



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00684

(22) Data de depozit: 30/10/2020

(41) Data publicării cererii:  
29/04/2021 BOPI nr. 4/2021

(71) Solicitant:  
• PHARMACORP INNOVATION S.R.L.,  
SPLAIUL UNIRII NR. 313, ET. 2, CAM.6,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• BĂRBULESCU IULIANA DIANA,  
ALEEA MACULUI, BL. FA22, SC. A, ET. 2,  
AP. 5, SLATINA, OT, RO;  
• MĂRCULESCU SIMONA-IOANA,  
ȘOS. IANCOLUI NR.68, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PRODUS PE BAZĂ DE BIOMASĂ DE DROJDIE ÎMBOGĂȚITĂ  
ÎN ZINC ORGANIC ȘI PROCEDU DE OBȚINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs pe bază de biomasă de drojdie îmbogățită în zinc organic utilizată ca ingredient furajer cu acțiune antioxidantă. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de obținere a materialului biologic deus la colecția de tulpini DBVPG *Metschnikowia\_pulcherrima* DBVPG 43 P și *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere *Saccharomyces cerevisiae*, prepararea culturii de întreținere, urmată de cultivare pe mediu agarizat, cu incubare la temperatura de 30°C, timp de 2 zile, prepararea culturii preinocul, respectiv, culturii inocul generația 1 și generația 2, urmată de fermentație, în mediu de fermentație pe bază de extract de drojdie,

glucoză, zaharoză, KCl, MgSO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> și apă, cu adaosuri de NaOH pentru corecția pH și soluții sterile de glucoză și zaharoză și soluție de sulfat de zinc, în condiții de temperatură de 30°C, timp de 17...20 h, cu 110...115 rpm, rezultând un produs pe bază de biomasă umedă de drojdii (WCW), 1150-2644 g/65l, analizat sub formă uscată cu o umiditate de aproximativ 6, 32...9, 32%, se prezintă ca 810...2700 mg/kg drojdie zinc organic, polifenoli 160...470 mg/100 g echivalent acid galic și 7,003% fibră brută.

Revendicări: 12



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
No.	a 2020 0684
Data depozit	30-10-2020

## DESCRIERE

### PRODUS PE BAZA DE BIOMASA DE DROJDIE ÎMBOGĂȚITĂ ÎN ZINC ORGANIC ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Invenția se referă la o nouă tehnologie de obținere de biomasa de drojdie îmbogățită în zinc organic ce poate fi utilizată ca ingredient furajer cu acțiune antioxidantă. Biomasa de drojdie îmbogățită în zinc a utilizat tulpinile *Metschnikowia pulcherrima* DBVPG 43P și *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere *Saccharomyces cerevisiae*.

Drojdiile îmbogățite cu zinc pot fi o nouă formă organică pentru utilizare în rețetele furajere. Este cunoscută invenția "Biopreparat pe bază de drojdie carotenogenă îmbogățită în zinc, pentru hrana găinilor ouătoare, și procedeu de obținere și utilizare a acestuia" RO201800787A•2018-10-10, biopreparat pe bază de drojdie carotenogenă îmbogățită în zinc utilizat într-o rețetă furajeră pentru hrana găinilor ouătoare. Invenția utilizează o tulpină deja de colecție NCCY 020-002-033, prepara o cultură inocul lichid, a culturii adaptate la zinc prin însămânțarea a 10% inocul în mediu conținând 0,010...0,015%  $ZnSO_4 + 7H_2O$ , 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  $\beta$ -caroten de 2,4...7,1 mg/l.

Invenția cu titlul de mai sus prezintă o absorbție de zinc total, dar dezavantajul acesteia este că nu este cunoscut și zincul organic și rata de transformare a anorganicului în organic. Formele organice sunt mult mai bine asimilate de către organism iar acest lucru nu este prezentat în mod clar. Invenția utilizează drojdiile roșii.

Invenția "CN107119038A Zinc-enriched yeast product and production method thereof" dezvăluie un produs de drojdie îmbogățit cu zinc și o metodă de producție a acestuia. Produsul de drojdie îmbogățit cu zinc este dovedit a avea eficiență pentru creșterea sănătoasă a porcilor și pentru protecția mediului.

Invenția cu titlul "CN106387340A High-zinc selenium-enriched additive for laying hen feed, laying hen feeding method and selenium-enriched high-zinc eggs" se referă la un aditiv bogat în zinc bogat în seleniu pentru hrana găinii ouătoare, la o metodă de hrănire a găinii ouătoare și la ouă bogate în zinc și în seleniu. Aditivul bogat în zinc îmbogățit cu seleniu, metoda de hrănire a găinilor ouătoare și ouăle bogate în zinc și în seleniu se caracterizează prin aceea că un agent de întărire general îmbogățit cu seleniu frecvent utilizat nu este utilizat într-un proces de producție, ci cu un nou agent și anume zinc chelat cu aminoacizi, doza de zinc chelat cu aminoacizi este crescută la 60-80g pentru fiecare 100 kg de furaj; efectele îmbogățite cu zinc sunt bune. Se obțin ouă bogate în zinc, bogate în seleniu, cu un conținut de seleniu de 439-460 g / kg și un conținut de zinc de 37,5-38,2 mg / kg.

Invenția "CN107043712A Method for preparing iron and zinc-enriched trace element yeast" aparține domeniului tehnic al creșterii animalelor și se referă la o metodă de îmbogățire a oligoelementelor prin utilizarea unui microorganism, în special la o metodă de fermentare a fierului și zincului cu *Saccharomyces cerevisiae* pentru a produce un aditiv pentru hrana drojdiei bogat în fier organic și zinc organic. După sterilizare se adaugă soluția apoasă de sulfat feros și sulfat de zinc, astfel încât conținutul de sulfat feros din mediul fermentat este de 0,01-0,05%, conținutul de sulfat de zinc este de 0,01-0,05% și cultura este continuată timp de 24-48 ore.



Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in tehnologie noua de obtinere de bioamasa de drojdie imbogatita in zinc organic.

Spre deosebire de alte produse, aceasta are cel mai mare continut de zinc organic (max 76%) si elimina dezavantajul utilizarii de drojdii cu un continut mai scazut de 50 % zinc organic.

Produsul, conform inventiei, se obtine prin urmatorul procedeu:

### 1. Obtinerea materialului biologic:

Tulpina *Metschnikowia pulcherrima* DIANA10\_D1D2 a fost izolata si a fost identificata prin secventiere. Domeniile D1/D2 ale ADNr 26S in doua cazuri regiunile a ANDr ITS1 si ITS2 incluzand gena ARNr 5.8S a tulpinii au fost secventiate. A obtinut numar de depozit DBVPG 43P

Prepararea culturii de intretinere de *Metschnikowia pulcherrima* 43P si *Candida sp.* DBVPG 37P, urmata de cultivarea *Metschnikowia pulcherrima* 43P si/sau tulpina *Candida sp.* DBVPG 37P pe mediu inclinat agarizat YMSP agarizat (extract de drojdie, peptona hy-soy, zahar alimentar, peptone, agar) incubate pentru pentru 30°C timp de 2 zile;

### 2. Obtinerea de biomasa de drojdii umede imbogatita in zinc la nivel pilot (65l Volum Util)

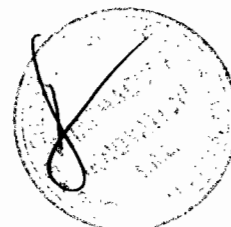
**Prepararea culturii preinocul** *Metschnikowia pulcherrima* 43P si/ *Candida sp.* DBVPG37P – cultivarea acestora in tuburi cu mediu inclinat agarizat YMSP agarizat (extract de drojdie, peptone hy-soy, zahar alimentar, agar) incubate pentru 28-30°C timp de 30-48h. Au fost utilizate 4-8 tuburi de cultura de drojdie pentru urmatoarea etapa;

**Prepararea culturii inocul generatia 1:** Mediu de cultura folosit pentru prepararea inoculului lichid 150 ml/flacon YSPG (150 ml/flacon extract de drojdie 0,5 g%, peptonă 0,4 g%, zaharoza 4 g%, glucoza 3 %) /YSP este insamanta cu ½ tuburi din consortiul de drojdii, cultivat la o temperatura: 28-30°C, viteza de agitare: 140-200 rpm, incubat timp de 17-20 ore, într-un incubator de agitare

**Prepararea Inoculului intermediar- Generatia 2**

**Mediul fermentatie Inocul 2 identic** cu mediul fermentatie inocul 1- dar cu Volum util 3.2 L la nivel fermentator inoculate cu inocul 1 dezvoltat lichid, in anumite conditii de process, si anume: 250 rpm rotatii, temperatura 30°C, debit aer: 0.5l/mediu/min; durata de cultivare 8-9 h cu ajustare pH pe parcursul fermentatiei cu ajutorul pompei peristaltice cu o solutie bazica de hidroxid de sodiu 10 %. Procesul se finalizeaza cand se ajunge la o s.u de 2-2.5 si un pH in jur de 4.0.

**Fermentatia la nivel pilot: Prepararea produsului pe baza de biomasa de drojdii active imbogatite in zinc la nivel pilot cu 65 l Vu (120 Vt) mediu de fermentatie pe baza de:** Extract de drojdie 0.7 %; glucoza 4% si zaharoza 4%/glucoza 8%/zaharoza 8%, KCl 0.05 %; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 0.05 %; NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 %, apa de la osmoza inversa, care apoi este sterilizat SIP la 115°C timp de 20' si apoi mediul se raceste la 30 °C, apoi este insamnatat cu inocul generatia 2 (4L), si se fermenteaza timp de 17-20 h la 30 °C cu 110-115 rpm. Se utilizeaza o linie pilot ce utilizeaza (fermentator pilot, apa osmoza inversa, compressor aer, uscator aer). Pe parcursul fermentatiei la nivel pilot se realizeaza corectii de pH cu solutie de NaOH 10%, si adaosuri de solutie de sulfat de zinc 6 % pregatita inainte de adaosurile propuse, si solutii sterile de zahar, apoi, la final, mediul fermentat este scos din bioreactor si se separa pana la obtinerea biomasei umede de drojdii imbogatite in zinc, urmeaza purificarea prin spalari repetate a biomasei umede cu apa distilata sterile, obtinandu-se in final un produs umed care prezinta urmatoarele caracteristici: 1150 – 2644 g/65l WCW (biomasa umeda) , zinc total 810- 2700 mg/kg drojdie, zinc organic 560-1390 mg/kg drojdie, zinc anorganic 100-1250 mg/kg drojdie, polifenoli mg/100g acid galic intre (160-470). Randamentul de transformare in zinc organic este de maxim 76 %.



-soluție de sulfat de zinc heptahidrat- preparată prin dizolvarea a 3/6 % soluție de heptahidrat de sulfat de zinc , pH ~ 5,3-5,5 (18 g la 300 ml) la 27 g (450 ml) sau (24.36 g sulfat de zinc in 410 ml de apa si se repartizeaza in 5 portii a cate 82 ml (soluție 6 %). Soluția a fost filtrată utilizând seringi cu filtru Nalgene, dimensiune a porilor 0,2 pm, diametru 13 mm.

#### Obținerea mixului de sarje la nivel pilot

##### Avantajele pe care le prezinta inventia:

- obținerea de biomasa de drojdie umeda imbogatita in zinc cu un radament de bioconversie al formelor anorganice in organice de max 76 %
- Utilizarea drojdiei imbogatita in zinc la nivel pilot ca ingredient de zinc organic
- poate fi uscata prin procedee cunoscute

#### Mai jos se dau cateva exemple de obtinere de noi produse:

##### EXEMPLUL 1.

##### Obținerea culturii de întreținere "stoc" (cultura statică):

Mediul de cultură pentru obținerea culturii de întreținere "stoc" (drojdie de bere si vin selectată) sunt sterilizate prin autoclavare la 110°C. Culturile (drojdie de bere si vin selectată) au fost crescute pe tuburi de agar (înclinate) și plăci conținând volume de 15 ml medii de cultivare bazate pe extract de drojdie, peptonă de soia, zaharoză, agar-agar (YSP-agarizat) - 30°C timp de 48 de ore.

**Obținerea preinoculului:** drojdiile selectate de vin si/ bere *Metschnikowia pulcherrima* DBVPG 43P si *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere *Saccharomyces cerevisiae* sunt obținute dintr-o cultură de întreținere care este cultivate pe mediu bazat pe extract de drojdie, peptonă de soia, glucoză/zaharoza, agar-agar YPG-agar/YSP agar și incubat la 28-30°C pentru 34-48 h. Mediile de cultură pentru preinocul sunt sterilizate prin autoclavare la 120°C.

**Obținerea culturii inocul (cultura lichida) (YSP1):** Mediul de cultura folosit pentru prepararea inoculului lichid YPS: extract de drojdie 0,5 g%, peptonă 0,4 g%, zaharoza 7 g%

**Condiții de cultivare:** Temperatura: 28-30°C, viteza de agitare: 140-200 rpm.

Inoculul a fost preparat dintr-o cultură preinocul (cultura stoc) în flacoane Erlenmeyer de 500 ml conținând 150 ml mediu lichid YSP1. pH-ul inițial al inoculului a fost de 5,0-6,0. Inoculul a fost incubat timp de 17-20 ore la 30 ° C, la 240 rpm, într-un incubator de agitare.

Inocul dezvoltat cu drojdie de vin+drojdie de bere (600 ML), agitare 240 rpm la 28-30°C – YSP

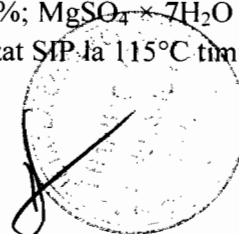
**Obținerea de inocul intermediar** – pe baza de YSP 2-4L – extract de drojdie 0.5 g%; zahar 7 g %; peptone 0.5 g%, Parametrii de cultivare: 250 rpm rotatii, temperatura 30°C, debit aer: 0.5l/l mediu/min

Preparare soluție bazica de hidroxid de sodiu 10 % pentru ajustare pH in timpul fermentatiei.

##### YSP2 – SARJA 1

Durata de cultivare (h)	pH	s.u	Adaosuri
0	4.35	8.5	Adaos inocul YSP1 (600 ml)
4	3.75	6.5	NaOH10% corectie la 4.8
7	3.66	3-3.5	NaOH10% pana la 4.55
8	4.06	2.5	STOP

**Fermentatia la nivel pilot: Prepararea produsului pe baza de biomasa de drojzii active imbogatite** in zinc la nivel pilot cu 65 l Vu (120 Vt) mediu de fermentatie pe baza de: Extract de drojdie 0.7 %; glucoza 4% si zaharoza 4%, KCl 0.05 %; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 0.05 %; NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 %, apa de la osmoza inversa, care apoi este sterilizat SIP la 115°C timp de 20'



si apoi mediul se raceste la 30 °C, apoi este insamnatat cu inocul generatia 2 (4L), si se fermenteaza timp de 17-20 h la 30 °C cu 110-115 rpm. Se utilizeaza o linie pilot ce utilizeaza (fermentator pilot, apa osmoza inversa, compressor aer, uscator aer). Pe parcursul fermentatiei la nivel pilot se realizeaza corectii de pH cu solutie de NaOH 10%, si adaosuri de solutie de sulfat de zinc 6 % pregatita inainte de adaosurile propuse, si solutii sterile de zahar.

**MF FERMENTATIE SARJA1**

Materii prime	g %	g
Extract de drojdie	0.7	455
Zahar	8	5200
KCl	0.05	32.5
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.05	32.5
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	65
Apa osmoza inversa	100	61 L (se va aduce la 65 L dupa ce se vor adauga la 0h 4 L inocul YSP2)
Se dizolva si se sterilizeaza 115°C timp de 20'		
Fermentator racire la 30 °C		

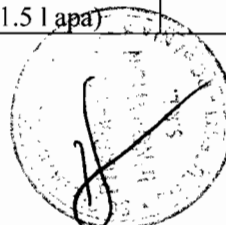
<b>Parametrii de cultivare sarja 1: Fermentatie pilot</b>
Turatie: 120 rpm -150 rpm
pH inainte de inoculare: 5.46
pH dupa inoculare: 5.19
Temperatura:30°C
Pe parcursul cutivarii s-a realizat corectie la pH 5
18 g Sulfat de zinc dizolvat in 300 ml apa distilata pH Zn =5
3 portii a cate 100 ml de zinc adaos cu seringa cu filtre sterile Nalgene
4 portii a 650 g zahar /1500 ml apa

- soluție de sulfat de zinc - preparată prin dizolvarea a 6g de heptahidrat de sulfat de zinc (Sigma Aldrich) în 100 ml apă distilată, pH ~ 5,3-5,5
- soluția a fost filtrată utilizând seringi cu filtru Nalgene, dimensiune a porilor 0,2 pm, diametru 13 mm.

Pe parcursul fermentatiei au mai fost adaugate steril in afara de sursa de zinc si solutii sterile de zahar. Corectia pH s-a realizat cu solutie de 10 % NaOH.

**Fermentatie la nivel pilot sarja 1**

Durata de cultivare (h)	pH	su	Adaosuri	
0	5.2	9	inocul 4L- Inoculare YSP2 + 3 ml antisfumant inainte de inoculare	
10	4.8	3.5	1 PZ zahar (650g/1.5 l apa)	
	4.77		corectie pH cu solutie NaOH la 5.27	
11	5.21	4	100 ML solutie zinc sulfat 6 %	pH solutie Zn =5
	4.98	3.3		
12			100 ML solutie zinc sulfat 6 %	pH solutie Zn =5
13	4.92	2.7	100 ML solutie zinc sulfat 6 %	pH solutie Zn =5
			1 PZ zahar (650g/1.5 l apa)	



14	4.65	3.5			
	4.84	3	1 PZ zahar (650g/1.5 l apa)		
17	4.94	3			

- După finalizarea fermentației mediul a fost supus separării prin centrifugare și apoi a fost purificat prin centrifugări succesive cu apă distilată sterilă.
- Umiditate 9.32 %
- Proteine g/100 g: 30.54

## EXEMPLUL 2

### SARJA 2

**Cultura preinocul** este analizată pentru puritate și pentru rata de creștere a microorganismelor (drojzii selectate de *Metschnikowia pulcherrima* 43P și *Candida sp.* DBVPG 37P/sau drojdie de bere)

#### Obținerea culturii inocul (cultura lichida)

✓ Mediu de cultura folosit pentru prepararea inocului lichid YPS: extract de drojdie 0,5g%, peptonă 0,4 g%, zaharoza 7 g% de la Sigma Aldrich;

**Condiții de cultivare:** Temperatura: 28-30°C, viteza de agitare: 140-200 rpm.

• Inoculul a fost preparat dintr-o cultură preinocul (cultura stoc) în flacoane Erlenmeyer de 500 ml conținând 150 ml mediu lichid YSP 1

pH-ul inițial al inoculului a fost de 5,0-6,0. Inoculul a fost incubat timp de 17-20 ore la 30 °C, la 240 rpm, într-un incubator de agitare.

Inocul dezvoltat cu 10+DB (600 ML), agitare 240 rpm la 28-30°C –YSP1

#### Sarja 2 Soluții stoc:

- soluție de sulfat de zinc - preparată prin dizolvarea a 6 g de heptahidrat de sulfat de zinc (Sigma Aldrich) în 100 ml apă distilată, pH ~ 5,3-5,5 (18 g la 300 ml)
- soluția a fost filtrată utilizând seringi cu filtru Nalgene, dimensiune a porilor 0,2µm, diametru 13 mm.
- Pe parcursul fermentației au mai fost adăugate steril în afara de sursa de zinc și soluții sterile de glucoză și zaharoza

#### Inocul 1YSP1–Mediu pentru preparare inocul lichid

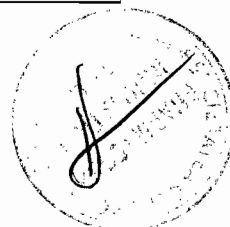
YPSG1	flacoane agitate	
extract de drojdie	0.5	3
peptona	0.5	3
glucoza	3	18
zahar	4	24
apa distilata	100 ml	600 ml

19 h- Durata de cultivare inocul 1 –YSPG1

pH final inocul dezvoltat:4.0; s.u=2.5

#### Mediu de cultura pentru obținerea inoculului intermediar:YSPG2

Medii de cultura	g %	FERMENTATOR – YSPG2 (g)
extract de drojdie	0.7	28
peptona	0.5	20
glucoza	3	140
zahar	4	180
apa distilata	100 ml	4000ml



**Fermentatie – obtinere inocul intermediar YSPG2 –idem sarja 1****MF FERMENTATIE SARJA2**

Materii prime	g %	g
Extract de drojdie	0.7	455
zahar	4	2600
KCl	0.05	32.5
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.05	32.5
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	65
glucoza	4	2600
Apa osmoza inversa	100 ml	6l L
<b>Sterilizare: 115°C 20'</b>		

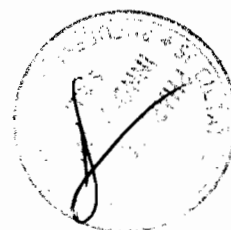
**SARJA 2 Fermentatie la nivel fermentator****Parametrii de cultivare:**

- Viteza de agitare: 120 rpm;
- Temperatura: 30<sup>0</sup>C
- Inoculare cu inocul intermediar YSPG2

**Fermentatie la nivel pilot –Sarja 2**

Durata cultivare (h)	su	pH	Adaosuri
0	9	5.31	inoculare 4l YSPG2 intermediar + 3 ml antispumant inainte de inoculare
10	4	4.8	1 PZ zahar (650g/1.5 l apa)
		4.8	Corectie pH LA 5.18 cu NaOH sol 10 %
11	4.5	5.13	100 ml solutie zinc sulfat 6 % PH Zn =5
12	3.7	4.96	100 ml solutie zinc sulfat 6 % PH Zn =5
13	3.5	4.87	100 ml solutie zinc sulfat 6 % PH Zn =5
			1 PZ zahar (650g/1.5 l apa)
14	3.5	4.64	1 PZ zahar (650g/1.5 l apa)
16	3.5	4.5	
17	3	4.5	STOP FERMENTATIE

Dupa finalizarea fermentatiei mediul a fost supus separarii prin centrifugare si apoi a fost purificat prin centrifugari successive cu apa distilata sterila.

**EXEMPLUL 3****SARJA 3 idem tulpina si cultivare sarja 1****Inocul idem sarja 1****Tabel 19 Obtinere Inocul intermediar YSP 2**

Durata de cultivare (h)	pH	su	Adaosuri			
0	5.6	9	4 picaturi antispuamant + inoculare cu YSPI			
2.3	4.5	8.5	inoculare			
			sol NaOH corectie pH			
	3.75		sol NaOH corectie pH			
8-9	4.96	25-3	STOP			

**Parametri de cultivare:**

- Viteza de agitare: 120 rpm;
- Temperatura: 30°C
- Inoculare cu inocul intermediar YSPG2
- 9g sulfat de zinc dizolvat in 300 ml apa distilata (3 %)

**Fermentatie la nivel pilot –sarja 3**

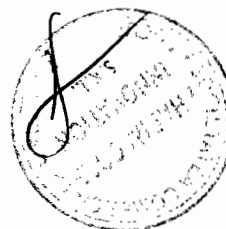
Durata cultivare (h)	su	pH	Adaosuri			
0	9-9.5	5.6	1 ml antispuamant			
6.3	8	4.83				
8.3	6.3	4.86				
10.3	4.5	4.87	Corectie pH la 5.3 cu sol Na OH 10 %			
10.5		5.21	100 ML solutie sulfat de zinc 3%			
	3.8	5.1	1PM 650 g zahar/1500 ml apa			
11.3	4.8	5	100 ML solutie sulfat de zinc 3%			
	4.2	4.95				
12.3		4.95	100 ML solutie sulfat de zinc 3%			
13		4.88	1PM 650 g zahar/1500 ml apa			
14	3.8	4.75	1PM 650 g zahar/1500 ml apa			
17	3.5	4.66				

- Dupa finalizarea fermentatiei mediul a fost supus separarii prin centrifugare si apoi a fost purificat prin centrifugari successive cu apa distilata sterila.

Sarje	WCW g/68 -70 l	Zn anorganic mg/kg drojdie	Zn organic mg/kg drojdie	zinc total	% organic	total polifenol mg/100g referred to gallic acid
S1	2644	360	600	960	62.5	161
S2	2319	360	610	970	62.8	181
S3	2253	250	560	810	69.1	227

**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 realizeaza separarea celulelor de drojdie de mediul de cultură și de metaboliți.

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.





**EXEMPLUL 4**

**Sarja 4**

**Obținerea culturii de întreținere "stoc" (cultura statică) (tulpini idem sarja 2)**

Mediul de cultură pentru obținerea culturii de întreținere "stoc" (drojdie de bere și vin selectată) sunt sterilizate prin autoclavare la 110°C. Culturile (drojdie de bere și vin selectată) au fost crescute pe tuburi de agar (înclinate) și plăci conținând volume de 15 ml medii de cultivare bazate pe extract de drojdie, peptonă de soia, zaharoză, agar-agar (YSP-agarizat) - 30°C timp de 48 de ore.

**Obținerea preinoculului:** drojdiile selectate de vin și bere sunt obținute dintr-o cultură de întreținere care este cultivată pe mediu bazat pe extract de drojdie, peptonă de soia, glucoză/zaharoza, agar-agar YPG-agar/YSP agar și incubat la 28-30°C pentru 34-48 h. Mediile de cultură pentru preinocul sunt sterilizate prin autoclavare la 120°C.

**Obținerea culturii inocul (cultura lichida):** Mediul de cultura folosit pentru prepararea inoculului lichid YPS: extract de drojdie 0,5 g%, peptonă 0,4 g%, zaharoza 7 g%

**Condiții de cultivare:** Temperatura: 28-30°C, viteza de agitare: 140-200 rpm.

• Inoculul a fost preparat dintr-o cultură preinocul (cultura stoc) în flacoane Erlenmeyer de 500 ml conținând 150 ml mediu lichid YSP. pH-ul inițial al inoculului a fost de 5,0-6,0. Inoculul a fost incubat timp de 17-20 ore la 30 ° C, la 240 rpm, într-un incubator de agitare. Inocul dezvoltat cu drojdie de vin+drojdie de bere (600 ML), agitare 240 rpm la 28-30°C – YSP

**Obținerea de inocul intermediar** – pe baza de YSP 2-4L – extract de drojdie 0.5 g%; zahar 7 g %; peptone 0.5 g%, Parametrii de cultivare: 250 rpm rotatii, temperatura 30°C, debit aer: 0.5l/l mediu/min

Preparare solutie bazica de hidroxid de sodiu 10 % pentru ajustare pH in timpul fermentatiei.

**SARJA 4 DE FERMENTATIE**

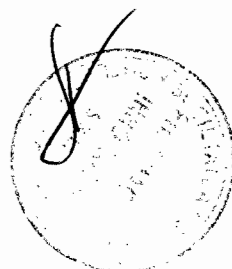
2 tuburi/ <i>Metschnikowia pulcherrima</i> 43P/ drojdie de bere de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> flacon	300 ml
2 tuburi 1 <i>Candida sp</i> /flacon	300 ml
19 h- Durata de cultivare inocul 1 –YSPG1	
pH final inocul dezvoltat:3.5; su=2.5	

**Mediul de cultura pentru obținerea inoculului intermediar: YSPG2**

YPSG 2	g %	FERMENTATOR -4 L
extract de drojdie	0.7	28
peptona	0.5	20
glucoza	3.5	140
zahar	3.5	140
apa distilata	100 ML	4000 ML

**Fermentatie pentru obtinere YSPG 2**

Durata de cultivare (h)	s.u	pH	adaosuri
0	9	5.4	inoculare
2		4.5	Adaos solutie NaOH
5			Adaos NaOH
8.3	4	4.58	Stop fermentatie



**SARJA 4 – FERMENTATIE****Parametrii de cultivare:**

- Viteza de agitare: 120 rpm;
- Temperatura: 30<sup>0</sup>C
- Inoculare cu inocul intermediar YSPG2
- 9g sulfat de zinc dizolvat in 300 ml apa distilata

1Portie solutie zahar = (50% zahar +50% glucoza) 650g la 1500 ml apa distilata

**Fermentatie S4**

Durata de cultivare (h)	s.u	pH	Adaosuri
0	9.5	5.45	Inocul 4 L cu inocul intermediar YSPG2
9	6	4.9	
10	5	4.87	corectie PH LA 5.2 cu solutie de NaOH 10 %
10	5	5.2	100 ml solutie zinc sulfat 3 %      pH Zn =5
11	4.8-5	4.9	100 ml solutie zinc sulfat 3 %      pH Zn =5
12	4.7	4.8	
12	-		100 ml solutie zinc sulfat 3 %      pH Zn =5
13	4.8-5		
			corectie auto pH cu solutie NaOH 10 %
15	5	4.65	
16	4.5	4.68	stop corectie pH
16.3	4	4.63	
17	3	4.6	stop corectie pH

**EXEMPLUL 5****Sarja 5 –FERMENTATIE**

**Preinocul obtinut cu *Metschnikowia pulcherrima* DBVPG43P si *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere**

Inocul lichid YSP1 – 300 ml *Metschnikowia pulcherrima* DBVPG43P cu 300 ml *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere

19 h- Durata de cultivare inocul 1 –YSPG1
pH final inocul dezvoltat:3.5
su=2.5

**Mediul de fermentatie pentru sarja 5 pentru inocul intermediar este idem S1-YSP1**

**SARJA 5 – FERMENTATIE****Parametrii de cultivare:**

- Viteza de agitare: 120 rpm;
- Temperatura: 30<sup>0</sup>C
- Inoculare cu inocul intermediar YSPG2

1PZ = (50% ZAHAR +50% GLUCOZA) 650 G LA 1500 ML APA



**Fermentatie S5 – Mediu fermentatie idem S1**

Durata de cultivare (h)	pH	s.u	Adaosuri
0	5.63	9.5	Adaos inocul YSP2 (4l)
8	4.6	7	
9.3	5.2	5.5	stop corectie pH
10	5.13		100 ML solutie zinc sulfat solutie 3%
11	4.92	4.5	100 ML solutie zinc sulfat solutie 3%
12	4.7		100 ML solutie zinc sulfat solutie 3%
14	4.45		corectie auto pH cu sol NaOH 10 %
	4.65	4	1PZ s.u. 5
15.3	4.9	4	
17	4.72	3	STOP fermentatie - 66 l final

**EXEMPLUL 6****S6- SARJA 6** – Preinocul – idem sarja 5

Inocul lichid 1- YSP1 (extract de drojdie, peptone, zahar) – 150 ml/flacon Erlenmayer

Inocul lichid 2 – YSP2 – mediu idem ...

**Fermentatie inocul intermediar YSP 2**

Durata (h)	pH	s.u	Adaosuri
0	6.15	9	600 ml YSP 1
7	4.8	4.5	Corectie automata pH cu NaOH solutie 10 %
9	4.8	3	
10	4.8	2.5	Stop fermentatie

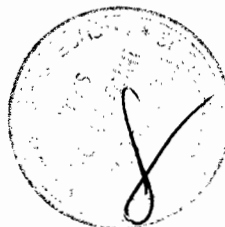
**SARJA INOCUL PILOT INTERMEDIAR****YSP 3 60 L**

Durata de cultivare (h)	pH	s.u.	Observatii
0	6.26	8	START – inoculare cu YSP2
6.3	4.3		Corectat NaOH solutie 10 %
8.3	4.3	4	STOP

**Mediu fermentatie Sarja S6**

Materii prime	g	g
Extract de drojdie	0.35 g	227.5 g
zahar	8 g	5200 g
KCl	0.05 g	32.5 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.05 g	32.5 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g	65 g
Volum total-apa osmoza inversa	100 ml	61 l

Se dizolva si se sterilizeaza 115°C 20 minute racire la 30 °C



**SARJA 6 – FERMENTATIE****Parametri de cultivare:**

- Viteza de agitare: 120 rpm;
- Temperatura: 30<sup>0</sup>C
- Inoculare cu inocul intermediar YSP3
- 9g sulfat de zinc dizolvat in 300 ml apa distilata – 3 %
- 2 portii a cate 150 ml sulfat de zinc

IPZ= (50% zahar +50% glucoza) 650 g la 1500 ml apa

**Inoculare cu 20 l mediu de fermentatie-YSP3**

Durata de cultivare (h)	pH	s.u	Observatii	
0	4.6	8.5	START	Inoculare cu YSP 3 20 L
3	4.4	7.5		
6	4.75	5.5		
	4.75	5	Corectie cu NaOH sol 10 % pH 5.10	
8	5.07		150 ml solutie sulfat zinc 3 %	
9	4.77	4.5	150 ml solutie sulfat zinc 3 %	
15	4.52	4		
16				
17-18	4.5	3-4	STOP	

Sarje	WCW g/68 -70 l	Sulfat de zinc 3 %	Zn anorganic mg/kg drojdie	Zn organic mg/kg drojdie	zinc total	% organic	total poliphenol mg/100g referred to gallic acid
S4	1942	300	370	830	1200	69	246
S5	2204	300	260	840	1100	76	161
S6	2106	300	190	600	790	76	183

**EXEMPLUL 7****Sarja 7**

S-au continuat studiile in ceea ce priveste timpul de adaos si cantitatea de zinc adaugata.

Cultura preinocul este analizata pentru puritate si pentru rata de crestere a microorganismelor *Metschnikowia pulcherrima* DBVPG43P cu 300 ml *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere

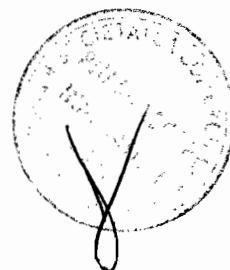
**Obtinerea culturii inocul (cultura lichida)**

Mediul de cultura folosit pentru prepararea inocului lichid YPS: extract de drojdie 0,5g%, peptonă 0,4 g%, zaharoza 7 g% de la Sigma Aldrich;

**Condiții de cultivare:** Temperatura: 28-30<sup>0</sup>C, viteza de agitare: 140-200 rpm.

Inoculul a fost preparat dintr-o cultură preinocul (cultura stoc) în flacoane Erlenmeyer de 500 ml conținând 150 ml mediu lichid YSP

pH-ul inițial al inoculului a fost de 5,0-6,0. Inoculul a fost incubat timp de 17-20 ore la 30 ° C, la 240 rpm, într-un incubator de agitare.



Inocul dezvoltat cu *Metschnikowia pulcherrima* DBVPG43P cu 300 ml *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere (450 ML), agitare 240 rpm la 28-30°C –YSP1

Preinocul	1 tub preinocul
Inocul 1 -YSP 1	baloanea agitate 3
YSP2 Inocul Intermediar	4L

**Obtinerea de inocul intermediar** – pe baza de YSP 2-4L – extract de drojdie 0.5 g%; zahar 7 g %; peptone 0.5 g%

Parametrii de cultivare: 250 rpm rotatii, temperature 30°C, debit aer: 0.5l/1 mediu/min

Preparare solutie bazica de hidroxid de sodiu 10 %

Parametrii	<i>Candida sp.</i> DBVPG37P	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P
pH	3.7	3.5
s.u	2	2

### Fermentatie inocul intermediar –YSP 2

Durata de cultivare (h)	pH	s.u	adaosuri inoculare 2 baloane DB si unul de 9e YSP1
0	6.3	8.5	
5	4.42	7	START CORECTIE PH
8.3	4.8	3.2	STOP CORECTIE PH
9	4.75	3	STOP

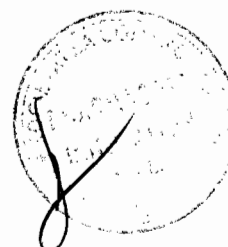
### Fermentatie SARJA 7 (-32°C)

-27 g sulfat de zinc dizolvat in 450 ml – solutie de sulfat de zinc 6 %

Durata de cultivare (h)	pH	s.u	OBSERVATII
0	5.85	9.5	Inoculare 3.5 L Inocul2 YSP 2
4.3			autocorectie PH
8			150 ML ZN (6%) corectie PH 5.17
9			150 ML solutie sulfat de zinc (6%)
10			150 ML solutie sulfat de zinc (6%)
10.30			1 PZ ( G 50% +Z 50 %)
12.30			1 PZ ( G 50% +Z 50 %)
13.30			1 PZ ( G 50% +Z 50 %)
17	4.5	3	
Stop		VT	70 L

In acest caz s-a realizat un adaos de amestec glucoza cu zahar. S-a observat ca fermentatia a decurs foarte bine.

- Dupa finalizarea fermentatiei mediul a fost supus separarii prin centrifugare si apoi a fost purificat prin centrifugari succesive cu apa distilata sterila.
- S-a obtinut o biomasa celulara umeda de 2069 grame. WCW (g/l) = 30.88 g/l = 3.1 g % = 0.77 g % DCW (biomasa uscata)



- S7: 158 mg/100g (referred to gallic acid)
- Umiditate: 7.66 %
- Proteina g/100 g: 33.22

Proba	mg/kg drojdie	mg/kg Zn	mg/kg drojdie	%
	Total Zn	Anorganic	Organic Zn	Organic Zn
S7	1500	330	1170	78

### EXEMPLUL 8

#### SARJA 9

Cultura preinocul este analizata pentru puritate si pentru rata de crestere a microorganismelor (drojdii selectate de bere)/drojdii de vin – Candida sp DBVPG 37 p

#### Obtinerea culturii inocul (cultura lichida)

✓ Mediul de cultura folosit pentru prepararea inocului lichid YPS: extract de drojdie 0,5g%, peptonă 0,4 g%, zaharoza 7 g% de la Sigma Aldrich;

**Condiții de cultivare:** Temperatura: 28-30°C, viteza de agitare: 140-200 rpm.

• Inoculul a fost preparat dintr-o cultură preinocul (cultura stoc) în flacoane Erlenmeyer de 500 ml conținând 150 ml mediu lichid YSP

pH-ul inițial al inoculului a fost de 5,0-6,0. Inoculul a fost incubat timp de 17-20 ore la 30 ° C, la 240 rpm, într-un incubator de agitare.

Inocul dezvoltat idem S7, agitare 240 rpm la 28-30°C –YSP

**Obtinerea de inocul intermediar** – pe baza de YSP 2-4L – extract de drojdie 0.7 g%; zahar 7 g %; peptone 0.5 g%

Parametri de cultivare: 250 rpm rotatii, temperature 30°C, debit aer: 0.5l/l mediu/min

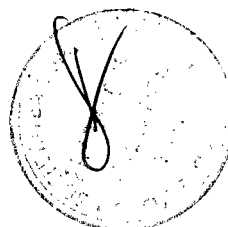
Preparare solutie bazica de hidroxid de sodiu 10 %

Parametri	INOCUL 1 YSP1
pH	4
s.u	2.5

#### Fermentatie inocul intermediar –YSP 2

Durata de cultivare (h)	s.u	pH	adaosuri
0	9	6.65	
4.3	6.5	4.58	
7.15			Corectie pH CU NaOH 10 %
9	2.5	5	

- 27 g zinc sulfat dizolvat in 450 ml apa



**Fermentatie SARJA 9**

Durata de cultivare (h)	pH	s.u	Observatii
0	5.58	10.5	start ph auto –inoculare cu YSP2 4L
			Ph corectie
10	5.15	5.7	150 ml solutie sulfat de Zn 6 %
	4.93	5.5	
11	4.9		150 ml Zn solutie sulfat de Zn 6 %
	4.77	4.8	
12	4.7		150 ml Zn solutie sulfat de Zn 6 %
13.3	4.66	4	1 PM
15.3	4.58	4.2	1PM
17.3	4.54		STOP

Dupa finalizarea fermentatiei mediul a fost supus separarii prin centrifugare si apoi a fost purificat prin centrifugari successive cu apa distilata sterila.

➤ Umiditate: 6.32 %; Proteina g/100 g: 41.46

**EXEMPLUL 9****Sarja S10**

Cultura preinocul este analizata pentru puritate si pentru rata de crestere a microorganismelor (drojdii selectate de vin) *Metschnikowia pulcherrima* DBVPG43P

**Obtinerea culturii inocul (cultura lichida)**

✓ Mediul de cultura folosit pentru prepararea inocului lichid YPS: extract de drojdie 0,5 g%, peptonă 0,4 g%, glucoza 7 g%;

**Condiții de cultivare:** Temperatura: 28-30°C, viteza de agitare: 140-200 rpm.

• Inoculul a fost preparat dintr-o cultură preinocul (cultura stoc) în flacoane Erlenmeyer de 500 ml conținând 150 ml mediu lichid YGP

pH-ul inițial al inoculului a fost de 5,0-6,0. Inoculul a fost incubat timp de 17-20 ore la 30 ° C, la 240 rpm, într-un incubator de agitare.

Inocul dezvoltat cu 10 (600 ML), agitare 240 rpm la 28-30°C –YSP1

Preinocul	4 tuburi <i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P
Inocul 2DB YSP 1	baloane agitate 4 a cate 150 ml – inoculare cu un tub/flacon
YSP2 Inocul Intermediar	4L

**Obtinerea de inocul intermediar** – pe baza de YGP 2-4L – extract de drojdie 0.7 g%; glucoza 7 g %; peptone 0.5 g%

Parametri de cultivare: 250 rpm rotatii, temperature 30°C, debit aer: 0.5l/l mediu/min  
Preparare solutie bazica de hidroxid de sodiu 10 %



Parametri	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P –inocul final	
pH		3.8
s.u		2.8

**Obtinerea de inocul intermediar**

Durata de cultivare (h)	pH	s.u	Observatii
0	6	9	0.5 ml antispumant
5	4.53	7	
7	4.38	5	corectie PH
9	4.79	3	Stop corectie
9	STOP		

**Mediu de fermentatie S10**

Materii prime	g %	65 L
Extract de drojdie	0.5	300
KCl	0.05	32.5
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.05	32.5
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	65
glucoza	8	5200
Apa de la osmoza inversa	100 ml	61 l
Sterilizare	115°C	20'

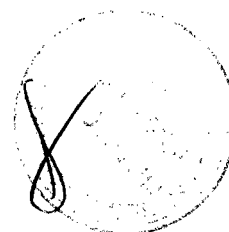
**Fermentatie SARJA 10**

Zinc sulfat dizolvat 18 g in 300 ml apa – 6 % -3 portii a 100 ml

- Fermentatie S10

-

Durata de cultivare (h)	ora	pH	s.u	Observatii
0	16	5.21	9.5	Inoculare cu YGP2
3	19	4.56	9.3	start corectie Ph cu NaOH sol 10 %
	1.45	4.8	5.5	Corectie pH
10	2	5.18	5.5	100 ml solutie sulfat de zinc 6 %
11	3	5.03	5.2	100 ml solutie sulfat de zinc 6 %
12	4	4.84	4.5	100 ml solutie sulfat de zinc 6 %
13	5	4.74	3.9	1 Portie de solutie de glucoza
14	6	4.67	4.5	1 Portie de solutie de glucoza
17	9	4.49		STOP





- După finalizarea fermentației mediul a fost supus separării prin centrifugare și apoi a fost purificat prin centrifugări succesive cu apă distilată sterilă.

**EXEMPLUL 10**

S12- SARJA 12

Cultura preinocul este analizată pentru puritate și pentru rata de creștere a microorganismelor (drojdii selectate de vin și bere)

**Obținerea culturii inocul (cultura lichida)**

✓ Mediul de cultura folosit pentru prepararea inocului lichid YSPG1: extract de drojdie 0,7g%, peptonă 0,5 g%, zaharoza 3.5 g% , Glucoza 3.5 % de la Sigma Aldrich;

**Condiții de cultivare:** Temperatura: 28-30°C, viteza de agitare: 140-200 rpm.

• Inoculul a fost preparat dintr-o cultură preinocul (cultura stoc) în flacoane Erlenmeyer de 500 ml conținând 150 ml mediu lichid YSPG1

pH-ul inițial al inoculului a fost de 5,0-6,0. Inoculul a fost incubat timp de 17-20 ore la 30°C, la 240 rpm, într-un incubator de agitare.

Inocul dezvoltat cu *Metschnikowia pulcherrima* DBVPG43P cu 300 ml *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere (600 ML), agitare 240 rpm la 28-30°C –YSP

Preinocul	2 tub preinocul <i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P + 2 tub <i>Candida</i> <i>sp.</i> DBVPG37P/drojdie de bere
Inocul <i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P + <i>Candida sp.</i> DBVPG37P/drojdie de bere YSP 1	baloane agitate 4 x 150 ml =600 ml
YSPG2 Inocul Intermediar	4L

Mediul de cultura folosit pentru prepararea inocului lichid YSPG2: extract de drojdie 0,7 g%, peptonă 0,5 g%, zaharoza 3.5 g% , Glucoza 3.5 % ;

**Obținerea de inocul intermediar** – pe baza de YSPG 2-4L –

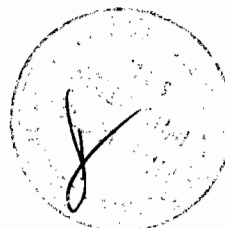
Parametri de cultivare: 250 rpm rotații, temperatură 30°C, debit aer:0.5l/min

Preparare soluție bazică de hidroxid de sodiu 10 %

Parametri	DB+10
pH	3
s.u	2.5

**Fermentație inocul intermediar –YSP 2**

Durata de cultivare (h)	pH	s.u	Observatii
0	5.21	9	0.5 ml antispumant –inoculare YSPG1
6	4.75	4	Stop corectie automata



8	STOP	2.5		
---	------	-----	--	--

**Fermentatie SARJA 12 -(32°C)**

Materii prime	g	g
Extract de drojdie	0.7	455
KCl	0.05	32.5
MgSO <sub>4</sub>	0.05	32.5
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	65
glucoza	4	2600
zaharoza	4	2600
Apa osmoza inversa	100 ml	65 l
Sterilizare	115°C	20 MINUTE

-27 g zinc dizolvat in 450 ml – solutie de sulfat de zinc 6 %

**Sarja S12**

Durata de cultivare (h)	pH	s.u	Observatii
0	5.41	9	inoculare 3.5 l inocul2 YSPG 2
8	4.70	6.5	Corectie pH cu NaOH solutie de 10 %
8	5.2	6.5	150 ml Zn 6 %
9	5	5.3	150 ml Zn 6 %
10	4.83	4.8	150 ml Zn 6 %
11	4.7	4.5	1 PZ (50% glucoza+ 50 % zaharoza)
12	4.62	4	pH corectie auto
13	4.52	4.5	1 PZ (50% glucoza+ 50 % zaharoza)
17	4.83		STOP

Solutie zaharoza + glucoza = 216 g+216 g = 432 g la 1000 ml apa

Solutie zaharoza + glucoza 109 g + 109 g = 218 la 500 ml apa

325g+325 g = 650 G LA 1500 ML APA

Total 650 g (50 % glucoza+50% zaharoza) – 1 g % adaos

Sarje	WCW g/68 -70 l	Zn anorganic mg/kg drojdie	Zn organic mg/kg drojdie	% zinc organic	total poliphenol mg/100g referred to gallic acid
S9	1150	630	1390	69	380
S10	1151	390	960	71	380
S12	1500	790	1110	58	470



## EXEMPLUL 11

**Sarja la nivel pilot pentru obtinere de biomasa de drojdie imbogatita in zinc organic la nivel pilot \_S13**

Cultura preinocul este analizata pentru puritate si pentru rata de crestere a microorganismelor (drojdii selectate de vin si bere)

**Obtinerea culturii inocul (cultura lichida)**

✓ Mediul de cultura folosit pentru prepararea inocului lichid YPSG1: extract de drojdie 0,7g%, peptonă 0,5 g%, zaharoza 3.5 g% , Glucoza 3.5 % de la Sigma Aldrich;

**Condiții de cultivare:** Temperatura: 28-30°C, viteza de agitare: 140-200 rpm.

• Inoculul a fost preparat dintr-o cultură preinocul (cultura stoc) în flacoane Erlenmeyer de 500 ml conținând 150 ml mediu lichid YSPG1

pH-ul inițial al inoculului a fost de 5,0-6,0. Inoculul a fost incubat timp de 17-20 ore la 30°C, la 240 rpm, într-un incubator de agitare.

Inocul dezvoltat cu *Metschnikowia pulcherrima* DBVPG43P cu 300 ml *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere (600 ML), agitare 240 rpm la 28-30°C –YSP

Preinocul	1 tub preinocul <i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P + 1 tub <i>Candida</i> <i>sp.</i> DBVPG37P/drojdie de bere
Inocul <i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P + <i>Candida sp.</i> DBVPG37P/drojdie de bere YSP 1	baloane agitate 4 x 150 ml =600 ml
YSPG2 Inocul Intermediar	4L

Mediul de cultura folosit pentru prepararea inocului lichid YPSG2: extract de drojdie 0,7 g%, peptonă 0,5 g%, zaharoza 3.5 g% , Glucoza 3.5 % ;

**Obtinerea de inocul intermediar – pe baza de YSPG 2-4L –**

Parametri de cultivare: 250 rpm rotatii, temperature 30°C, debit aer:0.5l/min

Preparare solutie bazica de hidroxid de sodiu 10 %

Parametri	pH	su
0 h	5.5	9
19h	4	3.2

**Fermentatie inocul intermediar –YSP 2 –idem s12****ermentatie SARJA 12 -(32°C)**

Materii prime	g	g
Extract de drojdie	0.7	455
KCl	0.05	32.5
MgSO <sub>4</sub>	0.05	32.5
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	65
glucoza	4	2600



zaharoza	4	2600
Apa osmoza inversa	100 ml	65 l
Sterilizare	115°C	20 MINUTE

Turatia: 120 rpm

Prepararea solutiei de sulfat de zinc – se dizolva 27 de grame de sulfat de zinc heptahidrat in 450 ml si se repartizeaza in 3 portii de 150 ml

-soluție de sulfat de zinc heptahidrat- preparată prin dizolvarea a 6 g de heptahidrat de sulfat de zinc (Sigma Aldrich) în 100 ml apă distilată, pH ~ 5,3-5,5 (18 g la 300 ml) la 27 g (450 ml) soluția a fost filtrată utilizând seringi cu filtru Nalgene, dimensiune a porilor 0,2 pm, diametru 13 mm.

Durata (H)	pH	su	Aadaosuro
0	5.64	9.5	
			START CORECTIE AURO
4	4.64	8.5	
8	4.6	6	150 ML ZN 6 %
9	5.2	6	150 ML ZN 6 %
10	5.09	5.6	150 ML ZN 6 %
11.3	4.79	4.5	1 PM (G+Z)
12.3	4.72	4	1 PM (G+Z)
14	4.77	5.2	
15	4.72	4.8	
16	4.76	4.5	
17	4.75	4	
18	4.74	3.5	STOP

## EXEMPLUL 12

### Sarja la nivel pilot pentru obtinere de biomasa de drojdie imbogatita in zinc organic la nivel pilot S14

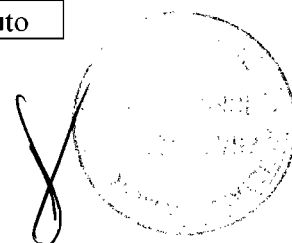
Preinoculul, inocul 1, inocul 2 idem S12

Prepararea solutiei de sulfat de zinc – se dizolva 27 de grame de sulfat de zinc heptahidrat in 450 ml si se repartizeaza in 3 portii de 150 ml

-soluție de sulfat de zinc heptahidrat- preparată prin dizolvarea a 6 g de heptahidrat de sulfat de zinc (Sigma Aldrich) în 100 ml apă distilată, pH ~ 5,3-5,5 (18 g la 300 ml) la 27 g (450ml) soluția a fost filtrată utilizând seringi cu filtru Nalgene, dimensiune a porilor 0,2pm, diametru 13 mm.

Turatia: 120 rpm

Durata cultivare (h)	pH	su	Adaosuri
0	5.58	8.3	
4	4.71	7	start corectie auto



			pH
7	4.73	5.5	Corectie manuala pH
8	5.19	5	150 ML ZN 6 %
	5	4.5	
9			150 ML ZN 6 %
10	4.85	4,2	150 ML ZN 6 %
11	4.7	3.7	1 PM (G+Z)
12	4.59	4	1 PM (G+Z)
13	4.48	4.5	repornire pH auto
14	4.54	4	1 PM (G+Z)
16	4.83	4.5	STOP pH AUTO
18	4.65	3.9	
18	4.63	3.8	STOP pH AUTO

**EXEMPLUL 13****Sarja la nivel pilot pentru obtinere de biomasa de drojdie imbogatita in zinc organic la nivel pilot S15**

Prinocul, inocul 1 si inocul 2 – iden S12

Prepararea solutiei de sulfat de zinc – se dizolva 27 de grame de sulfat de zinc heptahidrat in 450 ml si se repartizeaza in 3 portii de 150 ml

-soluție de sulfat de zinc heptahidrat- preparată prin dizolvarea a 6 g de heptahidrat de sulfat de zinc (Sigma Aldrich) în 100 ml apă distilată, pH ~ 5,3-5,5 (18 g la 300 ml) la 27 g (450 ml) soluția a fost filtrată utilizând seringi cu filtru Nalgene, dimensiune a porilor 0,2 pm, diametru 13 mm.

Durata cultivare (h)	pH	su	Adaosuri
0	5.35	9	start
4	4.54	8.5	
6	4.92	7	
8			150 ml Zn 6 %
9	5.02	6	150 ml Zn 6 %
10	4.83	4.6	150 ml Zn 6 %
11	4.66	4	1 PZ (Z+G)
12	4.56	4.5	corectie PH AUTO + 1 PZ (g+z)
13	4.59	5	
14	4.68	4.5	1 PZ (Z+G)
15	4.78	5	
17	4.85	4.2	
18	4.85	3.8	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.

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.

Sarje	tuburi	WCW g/68 - 70 l	Zn anorganic mg/kg drojdie	Zn Organic mg/kg drojdie	% Zn organic	zinc tot Hu	total polifenol mg/100g referred to gallic acid
S13	2 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P + <i>Candida sp.</i> DBVPG37P/drojdie de bere	1759	732	1208	62.2	1940	497
S14	2 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P + <i>Candida sp.</i> DBVPG37P/drojdie de bere	1589	810	1170	59	1980	535
S15	4 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P + <i>Candida sp.</i> DBVPG37P/drojdie de bere	1808	732	1298	64	2030	470

#### EXEMPLUL 14

##### S17- Sarja la nivel pilot

**Prinocul 2** *Metschnikowia pulcherrima* DBVPG43P + *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere

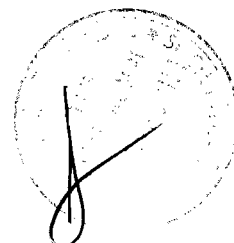
Inocul 1 si 2 idem S12

Pregatirea solutiei de sulfat de zinc heptahidrat: Se dizolva 24.36 g sulfat de zinc in 410 ml de apa si se repartizeaza in 5 portii a cate 82 ml (solutie 6 %).

-soluție de sulfat de zinc heptahidrat- preparată prin dizolvarea a 6 g de heptahidrat de sulfat de zinc (Sigma Aldrich) în 100 ml apă distilată, pH ~ 5,3-5,5 (18 g la 300 ml) la 27 g (450 ml) soluția a fost filtrată utilizând seringi cu filtru Nalgene, dimensiune a porilor 0,2µm, diametru 13 mm.

1 PZ (portie zahar)=325 g zahar +325 g glucoza dizolvata in 1500 ml apa – Se repartizeaza in sticle de 1 si 500 ml si se sterilizeaza inainte de adaos.

Materii prime	g	g
Extract de drojdie	0.7	455
KCl	0.05	32.5
MgSO <sub>4</sub>	0.05	32.5
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	65
glucoza	4	1950
zaharoza	4	1950
Apa osmoza inversa	100 ml	65 l



Sterilizare	115°C	20 MINUTE
-------------	-------	-----------

Durata de cultivare (h)	pH	su	Adaosuri
0	5.51	7.5	0
2			start corectie pH cu NaOH10 % corectie manuala si stop corectie
5	4.9	6	
7	4.5		Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
8	4.63		Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
9	4.5		Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
9.45	4.39	3.7	corectie pH LA 4.66
10	4.64		Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
10.45	4.55	3.2	
11	4.51	3	Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
11.3	4.47	2.6	
12.3	4.39	3.3	corectie AUTO PH
13	4.63	3	
15	4.47	2.8	
16	4.57	2.6	
17		STOP	

## EXEMPLUL 15

### Sarja 18 – sarja la nivel pilot

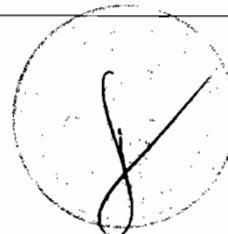
-sterilizare mediu fermentatie 115°C - 20 min

Pregatirea solutiei de sulfat de zinc heptahidrat: Se dizolva 24.36 g sulfat de zinc in 410 ml de apa si se repartizeaza in 5 portii a cate 82 ml (solutie 6 %).

-solutie de sulfat de zinc heptahidrat- preparată prin dizolvarea a 6 g de heptahidrat de sulfat de zinc (Sigma Aldrich) în 100 ml apă distilată, pH ~ 5,3-5,5 (18 g la 300 ml) la 27 g (450 ml)bsoluția a fost filtrată utilizând seringi cu filtru Nalgene, dimensiune a porilor 0,2pm, diametru 13 mm.

1 PZ (portie zahar)=325 g zahar +325 g glucoza dizolvata in 1500 ml apa – Se repartizeaza in sticle de 1 si 500 ml si se sterilizeaza inainte de adaos.

Durata (h)	pH	su	Adaosuri
0	5.3	7	
			corectie pH LA 5.24
6.3	4.71	5.2	STOP CORECTIE
7	5.11	4.7	Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml



8	4,88	4,5	Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
9	4,74	4,3	Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
10	4.62	3.4	Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
10.3	4.6		
11	4.5	4.2	Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
12	4.41	4.2	CORECTIE AUTO PH
14	4.57	3.7	
17	4.63		STOP

**EXEMPLUL 16****Inocul 1 si 2 idem S17****S19 –sarja la nivel pilot**

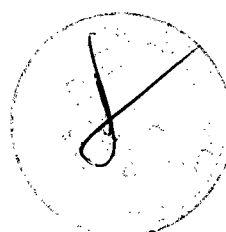
-sterilizare mediu fermentatie 115°C - 20 min

Pregatirea solutiei de sulfat de zinc heptahidrat: Se dizolva 24.36 g sulfat de zinc in 410 ml de apa si se repartizeaza in 5 portii a cate 82 ml (solutie 6 %).

-solutie de sulfat de zinc heptahidrat- preparată prin dizolvarea a 6 g de heptahidrat de sulfat de zinc (Sigma Aldrich) în 100 ml apă distilată, pH ~ 5,3-5,5 (18 g la 300 ml) la 27 g (450 ml)bsoluția a fost filtrată utilizând seringi cu filtru Nalgene, dimensiune a porilor 0,2pm, diametru 13 mm.

1 PZ (portie zahar)=325 g zahar +325 g glucoza dizolvata in 1500 ml apa – Se repartizeaza in sticle de 1 si 500 ml si se sterilizeaza inainte de adaos.

Durata de cultivare (h)	pH	s.u	Adaosuri
0	5.4	7.3	
6.3	4.67	4.7	
6.45	4.54	corectie pH	
		STOP corectie	
7	4.84	4.5	Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
8	4.43	3.7	Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
8.3	4.38	3.3	corectie pH
8.35	4.67		
9	4,53	3.7-4	Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
10	4.43	3.3	Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
10.1	4.41		corectie Ph
10.2	4.61		





11	4.54	3.5	Solutie sulfat de zinc heptahidrat 6 % - 82 ml
12	4.43	3.1	corectie pH AUTO
14	4.55	3.5	
17	4.49		

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.

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.

SARJE	tuburi	Zn anorganic mg/kg drojdie	Zn Organic mg/kg drojdie	% zinc organic	zinc tot Hu mg/kg drojdie	total poliphenol mg/100g referred to gallic acid
S17	2 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P + <i>Candida sp.</i> DBVPG37P/drojdie de bere	1060	920	46	1980	766
S18	2 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P + <i>Candida sp.</i> DBVPG37P/drojdie de bere	1250	1450	54	2700	498
S19	2 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> DBVPG43P + <i>Candida sp.</i> DBVPG37P/drojdie de bere	860	1260	60	2120	674



## REVENDICARI

PRODUS PE BAZA DE BIOMASA DE DROJDIE IMBOGATITA IN ZINC  
ORGANIC SI PROCEDEU DE OBTINERE

1. Produs si procedee de obtinere, **caracterizate prin aceea ca** utilizeaza tulpinile de drojdie *Metschnikowia\_pulcherrima* 43P si *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere pentru obtinerea biomasei imbogatite in zinc organic la nivel pilot .

2. Produs pe baza de biomasa umeda de drojdii *Metschnikowia\_pulcherrima* 43P si *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere imbogatita in zinc organic conform revendicarii 1 **caracterizat prin aceea ca**, continutul de zinc organic din biomasa este de aprox 76 % din total.

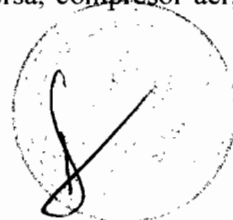
3. Produs pe baza de biomasa umeda de drojdii *Metschnikowia\_pulcherrima* 43P si *Candida sp.* DBVPG 37P/drojdie de bere imbogatita in zinc organic conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca** are 1150 – 2644 g/65l WCW (biomasa umeda), zinc total 810-2700 mg/kg drojdie, zinc organic 560-1390 mg/kg drojdie, zinc anorganic 100-1250 mg/kg drojdie, polifenoli mg/100g acid galic intre (160-766).

4. Produs pe baza de biomasa umeda de drojdii *Metschnikowia\_pulcherrima* 43P si *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in zinc organic conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca** prezinta urmatoarele caracteristici: fibra bruta 7.03 %;

5. Produs pe baza de biomasa umeda de drojdii de *Metschnikowia\_pulcherrima* 4P si *Candida sp.* DBVPG37P imbogatita in zinc organic conform revendicarii 1 **caracterizat prin aceea ca** este constituit din urmatoarele faze:

1. Obtinerea materialului biologic
2. Obtinerea de biomasa de drojdie imbogatita in zinc la nivel pilot (65 l Volum Util)
3. Prepararea culturii preinocul
4. Prepararea culturii inocul generatia 1
5. Prepararea Inoculului intermediar- generatia 2
6. Prepararea Inoculului generatia 3

Fermentatia la nivel pilot: Prepararea produsului pe baza de biomasa de drojdii active imbogatite in zinc la nivel pilot cu 65 l Vu (120 Vt), mediul de fermentatie sterilizat SIP la 115°C timp de 20' si apoi mediul se raceste la 30 °C, apoi este insamanat cu inocul generatia 2 (4L) si se fermenteaza timp de 17-20 h la 30 °C cu 110-115 rpm. Se utilizeaza o linie pilot ce utilizeaza (fermentator pilot, apa osmoza inversa, compresor aer, uscator aer).



Pe parcursul biprocesului se realizeaza corectii de pH cu solutie de NaOH 10%, si adaosuri de solutii de zinc si 6 % pregatite inainte de adaosurile propuse, apoi, la final, mediul fermentat este scos din bioreactor si se separa (mediul fermentat) pana la obtinerea biomasei umede de drojdii imbogatite in zinc, urmeaza purificarea prin spalari repetate a biomasei umede cu apa distilata sterila sau cu apa de la osmoza inversa.

6. Procedeu de obtinere a unui bioprodus de *biomasa de drojdie* imbogatita in zinc organic si polifenoli, conform revendicarii 5, **caracterizat prin aceea ca**, cultura de intretinere se prepara din cultura de *Metschnikowia\_pulcherrima* 43P si *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere prin insamantarea unui mediu inclinat pe baza de zaharoza, extract de drojdie, malt, agar –agar si incubare la 30<sup>0</sup>C.

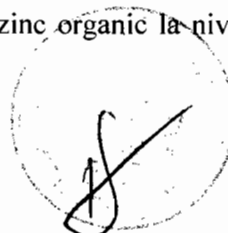
7. Procedeu de obtinere a unui bioprodus de drojdie imbogatita in zinc organic conform revendicarii 5, **caracterizat prin aceea ca**, cultura preinocul se prepara din cultura stoc de intretinere de *Metschnikowia\_pulcherrima* 43P si *Candida sp.* DBVPG37P prin insamantarea unui mediu inclinat pe baza de zaharoza, extract de drojdie, malt, agar –agar si incubare la 30<sup>0</sup>C.

8. Procedeu de obtinere a unui bioprodus de drojdie imbogatita in zinc organic conform revendicarii 5, **caracterizat prin aceea ca**, cultura inocul lichid 1-generatia 1, se prepara prin insamantarea a 1 50 ml cu o cultura preinocul de *Metschnikowia\_pulcherrima* 43P si *Candida sp.* DBVPG37P pe baza de zahar alimentar/zaharoza, extract de drojdie, peptona si incubare la 30<sup>0</sup>C pentru 17-21 h cu agitare 240 rpm, greutate celulara, substanta uscata 2-2.5 % si pH final de 4-4.2.

9. Procedeu de obtinere a unui bioprodus de drojdie imbogatita in zinc organic conform revendicarii 5, **caracterizat prin aceea ca**, cultura inocul lichid 2 intermediar -generatia 2, se prepara prin insamantarea a 3200 ml cu o cultura inocul 1 (450 ml) de *Metschnikowia\_pulcherrima\_43P* si *Candida sp.* DBVPG37P pe baza de zahar alimentar/zaharoza/glucoza + zaharoza/glucoza, extract de drojdie, peptona si incubare la 30<sup>0</sup>C pentru 17-21 h cu agitare 240 rpm, greutate celulara, substanta uscata 2-2.5 % si pH final de 4-4.2.

10. Procedeu de obtinere a unui bioprodus de drojdie imbogatita in zinc organic conform revendicarii 5, **caracterizat prin aceea ca**, cultura inocul lichid 3 intermediar -generatia 3, se prepara prin insamantarea a 60 l cu o cultura inocul 2 (4l) *Metschnikowia\_pulcherrima\_43P* si *Candida sp.* DBVPG37P.

11. Procedeu de obtinere a unui bioprodus de drojdie *Metschnikowia\_pulcherrima* 43P si *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere imbogatita in zinc organic la nivel pilot conform



revedicarii 6, **caracterizat prin aceea ca** mediul de fermentatie pe : (Extract de drojdie 0.7 %; glucoza 4% si zaharoza 4%/glucoza 8 %/zaharoza 8% , KCl 0.05 %;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  0.05 %;  $NH_4H_2PO_4$  0.1 % , apa de la osmoza inversa, care apoi este sterilizat SIP la 115°C timp de 20' si apoi mediul se raceste la 30 °C, apoi este insamnatat cu inocul generatia 2 (4L)/generatia 3 (20l), si se fermenteaza timp de 17-20 h la 30 °C cu 110-115 rpm.

12. Procedeu de obtinere a unui bioprodus de drojdie *Metschnikowia pulcherrima* 43P si *Candida sp.* DBVPG37P/drojdie de bere, active umeda, imbogatita in zinc organic max 76 % conform revedicarii 6, **caracterizat prin aceea ca** mediul fermentat este eliminat in partea inferioara a bioreactorului, si apoi tinut la rece, dupa care se realizeaza purificarea biomasei cu apa de la osmoza inversa.

