



MD 1379 Z 2020.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1379** (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)
C08B 37/00 (2006.01)

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

<p>(21) Nr. depozit: s 2018 0109 (22) Data depozit: 2018.11.27</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.10.31, BOPI nr. 10/2019</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: BATÎR Ludmila, MD; DJUR Svetlana, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; CHISELIȚĂ Oleg, MD; RUDIC Valeriu, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD</p>	

(54) **Procedeu de conservare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de conservare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, care poate fi utilizat pentru păstrarea microorganismelor pe un termen îndelungat și utilizarea acestora ca surse de substanțe biologice active.

Procedeu, conform invenției, constă în cultivarea tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 pe un mediu nutritiv în decurs de 72 de ore la temperatura de 26...28°C, suspensionarea culturii într-un

2
mediu constituit din lapte degresat și 5...10% vol. soluție ce conține 10 mg/ml de extract de polizaharide sulfatate, obținut din biomasa de spirulină, până la titrul de $10^5...10^6$ ml⁻¹, congelarea rapidă la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de 4°C.

Rezultatul tehnic al invenției constă în majorarea conținutului de proteine în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 după un an de păstrare în stare liofilizată cu 25,32...26,62%.

Revendicări: 1

MD 1379 Z 2020.05.31

(54) Process for preserving the *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast strain**(57) Abstract:**

1
The invention relates to biotechnology, in particular to a process for preserving the *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 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, consists in cultivating the *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast strain on a nutrient medium for 72 hours at a temperature of 26...28°C, suspending the culture in a medium consisting of skim milk and 5...10% vol. solution comprising 10 mg/ml of extract of

2
sulfated polysaccharides, obtained from spirulina biomass, to a titer of $10^5...10^6$ ml⁻¹, rapid freezing 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 content in the *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast biomass after one year of storage in a lyophilized state by 25.32...26.62%.

Claims: 1

(54) Способ консервирования штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20**(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу консервирования штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, который может быть использован для длительного хранения микроорганизмов и их использования в качестве источников биологически активных веществ.

Способ, согласно изобретению, заключается в культивировании штамма *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 на питательной среде в течение 72 часов при температуре 26...28°C, суспендировании культуры в среде состоящей из

2
обезжиренного молока и 5...10%об. раствора содержащего 10 мг/мл экстракта сульфатированных полисахаридов, полученного из биомассы спирулины, до титра $10^5...10^6$ мл⁻¹, быстрое замораживание при температуре -20°C, лиофилизацию и сохранение при температуре 4°C.

Технический результат изобретения заключается в повышении содержания белка в биомассе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 после одного года хранения в лиофилизированном состоянии на 25,32...26,62%.

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-20, care poate fi utilizat pentru păstrarea microorganismelor pe un termen îndelungat și utilizarea acestora ca surse de substanțe biologice active.

10 In prezent este cunoscut un procedeu de conservare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 pe un mediu 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 de 36,47% din biomasa absolut uscată (BAU) [1].

15 Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că conținutul de proteine 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-20 prin liofilizarea acesteia, cu utilizarea unui mediu protector ce asigură sporirea conținutului de proteine din biomasa după un an de conservare.

20 Procedeu revendicat constă în cultivarea tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 pe un mediu nutritiv în decurs de 72 de ore la temperatura de 26...28°C, suspensionarea culturii într-un mediu constituit din lapte degresat și 5...10% vol. soluție ce conține 10 mg/ml de extract de polizaharide sulfatate, obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-02, până la titrul de $10^5...10^6$ ml⁻¹, congelarea rapidă la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de 4°C.

25 Polizaharidele sulfatate au fost extrase din biomasa de spirulină cu apă distilată în raport de 1:45 (m/V) la temperatura de 90°C, timp de 2 ore. După centrifugare timp de 10 min, la 4800 rot./min, la supernatant s-a adăugat soluție de 1% de bromură de cetiltrimetilamoniu pentru precipitarea polizaharidelor cu centrifugare repetată la aceiași parametri. Precipitatul obținut a fost spălat cu soluție saturată de acetat de sodiu în alcool de 95%, apoi repetat cu alcool de 96% (Ratana C., Nattayaporn C., Panya T., Veara L., Suvit T., Boosya B. Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and antioxidant capacity. International Journal of Biological Macromolecules. 2013, v.58, p.73-78).

30 După un an de conservare în stare liofilizată conținutul de proteine atinge valori de 45,70 – 46,17% din BAU.

35 Suplinirea mediului protector cu extract de polizaharide sulfatate, obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* ce posedă acțiune antioxidantă și antiradicalică pronunțată, a contribuit la majorarea conținutului de proteine în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20.

40 Rezultatul tehnic al invenției constă în majorarea conținutului de proteine în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 după un an de păstrare în stare liofilizată cu 25,32...26,62% față de cea mai apropiată soluție.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

45 În tuburi înclinate cu mediu mălț agarizat se cultivă tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, timp de 72 ore la temperatura de 26...28°C, după care cultura se suspensionază în mediul protector constituit din lapte degresat și 5% vol. soluție ce conține 10 mg/ml de extract de polizaharide sulfatate, obținut din biomasa de spirulină, până la titrul de $10^5...10^6$ UFC ml⁻¹. 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 temperatura de 4°C. După un an de păstrare în stare liofilizată tulpina se cultivă pe mediul mălț agarizat timp de 3 pasaje consecutive, pentru a reveni la starea fiziologică normală și se determină conținutul de proteine în biomasa.

50 Biomasa obținută conține 45,70% proteine din BAU, față de 36,47% proteine din BAU conform celei mai apropiate soluții.

55 Exemplul 2

În tuburi înclinate cu mediu mălț agarizat se cultivă tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, timp de 72 ore la temperatura de 26...28°C, după care cultura se suspensionază în mediul protector constituit din lapte degresat și 10% vol. soluție ce conține 10 mg/ml de polizaharide sulfatate, obținut din biomasa de spirulină, până la titrul

de $10^5 \dots 10^6$ UFC ml⁻¹. 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 temperatura 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 în biomasă.

5

Biomasa obținută conține 46,17% proteine din BAU, față de 36,47% proteine din BAU conform celei mai apropiate soluții.

Sporirea conținutului de proteine în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în rezultatul conservării pot pune în evidență proprietățile tehnologice a acesteia pentru ulterioara utilizare la producerea industrială.

10

Tabel

Conținutul de proteine în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 după un an de conservare în stare liofilizată

Procedeul utilizat	Mediul protector	Conc. extract, %	Conținutul de proteine	
			% BAU	% M
Conform celei mai apropiate soluții	Lapte degresat	–	36,47	100,00
Conform procedeului revendicat	Lapte degresat + extract biologic activ	5	45,70	125,32
		10	46,17	126,62

15

Datele din tabel demonstrează majorarea cu 25,32...26,62% a conținutului de proteine în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 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:

Procedeul de conservare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, care include cultivarea tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 pe un mediu nutritiv în decurs de 72 de ore la temperatura de 26...28°C, suspensionarea culturii într-un mediu constituit din lapte degresat și 5...10% vol. soluție ce conține 10 mg/ml de extract de polizaharide sulfatate, obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-02, până la titrul de $10^5 \dots 10^6$ ml⁻¹, congelarea rapidă la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de 4°C.

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: s 2018 0109		
(22) Data depozit: 2018.11.27		
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD		
(54) Titlul: Procedeu de conservare a tulpinii de levuri <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CNMN-Y-20		
II. Clasificarea obiectului invenției:		
(51) Int.Cl: <i>C12N 1/04</i> (2006.01) <i>C12R 1/865</i> (2006.01) <i>C12N 1/16</i> (2006.01) <i>C08B 37/00</i> (2006.01) <i>C12N 1/20</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): Int. Cl.: <i>C12N 1/04; C12N 1/16; C12N 1/20; C12R 1/865; C08B 37/00</i> Saccharomyces, conservare, polizaharide, spirulina		
EA (Eapatis): Int. Cl.: <i>C12N 1/04; C12N 1/16; C12N 1/20; C12R 1/865; C08B 37/00</i> Saccharomyces, консервирование, полисахарид, спиролина		
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:**

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 evidența 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 17.07.2019

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