea a 100 ml cultură starter de laborator pe colostru, reconstituit prin dizolvarea a 80 g colostru bovin pulbere într-un litru de apă, omogenizat și sterilizat prin încălzire timp de 10 min la 105°C, și cultivare timp de 72 ore în microaerofilie, la 30°C;
- ✓ Se obțin 10 litri de cultură starter secundară, prin inocularea a 1 litru cultură starter primară pe colostru, reconstituit prin dizolvarea a 800 g colostru bovin pulbere în 10 litri de apă, omogenizat și sterilizat prin încălzire timp de 10 min la 105°C și cultivare timp de 72 ore în microaerofilie, la 30°C;
- ✓ Se obțin 100 litri de cultură industrială, prin inocularea a 10 litri cultură starter secundară pe colostru, reconstituit prin dizolvarea a 8 kg colostru bovin pulbere în 100 litri de apă, omogenizat și sterilizat prin încălzire timp de 10 min la 105°C și cultivare timp de circa 70 ore în microaerofilie, la 30°C, până la atingerea unui nivel de 0,5 mg/ml proteine totale, cu o activitate antioxidantă de cel puțin 2,2 μM și un potențial de inhibare a enzimei de conversie a angiotensinei de cel puțin 50%.
- ✓ Uscare prin pulverizare a culturii industriale, la o temperatură de intrare de 120-140°C și o temperatură de ieșire de 70-75°C.
- ✓ Cultura starter se obține prin cultivare pe colostru reconstituit din 8 g colostru bovin pulbere în 100 ml de apă, omogenizat și sterilizat prin încălzire timp de 10 min la 105°C, a unei tulpini de drojdie producătoare de proteaze și lipaze, inoculate ca min 2,5x10⁸ ufc/ml, timp de 48 ore, la 30°C, cu agitare la 150 rpm, urmată de inoculare de 0,2 g granule de kefir artisanale și 0,2 g tulpini de bacterii lactice comerciale și dezvoltarea timp de 48 ore.

Avantajele procedurii conform invenției sunt următoarele:

- Se obține în final un produs care are efecte fiziologice reproductibile, datorită utilizării unor metode analitice simple de determinare a activității antioxidante și de inhibare a enzimei de conversie a angiotensinei (anti-hipertensive);
- Procedul se poate aplica pe tot timpul anului, datorită utilizării colostrului reconstituit din colostru bovin atomizat;
- Aplicarea procedurii nu necesită investiții în echipamente de procesare sau de analiză cu preț ridicat.

În cele ce urmează se prezintă un exemplu de aplicare a invenției, care o ilustrează fără a o limita.

Exemplu 1. Într-un flacon Erlenmayer de 500 ml se reconstituie 100 ml de colostru, prin dizolvarea și omogenizarea a 8 g colostru bovin pulbere în 100 ml de apă. Flaconul Erlenmayer se acoperă cu dop de vată și se sterilizează, împreună cu colostru reconstituit prin încălzire la autoclavă timp de 10 min la 105°C. În acest flacon Erlenmayer se inoculează tulpină de drojdie producătoare de proteaze și lipaze, cum este de exemplu *Candida lipolytica* MIUG D67. Se cultivă pe agitator rotativ, timp de 48 ore, la 30°C, cu agitare la 150 rpm. După cele 48 ore de cultivare a drojdiei proteolitice, se inoculează cei 100 ml de cultură de drojdie cu 0,2 g granule de kefir artisanale (conținând bacterii lactice și tulpini de drojdie) și cu 0,2 ml tulpini de bacterii lactice comerciale (de ex. Fresh Q4, Christian Hansen, Hoersholm, Denmark). Se obțin în final 100 ml cultură starter de laborator, care este utilizată pentru a inocula 1 litru colostru. Acest colostru este reconstituit prin dizolvarea a 80 g colostru bovin pulbere într-un litru de apă, într-un balon de reacție de 3 litri, omogenizat și sterilizat prin autoclavare timp de 10 min la 105°C. După inoculare cu cultura starter de laborator se cultivă timp de 72 ore în microaerofilie, la 30°C, obținându-se 1 litru cultură starter primară. Cultura starter primară se folosește pentru a se inocula 10 litri de colostru. Acest colostru este reconstituit prin dizolvarea a 800 g colostru bovin pulbere în 10 litri de apă, într-un bioreactor de laborator de 25 litri. Colostru reconstituit este omogenizat și sterilizat prin încălzire timp de 10 min la 105°C. După inoculare se cultivă timp de 72 ore în microaerofilie, la 30°C. Cei 10 litri de cultură starter secundară se folosesc pentru a obține 100 litri de cultură industrială. Într-un bioreactor de 200 litri se reconstituie 100 litri colostru, prin dizolvarea a 8 kg colostru bovin pulbere în 100 litri de apă. Colostru reconstituit este omogenizat și sterilizat prin încălzire timp de 10 min la 105°C. După inoculare a 10 litri cultură starter secundară pe colostru reconstituit, se cultivă timp de circa 70 ore în microaerofilie, la 30°C, până la atingerea

unui nivel de 0,5 mg/ml proteine totale, cu o activitate antioxidantă de cel puțin 2,2 μM și un potențial de inhibare a enzimei de conversie a angiotensinei de cel puțin 50%. Produsul obținut se usucă prin pulverizare (de exemplu pe un uscător prin pulverizare Niro Minor Unit), la o temperatură de intrare de 120-140°C și o temperatură de ieșire de 70-75°C.

Determinarea conținutului de proteine în cultura industrială se face folosind metoda cu acid bicinconinic (BCA) (Smith et al. 1985, *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85). Reactivul BCA este preparat prin amestecul unei soluții de acid bicinconinic și 4% CuSO_4 (50:1). Un volum de probă de 20 μL se amestecă cu 160 μL reactiv BCA, iar soluția obținută este incubată 30 min la 37°C. Absorbanta probelor se măsoară la 562 nm, utilizând cititorul de plăci SPECTROstar Nano BMG Labtech. Ca standard se utilizează o soluție de albumină serică bovină cu concentrații în domeniul 0.05 - 2 mg/mL

Activitatea antioxidantă a probelor din colostru din cultura industrială este evaluată folosind metoda ABTS, descrisă de Crăciunescu și colab. (2012, *Chemistry Central Journal*, 6, 97.). Radicalul ABTS este generat prin amestecul unei soluții de ABTS 7mM cu $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2.45 mM și incubarea soluției 12-16 ore la temperatura camerei, în întuneric. Soluția obținută este apoi diluată cu apă distilată până la o valoare a absorbantei de 0,700 \pm 0,02, citită la 734 nm. Un volum de probă de 100 μL se amestecă cu 1 mL soluție ABTS, iar absorbanta se citește, după 6 min de incubare, la 734 nm, utilizând spectrofotometrul UV-VIS Jasco, V-650. O soluție de Trolox cu concentrații din domeniul 0-250 μM este utilizată ca standard, iar valorile rezultate se exprimă ca mM Trolox/mL.

Potențialul de inhibare al ACE s-a determinat utilizând metoda descrisă de Papadimitriou și colab. (2007, *Food Chemistry*, 105, 647-656.). Un volum de probă de 50 μL se amestecă cu 180 μL soluție hipuril-L-histidil-L-leucină 5 mM, dizolvat în tampon borat de sodiu 100 mM și NaCl 300 nM, pH 8.3. După 5 min se adăugă 20 μL ACE (2 mU), iar amestecul rezultat se incubează la 37°C, timp de 90 min. Reacția se stopează cu 250 μL HCl 1N, iar acidul hipuric rezultat se extrage cu 1.7 mL acetat de etil, care ulterior se evaporă la 100°C, timp de 15 min. Reziduul rezultat se dizolvă într-un mL de apă și se măsoară absorbanta la 228 nm. Activitatea de inhibiție a enzimei se exprimă procentual (% de inhibiție).

Revendicări

1. Procedeu de fermentare a colostrului cu granule ameliorate de kefir conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: Obținerea culturii starter primară, prin inocularea a 100 ml cultură starter de laborator pe colostru, reconstituit prin dizolvarea a 80 g colostru bovin pulbere într-un litru de apă, omogenizat și sterilizat prin încălzire timp de 10 min la 105°C, și cultivare timp de 72 ore în microaerofilie, la 30°C; obținerea culturii starter secundară, prin inocularea a 1 litru cultură starter primară pe colostru, reconstituit prin dizolvarea a 800 g colostru bovin pulbere în 10 litri de apă, omogenizat și sterilizat prin încălzire timp de 10 min la 105°C și cultivare timp de 72 ore în microaerofilie, la 30°C; obținerea culturii industriale, prin inocularea a 10 litri cultură starter secundară pe colostru, reconstituit prin dizolvarea a 8 kg colostru bovin pulbere în 100 litri de apă, omogenizat și sterilizat prin încălzire timp de 10 min la 105°C și cultivare timp de circa 70 ore în microaerofilie, la 30°C, până la atingerea unui nivel de 0,5 mg/ml proteine totale, cu o activitate antioxidantă de cel puțin 2,2 μ M și un potențial de inhibare a enzimei de conversie a angiotensinei de cel puțin 50%; uscare prin pulverizare a culturii industriale, la o temperatură de intrare de 120-140°C și o temperatură de ieșire de 70-75°C.

2. Procedeu de fermentare a colostrului cu granule ameliorate de kefir conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** se obține cultura starter prin cultivare pe colostru, reconstituit prin 8 g colostru bovin pulbere în 100 ml de apă, omogenizat și sterilizat prin încălzire timp de 10 min la 105°C, a unei tulpini de drojdie producătoare de proteaze și lipaze, inoculate ca min $2,5 \times 10^8$ ufc/ml, timp de 48 ore, la 30°C, cu agitare la 150 rpm, urmată de inoculare de 0,2 g granule de kefir artizanale și 0,2 g tulpini de bacterii lactice comerciale, și dezvoltarea timp de 48 ore.