



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00807

(22) Data de depozit: 29/12/2021

(41) Data publicării cererii:  
30/06/2022 BOPI nr. 6/2022

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• AGSIRA S.R.L.,  
STR. NICOLAE BĂLCESCU NR. 54, HALA  
NR. 2 SAT ISALNIȚA, COMUNA ISALNIȚA,  
DJ, RO

(72) Inventatori:  
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• NEGRILĂ RADIAN NICOLAE,  
STR.AMARADIA NR.81, AP.4, CRAIOVA,  
DJ, RO;  
• CONSTANTINESCU- ARUXANDEI DIANA,  
ȘOS.MIHAI BRAVU NR.297, BL.15A, SC.A,  
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• DEȘLIU-AVRAM MĂLINA, STR. GĂRLENI  
NR. 4, BL. C85, SC. A, ET. 6, AP. 40,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚIE MULTIFUNCȚIONALĂ ȘI PROCEDEU  
DE OBTINERE A ACESTEIA DIN DROJDIE DE VIN

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții multifuncționale din drojdia de vin. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: diluarea cu apă a drojdiei de vin recuperată din procesul de vinificație, hidroliza enzimatică a drojdiei de vin cu amestec de enzime care conține beta-glucanaze și proteaze, separarea resturilor celulare prin centrifugare, răcirea la temperatura camerei și adăugarea de stearat de

sucroză până la atingerea unor concentrații de 0,71...1,24%, omogenizarea cu ultrasunete, ultrafiltrarea tangențială a supernatantului, concentrarea retenatului și uscarea prin liofilizare, rezultând o compoziție aromatizantă cu activitate antioxidantă, antimicrobiană și antihipertensivă.

Revendicări: 2



## COMPOZIȚIE MULTIFUNCȚIONALĂ ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTEIA DIN DROJDIE DE VIN

Prezenta invenție se referă la o compoziție multifuncțională, aromatizantă, antioxidantă, antimicrobiană și antihipertensivă, ca și la un procedeu de obținere a acesteia din drojdie de vin.

Sunt cunoscute diferite compoziții obținute din drojdia de vin, subprodus al procesului de vinificație. Drojdia de vin conține biomasa de drojdii de vinificație inactivate, acid tartric, alcool etilic, acizi grași și esteri ai acestora și polifenoli (Sancho-Galán, et al. 2020, *Agronomy*, 10(7), 996). Drojdia de vin este o sursă bogată de compuși cu utilizări practice, rezultați din struguri și/sau din metabolismul drojdiilor – arome (Popescu et al. 2015, *Agri-Food*, 25, 7-17), antioxidanți (Jara-Palacios, 2019, *Antioxidants*, 8, 45), compuși antimicrobieni (Hernández-Macias et al. 2021, *Foods*, 10, 1916), și inhibitori ai enzimei de conversie ai angiotensinei / anti-hipertensivi López-Fernández-Sobrinó et al. 2021, *Nutrients*, 13, 679).

Cererea de brevet RO134609 A0 se referă la un ingredient proteic pe bază de drojdii-de-vin utilizabil în rețetele de nutrețuri combinate pentru hrana puilor de carne. Procedeu descris de această cerere de brevet constă în diluarea drojdiei reziduale rezultată de la fabricarea vinului, în raport 50:50 cu apă, urmată de filtrare printr-o sită fină, pentru eliminarea resturilor de pielite, resturi lemnoase, semințe, adăugarea de maltodextrină dizolvată în apă și uscare prin atomizare la o temperatură a aerului de intrare de 175°C și o temperatură a aerului de ieșire de 83°C. prin acest procedeu se obține un produs uscat având un conținut de 3,67...22,02% proteină brută, 0,05...1,86% grăsime brută, respectiv, 0,4...4,9 mg/g GAE polifenoli totali și o capacitate antioxidantă de 12,66...15,71 mmoli/L echiv. trolox.

Dezavantajul procedurii descrise de Cererea de brevet RO134609 A0 este că nu valorifică componentele de aromă prezente în drojdia de vin. Aceste componente de aromă sunt esteri etilici ai unor acizi grași saturați, ca de ex. ester etilici a acizilor octanoic (octanoate de etil - EO), decanoic (decanoat de etil - ED), dodecanoic (dodecanoat de etil - EDD) și hexadecanoic (hexadecanoic de etil - HDE) - Deșliu-Avrăm et al. 2020. *MDPI Proceedings*, 57(1), 42. De asemenea, procedeu descris de cererea de brevet RO134609 A0 nu extrage și nu valorifică acidul tartric prezent în drojdia de vin. Acidul tartric recuperat din drojdia de vin este reutilizabil în procesul de stabilizare a vinurilor. Prezența acidului tartric în furaje reduce palatabilitatea - datorită caracteristicilor sale

combinate, de aciditate și astringența - Corrigan & Lawless, 1995, *Chemical Senses*, 20(6), 593-600. Prezența acidului tartric și a unor polifenoli de tipul acidului cafeic reduce eficiența de utilizare a nutrienților din nutrețuri, datorită inactivării unor enzime digestive – ca de ex.  $\alpha$ -amilaza (Li et al 2021, *Frontiers in Nutrition*, 8: 766756).

Cererea de brevet JPH04287676A descrie un procedeu de recuperare a aromei din drojdia de vin sake. Drojdia de vin sake este încărcată într-un tambur rotativ din care se face distilarea la presiune și temperatură reduse. Distilatul, care include alcool și esteri, este recuperat prin condensare. Dezavantajul acestui procedeu este că recuperează componentele de aromă împreună cu alcool etilic și că nu recuperează componentele polifenolice biologic active.

Brevetul US6821533 B2 prezintă recuperarea unei compoziții antibacteriene din drojdia de vin, formată din polifenoli (pigmenți și taninuri) și care este separată prin utilizarea unui material de legare selectat din grupul constând din colestiramină, polivinilpirolidonă reticulată și polivinilpirolidonă solubilă. Dezavantajul acestui procedeu este că nu recuperează componentele de aromă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a obține din drojdia de vin o compoziție multifuncțională, în care se regăsesc esteri etilici ai acizilor grași cu rol de aromatizați, polifenolic cu activitate antioxidantă, antimicrobiană și antihipertensivă și peptidooligomanani cu activitate antihipertensivă.

Compoziția conform invenției este alcătuită din 20,7 – 28,2% lipide totale, inclusiv stearat de sucroză, 29,40- 41,8% peptidooligomanani, 6,65-12,55% esteri etilici ai acizilor grași saturați, 15,40-30,20 polifenoli totali, exprimați ca echivalent de acid galic și apă reziduală.

Procedeu de obținere a compoziției conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- Diluarea cu apă, 5 litri de apă adăugată la 1 kg de drojdie de vin recuperată din procesul de vinificație;
- Hidroliza enzimatică a drojdiei de vin cu o doză de 0,1 grame amestec de enzime care acționează asupra pereților celulari de drojdie și care conține  $\beta$ -glucanaze și proteaze, la 50°C, timp de 24 ore;
- Separarea resturilor celulare ne-hidrolizate prin centrifugare la 75000xg timp de 15 minute;
- Răcirea la temperatura camerei și adăugarea de stearat de sucroză până la atingerea unor concentrații de 0,71-1,24%;

- Omogenizarea cu ultrasunete, timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min. 400 W;
- Ultrafiltrarea tangențială a supernatantului rezultat, pe o membrană cu limită de excludere de 20 KDa, la un debit pe minut care reprezintă 1% din volumul util al vasului de alimentare, și la o diferență de presiune de 140-170 kPa;
- Concentrarea retentatului până la 15% substanță uscată și uscarea prin liofilizare la temperatura cuprinsă între -2°C și 20°C și la o presiune cuprinsă între 0,01 și 0,1 mbar.  
Invenția prezintă următoarele avantaje;
- Asigură obținerea unui produs multifuncțional, cu utilizări pentru realizarea de cosmeceutice și nutraceutice, care include aromatizați și compuși cu activitate antioxidantă, antimicrobiană și antihipertensivă;
- Eliberează din biomasa de drojdie de vinificație agenți surfactanți care acționează împreună cu stearatul de sucroză pentru formarea unor miclele cu masă moleculară aparentă ridicată;
- Permite valorificarea în totalitate a drojdie de vin, întrucât subprodusele rezultate, sediment de celule de drojdie și permeat soluție alcoolică de bitartrat de potasiu sunt utilizabile pentru recuperarea proteinelor, alcoolului și/sau a acidului tartric prin procedee cunoscute.

În cele ce urmează invenția este ilustrată prin exemple de realizare, care nu limitează domeniul ei de aplicare.

*Exemplul 1.* Se ia 1 kg de drojdie de vin de la producerea vinului roșu (Fetească Neagră) prin vinificație pe boască de struguri. Drojdia de vin a fost în prealabil trecută prin sită cu pânză de tifon, pentru reținerea impurităților mecanice grosiere. Se aduce drojdia de vin într-un vas de sticlă Simax de 10 litri prevăzut cu manta de încălzire. Se diluează drojdia cu apă, adăugându-se 5 litri de apă la 1 kg de drojdie de vin recuperată din procesul de vinificație în roșu. Se montează pe ieșirea vasului un refrigerent de condensare. Se aduce temperatura vasului la 50°C. Se adăugă 0,5 grame amestec de enzime care acționează asupra pereților celulari de drojdie și care conține  $\beta$ -glucanaze și proteaze. Amestecul de hidrolaze folosit este VinoTaste® Pro (Novozyme A/S, Bagsvaerd, Danemarca), un amestec de enzime litice care include  $\beta$  1-3 și  $\beta$  1-6 glucanaze, proteaze și pectinază. Activitatea declarată este de 75 BGXU/g O unitate BGXU este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care, în condiții standard, la 23°C, pH 5, timp de 1 min, eliberează din substratul laminarină 1  $\mu$ mol de grupări reducătoare

carbohidrați (calculate ca glucoză) per min. Orice alt amestec de enzime cu aceleași caracteristici poate fi utilizat.

Suspensia de drojdie de vin - enzime este amestecată cu agitatorul la 25 rpm și menținută la 50°C timp de 24 ore. După terminarea reacției de hidroliză enzimatică se răcește la temperatura camerei. Se separă resturile celulare prin centrifugare continuă pe o centrifugă continuă de laborator Westfalia Laboratory Separator, model SA 1-02-175 (GEA Westfalia Separator Group, Oelde, Germania), care este operată la o viteză a discurilor de centrifugare de 8.000 rpm, echivalent a 7500 x g, la o rată de alimentare de 0.5 litri/min, cu separarea continuă a supernatantului clarificat și discontinuă a resturilor celulare, ajunse la o densitate de 1100 kg/m<sup>3</sup>. În supernatant se adaugă stearat de sucroză (RYOTO S-1170, Mitsubishi Chemical Holdings Corporation, Tokio, Japonia), până la atingerea unei concentrații de 1,03%. Intermitent, 30 secunde la fiecare 5 min, se trece cu un debit de 2 litri pe min prin celula de flux pe care este montată o sonotrodă UIP 1000 hd (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Germania), omogenizându-se amestecul la 20 kHz și cu o putere de 400 W.

Supernatantul se ultrafiltrează pe un sistem de ultrafiltrare tangențială alcătuit dintr-un 1 recipient de 8 litri (5 litri utili), prevăzut cu agitator mecanic, care este vasul de alimentare, 1 modul de ultrafiltrare Biomax, cu membrană de polietersulfonă, cu pragul de excludere de 20 kDa și cu o suprafața de 50 cm<sup>2</sup> (Merck Group, Darmstad, Germania), 1 recipient de recepție a retentatului de 1 litru util, 1 recipient de recepție a permeatului și un sistem de pompe pentru ultrafiltrare Cogent M1 (Merck Group). Se lucrează la un debit pe minut care reprezintă 1% din volumul util al vasului de alimentare, respectiv 50 ml/min, și la o diferență de presiune de 140-170 kPa.

Retentatul este concentrat până la 15% substanță uscată prin utilizarea unui evaporator rotativ (Rotavapor® R-300, Buchi, Flavil, Elveția). Concentratul se usucă prin liofilizare (Cool Safe 554, Labogene, Allerød, Danemarca), la o temperatură cuprinsă între -2°C și 20°C și la o presiune cuprinsă între 0,01 și 0,1 mbar.

În compoziția rezultată se determină lipidele totale, inclusiv stearatul de sucroză, peptidooligomanani, esterii etilici ai acizilor grași saturați cu rol de compuși de aromă și polifenolii total. Se obține o compoziție care este alcătuită din 28,2% lipide totale, inclusiv stearat de sucroză, 29,4% peptidooligomanani, 6,65 esterii etilici ai acizilor grași saturați, 30,20 polifenoli totali, exprimați ca echivalent de acid galic. Restul până la 100% este reprezentat de apa reziduală. Compoziția rezultată are un miros persistent de coniac.

În compoziția rezultată se determină activitatea antioxidantă de stingere a radicalului DDPH (Sharma & Bhat, 2009, *Food chemistry*, 113(4), 1202-1205). Se determină o activitate de 6280  $\mu\text{mol}$  echivalent Trolox (TE) per gram de compoziție. Se determină activitatea antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. (Katalinić et al. 2010, *Food chemistry*, 119(2), 715-723). Se determină o concentrație minimă inhibitorie de 0,09 mg/ml. Se determină activitatea de inhibare *in vitro* a enzimei de conversie a angiotensinei (Chang et al. 2001, *Analytical Biochemistry*, 291, 84–88). Se determină o valoare a concentrației de inhibare 50% IC50 = 610  $\mu\text{M}$ .

*Exemplul 2.* Se lucrează la fel ca în Exemplu 1. Diferența este că se folosește drojdie de vin de la producerea vinului alb (Fetească Albă). Se adaugă stearat de sucroză până la atingerea concentrației de 0,71%. Compoziția rezultată este alcătuită din 20,7 % lipide totale, inclusiv stearat de sucroză, 41,8% peptidooligomanani, 12,55% esteri etilici ai acizilor grași saturați, 15,40% polifenoli totali, exprimați ca echivalent de acid galic și apă reziduală.

În compoziția rezultată se determină activitatea antioxidantă de stingere a radicalului DDPH. Se determină o activitate de 2860  $\mu\text{mol}$  echivalent Trolox (TE) per gram de compoziție. Se determină activitatea antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se determină o concentrație minimă inhibitorie de 0,17 mg/ml. Se determină activitatea de inhibare *in vitro* a enzimei de conversie a angiotensinei (Chang et al. 2001, *Analytical Biochemistry*, 291, 84–88). Se determină o valoare a concentrației de inhibare 50% IC50 = 540  $\mu\text{M}$ .

## Revendicări

1. Compoziția conform invenției **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din 20,7 – 28,2% stearat de sucroză, 29,40- 41,8% peptidooligomanani, 6,65-12,55% esteri etilici ai acizilor grași saturați, 15,40-30,20 polifenoli totali, exprimați ca echivalent de acid galic și apă reziduală.
2. Procedul de obținere a compoziției conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: diluarea cu apă, 5 litri de apă adăugată la 1 kg de drojdie de vin recuperată din procesul de vinificație; hidroliza enzimatică a drojdiei de vin cu o doză de 0,1 grame amestec de enzime care acționează asupra pereților celulari de drojdie și care conține  $\beta$ -glucanaze și proteaze, la 50°C, timp de 24 ore; separarea resturilor celulare ne-hidrolizate prin centrifugare la 75000.xg timp de 15 minute; răcirea la temperatura camerei și adăugarea de stearat de sucroză până la atingerea unor concentrații de 0,71-1,24%; omogenizarea cu ultrasunete, timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min. 400 W; ultrafiltrarea tangențială a supernatantului rezultat, pe o membrană cu limită de excludere de 20 KDa, la un debit pe minut care reprezintă 1% din volumul util al vasului de alimentare, și la o diferență de presiune de 140-170 kPa; concentrarea retentatului până la 15% substanță uscată și uscarea prin liofilizare la temperatura cuprinsă între -2°C și 20°C și la o presiune cuprinsă între 0,01 și 0,1 mbar.