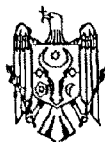




MD 1396 Z 2020.06.30

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1396** (13) **Z**  
(51) Int.Cl: C12N 1/04 (2006.01)  
C12N 1/16 (2006.01)  
C12N 1/20 (2006.01)  
C12R 1/865 (2006.01)

### (12) BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ

(21) Nr. depozit: s 2018 0111 (22) Data depozit: 2018.11.27	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.11.30, BOPI nr. 11/2019
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: BATIR Ludmila, MD; DJUR Svetlana, MD; SLANINA Valerina, MD; RUDIC Valeriu, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD	

(54) **Procedeu de conservare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21**

(57) **Rezumat:**

1  
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de conservare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21, care poate fi utilizat pentru păstrarea microorganismelor pe un termen îndelungat și utilizarea acestora ca surse de substanțe biologice active.

Procedeu, conform invenției, include cultivarea tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 pe un mediu nutritiv în decurs de 72 de ore la temperatura de 26-28°C, suspensionarea culturii până la titrul de  $10^5$ - $10^6$  ml<sup>-1</sup> într-un mediu constituit din lapte degresat și 5-10% vol. soluție care conține 10

2  
mg/ml de extract, obținut din biomasa de spirulină prin extragere succesivă cu soluție alcoolică de 20-30% și soluție de NaOH de 0,45%, congelarea rapidă a suspensiei la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de 4°C.

Rezultatul tehnic al invenției constă în majorarea conținutului de proteine și carbohidrați în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 după un an de păstrare în stare liofilizată respectiv cu 35,31-37,03% și 35,62-39,56%.

Revendicări: 1

MD 1396 Z 2020.06.30

**(54) Process for preserving the *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 yeast strain****(57) Abstract:**

1

The invention relates to biotechnology, in particular to a process for preserving the *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 yeast strain, which can be used for long-term storage of microorganisms and their use as sources of biologically active substances.

The process, according to the invention, comprises cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 strain on a nutrient medium for 72 hours at a temperature of 26-28°C, suspension of the culture to a titer of  $10^5$ - $10^6$  ml<sup>-1</sup> in a medium consisting of skim milk and 5-10% vol. of a solution comprising 10 mg/ml of extract, obtained from spirulina

2

biomass by sequential extraction with 20-30% alcohol solution and 0.45% NaOH solution, rapid freezing of the suspension at a temperature of -20°C, lyophilization and storage at a temperature of 4°C.

The technical result of the invention consists in increasing the protein and carbohydrate content in the biomass of *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 yeast after one year of storage in a lyophilized state by 35.31-37.03% and 35.62-39.56%, respectively.

Claims: 1

**(54) Способ консервирования штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21****(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу консервирования штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21, который может быть использован для длительного хранения микроорганизмов и их использования в качестве источников биологически активных веществ.

Способ, согласно изобретению, включает культивирование штамма *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 на питательной среде в течение 72 часов при температуре 26-28°C, суспендирование культуры до титра  $10^5$ - $10^6$  мл<sup>-1</sup> в среде, состоящей из обезжиренного молока и 5-10% об. раствора, содержащего 10 мг/мл

2

экстракта, полученного из биомассы спирулины последовательным экстрагированием 20-30%-ным спиртовым раствором и 0,45%-ным раствором NaOH, быстрое замораживание суспензии при температуре -20°C, лиофилизацию и сохранение при температуре 4°C.

Технический результат изобретения заключается в повышении содержания белка и углеводов в биомассе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 после одного года хранения в лиофилизированном состоянии соответственно на 35,31-37,03% и 35,62-39,56%.

П. формулы: 1

**Descriere:**

5 Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de conservare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21, care poate fi utilizat pentru păstrarea microorganismelor pe un termen îndelungat și utilizarea acestora ca surse de substanțe biologice active.

10 În prezent este cunoscut un procedeu de conservare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 pe mediul protector constituit din lapte degresat, care după un an de păstrare în stare liofilizată, după 3 pasaje de cultivare, când tulpina revine la starea sa fiziologică normală, asigură obținerea unor valori ale conținutului de proteine și carbohidrați de 35,32% și 23,08% din biomasa absolut uscată, respectiv [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că conținutul substanțelor bioactive (proteinelor și carbohidraților) după un an de conservare în stare liofilizată, este insuficient de înalt.

15 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de conservare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 prin liofilizarea acesteia, cu utilizarea unui mediu protector ce asigură stimularea conținutului de proteine și carbohidrați după un an de conservare.

20 Procedeu revendicat constă în cultivarea tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 pe un mediu nutritiv în decurs de 72 de ore la temperatura de 26-28°C, suspensionarea culturii până la titrul de  $10^5$ - $10^6$  ml<sup>-1</sup> într-un mediu constituit din lapte degresat și 5-10% vol. soluție care conține 10 mg/ml de extract, obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-02, congelarea rapidă a suspensiei la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de 4°C, totodată extractul este obținut prin extragerea biomasei cu soluție alcoolică de 20-30% cu separarea sedimentului, uscarea la temperatura 40-45°C, extragerea repetată cu soluție 25 de NaOH de 0,45% timp de 60 și 30 min la agitare cu centrifugarea, separarea sedimentelor și unirea supernatantelor, dializa până la pH 7,5-8,5 și diluarea cu apă până la concentrația de 1% mas. de substanțe uscate.

După un an de conservare în stare liofilizată conținutul de proteine atinge valori de 47,79-48,40% din BAU iar cel de carbohidrați de 31,30-32,21% din BAU.

30 Suplinirea mediului protector cu extract bioactiv obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* ce posedă acțiune antioxidantă și antiradicalică pronunțată a contribuit la majorarea conținutului de proteine și carbohidrați în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21.

35 Rezultatul tehnic al invenției constă în majorarea conținutului de proteine și carbohidrați în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 după un an de păstrare în stare liofilizată respectiv cu 35,31-37,03% și 35,62-39,56%.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de mediu protector pentru liofilizarea levurilor *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 se utilizează lapte degresat combinat cu extractul biologic activ obținut din biomasa de spirulină.

40 Exemple de realizare a invenției

**Exemplul 1**

45 Procedeu de obținere a extractului din biomasa de spirulină se realizează în felul următor. La 1000 ml de biomasă de spirulină (100 mg/ml) se adaugă 1000 ml alcool de 30%, se agită timp de 60 min și se centrifughează la 3500 rot/min timp de 20 min. Precipitatul obținut este uscat la 40-50°C și supus extracției cu 500 ml de soluție de NaOH de 0,45%, timp de 60 min la agitare permanentă. După centrifugarea la 3500 rot/min la precipitat se adaugă 200 ml de soluție de NaOH de 0,45% și se extrage timp de 30 min. După centrifugare supernatantele se reunesc și sunt supuse dializei până la pH 7,5-8,5 și diluarea cu apă până la concentrația de 1% mas. de substanțe uscate. Extractul obținut este supus sterilizării.

50 Exemplul 2

În tuburi înclinate cu mediu malț agarizat se cultivă tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21, timp de 72 ore la t° de 26-28°C, după care cultura se suspensionază în mediul protector constituit din lapte degresat și 5% vol. de extract obținut din biomasa de spirulină, până la titrul de  $10^5$ - $10^6$  UFC ml<sup>-1</sup>. Suspensia obținută se repartizează câte 1,0 ml în flacoane, se congelează rapid 55 la -20°C, după care se liofilizează. Probele liofilizate sunt sigilate și plasate în frigider la t° de 4°C. După un an de păstrare în stare liofilizată tulpina se cultivă pe mediul malț agarizat timp de 3 pasaje consecutive, pentru a reveni la starea fiziologică normală și se determină conținutul de proteine și carbohidrați în biomasă.

Biomasa obținută conține 48,40% proteine și 32,21% carbohidrați din BAU, față de 35,32% proteine și 23,08% carbohidrați, conform celei mai apropiate soluții.

Exemplul 3

- 5 În tuburi înclinate cu mediu malț agarizat se cultivă tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21, timp de 72 ore la  $t^{\circ}$  de 26-28°C, după care cultura se suspensionază în mediul protector constituit din lapte degresat și 10% vol. extract obținut din biomasa de spirulină, până la titrul de  $10^5$ - $10^6$  UFC ml<sup>-1</sup>. Suspensia obținută se repartizează câte 1,0 ml în flacoane, se congelează rapid la -20°C, după care se liofilizează. Probele liofilizate sunt sigilate și plasate în frigider la  $t^{\circ}$  de 4°C.
- 10 După un an de păstrare în stare liofilizată tulpina se cultivă pe mediul malț agarizat timp de 3 pasaje consecutive, pentru a reveni la starea fiziologică normală și se determină conținutul de proteine și carbohidrați în biomasă.

Biomasa obținută conține 47,79% proteine și 31,30% carbohidrați din BAU, față de 35,32% proteine și 23,08% carbohidrați, conform celei mai apropiate soluții.

- 15 Sporirea conținutului de proteine și carbohidrați în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 în rezultatul conservării pot pune în evidență proprietățile tehnologice a acesteia pentru ulterioara utilizare la producerea industrială.

Tabel

Conținutul de proteine și carbohidrați în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21, după un an de conservare în stare liofilizată

Procedeele utilizat	Mediul protector	Conc.	Conținutul de proteine		Conținutul de carbohidrați	
			% BAU	% M	% BAU	% M
Conform celei mai apropiate soluții	Lapte degresat	–	35,32	100,00	23,08	100,00
Conform procedeeului revendicat	Lapte degresat + extract biologic activ	5%	48,40	137,03	32,21	139,56
		10%	47,79	135,31	31,30	135,62

20

Datele din tabel demonstrează majorarea cu 35,31-37,03% a conținutului de proteine și cu 35,62-39,56% a conținutului de carbohidrați în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 în procedeul propus în invenție față de procedeul descris în cea mai apropiată soluție.

#### (56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Батыр Л., Джур С., Бырса М., Рошка М. Изменение биохимического состава некоторых культур дрожжей после года хранения в лиофилизированном состоянии. XII Международная научно-практическая конференция European Scientific Conference. Пенза, 7.11.2018, p. 12-15

#### (57) Revendicări:

Procedeu de conservare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21, care include cultivarea tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 pe un mediu nutritiv în decurs de 72 de ore la temperatura de 26-28°C, suspensionarea culturii până la titrul de  $10^5$ - $10^6$  ml<sup>-1</sup> într-un mediu constituit din lapte degresat și 5-10% vol. soluție care conține 10 mg/ml de extract, obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-02, congelarea rapidă a suspensiei la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de 4°C, totodată extractul este obținut prin extragerea biomasei cu soluție alcoolică de 20-30% cu separarea sedimentului, uscarea la temperatura de 40-45°C, extragerea repetată cu soluție de NaOH de 0,45% timp de 60 și 30 min la agitare cu centrifugarea, separarea sedimentelor și unirea supernatantelor, dializa până la pH 7,5-8,5 și diluarea cu apă până la concentrația de 1% mas. de substanțe uscate.

**RAPORT DE DOCUMENTARE**

**I. Datele de identificare a cererii**

(21) Nr. depozit: s 2018 0111

(22) Data depozit: 2018.11.27

(71) Solicitant: **INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD**

(54) **Titlul: Procedeu de conservare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21**

**II. Clasificarea obiectului invenției:**

(51) **Int.Cl:** *C12N 1/04* (2006.01)

*C12N 1/16* (2006.01)

*C12N 1/20* (2006.01)

*C12R 1/865* (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):

**Int. Cl.:** *C12N 1/04; C12N 1/16; C12N 1/20; C12R 1/865*

Saccharomyces, conservare, extract, spirulina

**EA (Eapatis):**

**Int. Cl.:** *C12N 1/04; C12N 1/16; C12N 1/20; C12R 1/865*

Saccharomyces, консервирование, экстракт, спирулина

**IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate**

**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 1056 Y 2016.07.31	1
A	MD 1071 Y 2016.09.30	1
A	MD 1072 Y 2016.09.30	1
A	MD 1226 Y 2018.01.31	1
A	MD 1235 Y 2018.02.28	1
A	MD 4473 B1 2017.03.31	1
A	MD 4474 B1 2017.03.31	1
A	MD 4498 B1 2017.07.31	1
A	MD 4499 B1 2017.07.31	1
A	MD 4086 B1 2010.12.31	1

A, C, D	Батыр Л., Джур С., Бырса М., Рошка М. Изменение биохимического состава некоторых культур дрожжей после года хранения в лиофилизированном состоянии. XII Международная научно-практическая конференция European Scientific Conference. Пенза, 7.11.2018, p. 12-15	1
---------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

**\* categoriile speciale ale documentelor citate:**

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

Data finalizării documentării 05.08.2019

Examinator	GUȘAN Ala	
------------	-----------	-------------------------------------------------------------------------------------