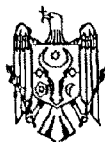




MD 1380 Z 2020.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1380** (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 0110 (22) Data depozit: 2018.11.27	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.10.31, BOPI nr. 10/2019
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: BATIR Ludmila, MD; DJUR Svetlana, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDIC Valeriu, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD	

(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 până la titrul de $10^5...10^6$ ml⁻¹ într-un mediu constituit din

2
lapte degresat și 5...10% vol. soluție hidroetanolică de 65%, care conține 5 mg/ml de extract, obținut din biomasa de spirulină, 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 în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 după un an de păstrare în stare liofilizată cu 20,70...40,48%.

Revendicări: 1

MD 1380 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 to a titer of 10^5 ... 10^6 ml⁻¹ in a medium consisting of skim milk and 5...10% vol. 65% water-ethanol

2

solution, comprising 5 mg/ml of extract, obtained from spirulina biomass, rapid freezing of 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 content in the *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast biomass after one year of storage in a lyophilized state by 20.70...40.48%.

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 до титра 10^5 ... 10^6 мл⁻¹ в среде,

2

состоящей из обезжиренного молока и 5...10%об. 65%-ного водно-этанольного раствора, содержащего 5 мг/мл экстракта полученного из биомассы спирулины, быстрое замораживание суспензии 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 20,70...40,48%.

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 după un an de conservare.

20 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 până la titrul de $10^5 \dots 10^6 \text{ ml}^{-1}$ într-un mediu constituit din lapte degresat și 5...10% vol. soluție hidroetanolică de 65%, care conține 5 mg/ml de extract, obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 prin extragerea repetată a biomasei cu etanol de 96% și de 65%, cu centrifugarea și unirea supernatantelor, după care se efectuează congelarea rapidă a suspensiei la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de 4°C.

25 După un an de conservare în stare liofilizată conținutul de proteine atinge valori de 44,02...51,23% din BAU.

30 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.

35 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 20,70...40,48%.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

40 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 până la titrul de $10^5 \dots 10^6 \text{ UFC ml}^{-1}$ în mediul protector constituit din lapte degresat și 5% vol. soluție hidroetanolică de 65%, care conține 5 mg/ml de extract, obținut din biomasa de spirulină prin extragerea consecutivă a unui volum de biomasă de spirulină cu concentrația de 100 mg/ml cu 2 volume de etanol de 96%, după 60 min de extracție se efectuează centrifugarea, la precipitat se adaugă un volum de etanol de 65%, după 60 min se efectuează centrifugarea și supernatantele se amestecă. Soluția hidroetanolică obținută se standardizează la 65%, se determină concentrația extractului prin cântărire și se ajustează la 5 mg/ml, după care se adaugă la mediul de protecție. 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 biomasă.

50 Biomasa obținută conține 51,23% 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 până la titrul de $10^5 \dots 10^6 \text{ UFC ml}^{-1}$ în mediul protector constituit din lapte degresat și 10% vol. soluție hidroetanolică de 65%, care conține 5 mg/ml de extract, obținut

5 din biomasa de spirulină prin extragerea consecutivă a unui volum de biomasă de spirulină cu concentrația de 100 mg/ml cu 2 volume de etanol de 96%, după 60 min de extracție se efectuează centrifugarea, la precipitat se adaugă un volum de etanol de 65%, după 60 min se efectuează centrifugarea și supernatantele se amestecă. Soluția hidroetanolică obținută se standardizează la 65%, se determină concentrația extractului prin cântărire și se ajustează la 5 mg/ml, după care se adaugă la mediul de protecție. 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.

10 Biomasa obținută conține 44,02% proteine din BAU, față de 36,47% proteine din BAU, conform celei mai apropiate soluții.

15 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.

Tabel

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

Procedeu utilizat	Mediul protector	Conc. extract, %	Conținutul de proteine	
			% BAU	% M
Conform celei mai apropiate soluții	Lapte degresat	–	36,47	100,00
Conform procedului revendicat	Lapte degresat + extract biologic activ	5	51,23	140,48
		10	44,02	120,70

20

Datele din tabel demonstrează majorarea cu 20,70...40,48% a conținutului de proteine în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în procedeu propus în invenție față de procedeu 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-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 până la titrul de $10^5...10^6$ ml⁻¹ într-un mediu constituit din lapte degresat și 5...10% vol. soluție hidroetanolică de 65%, care conține 5 mg/ml de extract, obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 prin extragerea repetată a biomasei cu etanol de 96% și de 65%, cu centrifugarea și unirea supernatantelor, după care se efectuează congelarea rapidă a suspensiei 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 0110

(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-20**

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, спорулина

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 4474 B1 2017.03.31	1
A	MD 4499 B1 2017.07.31	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 4498 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 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 18.07.2019

Examinator

GUȘAN Ala

