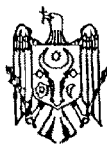




MD 4216 C1 2013.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4216** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/16* (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2012 0063 (22) Data depozit: 2012.08.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.04.30, BOPI nr. 4/2013
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: USATII Agafia, MD; MOLODOI Elena, MD; EFREMOVA Nadejda, MD; CHISELIȚA Natalia, MD; BORISOVA Tamara, MD; FULGA Ludmila, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Tulpină de drojdii *Saccharomyces cerevisiae* – producătoare de manani**

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de drojdii *Saccharomyces cerevisiae* și poate fi utilizată în tehnologia de producere a polizaharidelor, în special a mananilor utilizați în ramurile vinicolă, farmaceutică, alimentară.

2

5

Tulpina de drojdii este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM cu numărul CNMN-Y-18 și poate fi utilizată în calitate de sursă de manani.

10

Revendicări: 1

MD 4216 C1 2013.11.30

(54) Strain of *Saccharomyces cerevisiae* yeast – producer of mannans

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, in
particular to a strain of *Saccharomyces*
cerevisiae yeast and can be used in the
polysaccharide production technology,
particularly mannans used in wine-making,
pharmaceutical and food industries.

2
The yeast strain is deposited in the National
Collection of Nonpathogenic Microorganisms
of the Institute of Microbiology and
Biotechnology of the ASM under the number
CNMN-Y-18 and can be used as a source of
mannans.

Claims: 1

(54) Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – продуцент маннанов

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехноло-
гии, в частности к штамму дрожжей
Saccharomyces cerevisiae и может быть
использовано в технологии производства
полисахаридов, в частности маннанов,
используемых в винодельческой, фармацев-
тической, пищевой отраслях.

2
Штамм дрожжей депонирован в
Национальной Коллекции Непатогенных
Микроорганизмов Института Микробио-
логии и Биотехнологии АНМ под номером
CNMN-Y-18 и может быть использован в
качестве источника маннанов.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de drojdii *Saccharomyces cerevisiae* și poate fi utilizată în tehnologia de producere a polizaharidelor, în special a mananilor utilizați în ramurile vinicolă, farmaceutică, alimentară.

5 Sunt cunoscute tulpini de drojdii din genul *Saccharomyces*, ce conțin în medie 3,0...4,2 g de manani per 100 g de masă celulară sau tulpini din alte genuri *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, care conțin până la 5,0...5,8 g de manani per 100 g de masă celulară [1]. Însă acești reprezentanți posedă capacitate redusă de sinteză.

10 Soluția cea mai apropiată este tulpina *Saccharomyces cerevisiae*, care conține 93,3 $\mu\text{g mg}^{-1}$ (respectiv 9,33%) manani în biomasa celulară [2]. Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în cantitatea mică de manani sintetizați.

Problema pe care o rezolvă invenția este obținerea unei tulpini cu potențial sporit de biosinteză a mananilor.

15 Esența invenției constă în aceea că se propune tulpina de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 în calitate de sursă de manani.

Tulpina *Saccharomyces cerevisiae* este izolată din cultură pură și depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a IMB al ASM ca producător de manani cu numărul CNMN-Y-18.

Caracterele morfologo-culturale ale tulpinii

20 Cultivarea pe medii lichide. Pe mediul YPD sau Rieder se întâlnesc celule rotunde care înmuguresc, sunt solitare, cultura formează asce, ascospori rotunzi, neeliberați, netezi. La limita de separare dintre suprafața mediului lichid și peretele vasului se formează un inel, pe fundul vasului se formează un depozit poros pe mediul YPD de culoare crem-deschisă sau dens mucoidă pe mediul Rieder.

25 Cultivarea pe medii solide. Aspectul coloniilor examinate: pe mediul must de malț – S-formă, cu profil convex, mată, diametrul coloniei de 3...6 mm, pigmentația crem-deschisă, centrul roz, consistența păstoasă; pe mediul YPD – S-formă, cu profil bombat, mată, diametrul coloniei de 2...3 mm, pigmentația albă, consistența păstoasă; pe mediul Rieder – S-formă, cu profil bombat, mată, cu gurgui central, diametrul coloniei 1...2 mm, pigmentația crem-deschisă, consistența păstoasă.

30 Caracteristici fiziologice. Tulpina este facultativ anaerobă, mezofilă, se dezvoltă optim în intervalul termic de 25...27°C. Celule care înmuguresc, uneori formează pseudohife, asce persistente, ascospori neeliberați, rotunzi, netezi. Nu formează peliculă. Tulpina asimilează glucoză, maltoză, manoză, zaharoză, fructoză, arabinoză, galactoză, rafinoză, xiloză, trehaloză, glicerină, alcool etilic. Din gama surselor de azot drojdia asimilează diferite forme de compuși – sulfatul de amoniu, fosfatul de amoniu. Nu asimilează nitrații, ureaza, lizina.

Temperatura optimă de cultivare a culturii de drojdie este de 25°C, pH-ul inițial 5,5.

Parametrii productivi ai tulpinii

40 La cultivare pe mediul Rieder (temperatura de 25°C, durata de cultivare 120 ore), tulpina acumulează în medie 3,1±0,6 g L⁻¹ biomasă uscată ce conține 115,7 $\mu\text{g mg}^{-1}$ (respectiv 11,6%) manani. La cultivare pe mediul YPD tulpina acumulează 5,56±0,01 g L⁻¹ biomasă uscată ce conține 110,2 $\mu\text{g mg}^{-1}$ (respectiv 11,02%) manani.

45 Rezultatul tehnic al invenției constă în selectarea unei tulpini de drojdie cu conținut înalt de manani – 115,7 $\mu\text{g mg}^{-1}$ în biomasa uscată.

Exemple de realizare a invenției**Exemplul 1**

50 Materialul semincer se obține prin cultivarea tulpinii de drojdie pe must de bere de 7%, în condiții aseptice, timp de 48 ore, pe agitator (200 rpm), la temperatura de 24...25°C. Inoculul obținut se utilizează pentru mediile de fermentație în volum de 5%. Cultivarea în profunzime se realizează în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 1 L, ce conțin 0,2 L de mediu nutritiv YPD, g/L: extract de drojdie – 10; peptonă – 20; glucoză – 20; apă potabilă – 1 L; pH 5,5. Durata de cultivare – 120 ore la temperatura de 25°C.

55 Biomasa de drojdie se colectează prin separarea de lichidul cultural prin centrifugare la 3000 g/15 min, spălarea depozitului cu apă distilată sterilă și centrifugarea repetată. Celulele de drojdie se usucă la 105°C timp de 5 ore în dulapul de uscare, apoi biomasa de drojdie se cântărește la balanța analitică.

Extracția mananilor din biomasa celulară se efectuează conform metodei cu utilizarea reactivului Fehling. 50 g de autolizat de *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 (substanța uscată 30%) se tratează cu 250 ml de soluție de 2% NaOH, se transferă pe baia de apă la temperatura de 120°C și agitare la 150 rpm, timp de 2 ore. Suspensia răcită se centrifughează, supernatantul se colectează și se ajustează pH-ul la 6,5 cu acid acetic 10%. Supernatantul se concentrează la 1/5 din volumul inițial. Pentru precipitarea mananilor se adaugă alcool etilic absolut în volum de 1:3. Precipitatul de manoproteine se separă de supernatant. Sedimentul rezultat se spală de două ori cu etanol absolut, apoi se usucă la 70°C.

Mananul nepurificat se dizolvă în 25 ml de apă, se centrifughează, la supernatant se adaugă soluție de 3% NaOH și reactivul Fehling până la colorarea supernatantului. Complexul manan-cupru se spală cu apă caldă de 40°C, apoi se suspendă în 7,5 ml de apă și se adaugă treptat acid clorhidric concentrat. După dizolvarea complexului se adaugă trei volume de etanol, sedimentul obținut se filtrează, apoi iarăși se dizolvă în 20 ml de apă, se adaugă 6 ml de acid acetic glacial și 25 mg de cărbune activ, ulterior se agită. Suspensia se centrifughează și la supernatant se adaugă 25 ml de etanol. Precipitatul obținut se spală cu apă și se usucă.

Cultivarea tulpinii de drojdie pe mediul de cultură și condițiile indicate asigură acumularea a $5,56 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ de biomasă uscată. Conținutul de manani în masa celulară constituie $110,2 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ (respectiv 11,02%), ceea ce este cu 18,1% mai mult față de cea mai apropiată soluție.

Exemplul 2

Materialul semincer se obține prin cultivarea tulpinii de drojdie pe must de bere de 7%, în condiții aseptice, timp de 48 ore, pe agitator (200 rpm), la temperatura de 24...25°C. Inoculul obținut se utilizează pentru mediile de fermentație în volum de 5%. Cultivarea în profunzime se realizează în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 1 L, ce conțin 0,2 L de mediu nutritiv Rieder, g/L: glucoză – 30,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; KH_2PO_4 – 1,0; NaCl – 0,5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,4; autolizat de drojdie – 10 ml; apă potabilă – 1L; pH 5,5. Durata de cultivare – 120 ore la temperatura de 25°C.

Biomasa de drojdie se colectează prin separarea de lichidul cultural, prin centrifugare la 3000 g/15 min, spălarea depozitului cu apă distilată sterilă și centrifugarea repetată. Celulele de drojdie se usucă la 105°C timp de 5 ore în dulapul de uscare, apoi biomasa de drojdie se cântărește la balanța analitică.

Extracția mananilor din biomasa celulară se efectuează conform metodei cu utilizarea reactivului Fehling. 50 g de autolizat de *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 (substanța uscată 30%) se tratează cu 250 ml de soluție de 2% NaOH, se transferă pe baia de apă la temperatura de 120°C și se agită la 150 rpm, timp de 2 ore. Suspensia răcită se centrifughează, supernatantul se colectează, iar pH-ul se ajustează la 6,5 cu acid acetic 10%. Supernatantul se concentrează la 1/5 din volumul inițial. Pentru precipitarea mananilor se adaugă alcool etilic absolut în volum de 1:3. Precipitatul de manoproteine se separă de supernatant. Sedimentul rezultat se spală de două ori cu etanol absolut, apoi se usucă la 70°C.

Mananul nepurificat se dizolvă în 25 ml de apă, se centrifughează, la supernatant se adaugă soluție de 3% NaOH și reactivul Fehling până la colorarea supernatantului. Complexul manan-cupru se spală cu apă caldă de 40°C, apoi se suspendă în 7,5 ml de apă și se adaugă treptat acid clorhidric concentrat. După dizolvarea complexului se adaugă trei volume de etanol, sedimentul obținut se filtrează, apoi iarăși se dizolvă în 20 ml apă, se adaugă 6 ml de acid acetic glacial și 25 mg de cărbune activ, ulterior se agită. Suspensia se centrifughează și la supernatant se adaugă 25 ml de etanol. Precipitatul obținut se spală cu apă și se usucă.

Cultivarea tulpinii de drojdie pe mediul de cultură și condițiile indicate asigură acumularea a $3,1 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ de biomasă uscată. Conținutul de manani în masa celulară constituie $115,7 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ (respectiv 11,57%), ceea ce este cu 24,3% mai mult față de cea mai apropiată soluție.

MD C2

5

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Jan Kocourek, Linton E. Ballou. Method for fingerprinting yeast cell wall mannans. Journal of Bacteriology, 1969, vol. 100, nr. 3, p. 1175-1181
2. B. Aguilar-Uscanga, J.M. Francois. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letters in Applied Microbiology, 2003, 37, p. 268-274

(57) Revendicări:

Tulpină de drojdii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 – producătoare de manani.

Șef Secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii
(21) Nr. depozit: a 2012 0063 (22) Data depozit: 2012.08.15 (71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (54) Titlul: Tulpină de drojdie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - sursă de manani
II. Clasificarea obiectului invenției: (51) Int.Cl: <i>C12R 1/865</i> (2006.01) <i>C12P 19/04</i> (2006.01)
III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative) MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): “<i>Saccharomyces cerevisiae</i> conținut de manane”, “drojdii conținut de manane”, “manane drojdii” Int. Cl : C12R 1/865, C12P 19/04 "Worldwide" (Espacenet): “<i>Saccharomyces cerevisiae</i> mannane content”, “yeast mannan content”, “yeast mannan” Int. Cl : C12R 1/865, C12P 19/04 EA, CIS (Eapatis): “<i>Saccharomyces cerevisiae</i> содержание маннанов”, “дрожжи содержание маннанов ”, “дрожжи маннаны” Int. Cl : C12R 1/865, C12P 19/04 SU (nonpublic): “<i>Saccharomyces cerevisiae</i> содержание маннанов”, “дрожжи содержание маннанов ”, “дрожжи маннаны” Int. Cl : C12R 1/865, C12P 19/04 RO-Patent: “<i>Saccharomyces cerevisiae</i> conținut de manane”, “drojdii conținut de manane”, “manane drojdii” Int. Cl : C12R 1/865, C12P 19/04
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

T. N. Cawley, Clinton E. Ballou. Identification of Two *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Mannan Chemotypes. J. Bacteriol., 1972, 111(3), p. 690–695.

Tasuku Nakajima, Clinton E. Ballou. Characterization of the Carbohydrate Fragments Obtained from *Saccharomyces cerevisiae* Mannan by Alkaline Degradation. The Journal of Biological Chemistry, 1974, vol. 249, nr. 23, p. 7679-7684.

N. Shibata, K. Mizugami, K. Takano and S. Suzuki. Isolation of mannan-protein complexes from viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A wild type and *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1 A-5 mutant strains by the action of Zymolyase-60,000. J Bacteriol., 1983, 156(2), p. 552–558.

Y. Okubo, N. Shibata, T. Matsumoto, M. Suzuki, C. Schuerch and S. Suzuki. Immunochemical studies of the mannans of *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A-5 and *Saccharomyces cerevisiae* 4484-24D-1 mutant strains, with special reference to their phosphate content. J. Bacteriol., 1980, 144(1), p. 92–96.

L. A. White, M. C. Newman, G. L. Cromwell and M. D. Lindemann. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. J. Anim. Sci., 2002, vol. 80, nr. 10, p. 2619-2628.

www.china-papers.com

<http://www.jbc.org/content/249/23/7679.full.pdf>

www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../PMC251341

<http://link.springer.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles>

<http://www.nutriteck.com/bulk/mosyeast.html>

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 4048 C1 2010.06.30	1
A	JP 2011178794 A 2011.09.15	1
A	CN 102099461 A 2011.06.15	1
A	JP 2010284085 A 2010.12.24	1
A	WO 0008201 A1 2000.02.17	1
A	JP 58109423 A 1983.06.29	1
A	JP 54097692 A 1979.08.01	1
A	CN 102488100 A 2012.06.13	1
A	JP 2006117566 A 2006.05.11	1
A	JP 58121216 A 1983.07.19	1
A	US 2010190872 A1 2010.07.29	1
A	CN 101570769 A 2008.04.29	1
A	WO 2006025295 A1 2006.03.09	1
A	JP 9084529 A 1997.03.31	1
A, D	Jan Kocourek, Linton E. Ballou. Method for fingerprinting yeast cell wall mannans. Journal of Bacteriology, 1969, vol. 100, nr. 3, p. 1175-1181	1
A, D, C	B. Aguilar-Uscanga, J.M. Francois. A study of the yeast cell wall composition and structure in respons to growth conditions and mode of cultivation. Letters in Applied Microbiology, 2003, 37, p. 268-274	1

* categoriile speciale ale documentelor citate:	
A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării	2013.02.07
Examinator	LUPAȘCU Lucian