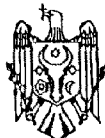




MD 1381 Y 2019.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1381** (13) **Y**
(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

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2018 0112 (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; RUDI Liudmila, 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.

Procedeul, 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⁻¹ într-un mediu constituit din

2
lapte degresat și 5...10% vol. soluție hidroetanolică care conține 5 mg/ml de extract de aminoacizi și oligopeptide, 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 și carbohidrați în biomasa de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 după un an de păstrare în stare liofilizată respectiv cu 9,35...52,86% și 11,16...18,59%.

Revendicări: 1

MD 1381 Y 2019.10.31

(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, comprises 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. water-ethanol solution, comprising 5 mg/ml of amino acid

2
and oligopeptide 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 and carbohydrate content in the *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast biomass after one year of storage in a lyophilized state by 9.35...52.86% and 11.16...18.59% 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 долговременного 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⁻¹ в среде, состоящей из обезжиренного молока и

2
5...10% об. водно-этанольного раствора, содержащего 5 мг/мл экстракта аминокислот и олигопептидов, 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 и углеводов в биомассе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 после одного года хранения в лиофилизированном состоянии соответственно на 9,35...52,86% и 11,16...18,59%.

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 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 și carbohidrați de 35,32% și 23,08% din biomasa absolut uscată (BAU), respectiv [1].

15 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.

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 Procedul 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⁻¹ într-un mediu constituit din lapte degresat și 5...10% vol. soluție hidroetanolică care conține 5 mg/ml de extract de aminoacizi și oligopeptide, obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 prin extragerea repetată a biomasei cu etanol de 75% cu centrifugarea, unirea supernatantelor și prelucrarea cu hexan, după care se efectuează congelarea rapidă a suspensiei la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de +4°C.

25 Extragerea biomasei de spirulină se efectuează repetat timp de 1 oră cu etanol de 75% în raport de 1:1 (m/v), iar prelucrarea supernatantului cu hexan - în raport de 4:1 (v/v). Concentrația extractului de aminoacizi și oligopeptide în soluția hidroetanolică obținută este standardizată la valoarea de 5 mg/ml.

După un an de conservare în stare liofilizată conținutul de proteine atinge valori de 38,62 – 53,99% din BAU iar cel de carbohidrați de 25,65...27,37% din BAU.

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

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 9,35...52,86% și 11,16...18,59%.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

45 În tuburi înclinate cu mediu malt agarizat se cultivă tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21, 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. extract de aminoacizi și oligopeptide 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 malt 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 53,99% proteine și 25,65% carbohidrați din BAU, față de 35,32% proteine și 23,08% carbohidrați, conform celei mai apropiate soluții.

Exemplul 2

55 În tuburi înclinate cu mediu malt agarizat se cultivă tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21, 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. extract de aminoacizi și oligopeptide 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 malț agarizat timp de 3 pasaje consecutive, pentru a reveni la starea fiziologică normală și se determină conținutul de proteine și carbohidrați în biomasă.

- 5 Biomasă obținută conține 38,62% proteine și 27,37% carbohidrați din BAU, față de 35,32% proteine și 23,08% carbohidrați, conform celei mai apropiate soluții.

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

- 10 Tabel
Conținutul de proteine și carbohidrați în biomasă levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-21 după un an de conservare în stare liofilizată

Procedeu utilizat	Mediul protector	Conc. extract, %	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 procedeuului revendicat	Lapte degresat + extract aminoacizi și oligopeptide	5	53,99	152,86	25,65	111,16
		10	38,62	109,35	27,37	118,59

- 15 Datele din tabel demonstrează majorarea cu 9,35...52,86% a conținutului de proteine și cu 11,16...18,59% a conținutului de carbohidrați în biomasă levurii *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⁻¹ într-un mediu constituit din lapte degresat și 5...10% vol. soluție hidroetanolică care conține 5 mg/ml de extract de aminoacizi și oligopeptide, obținut din biomasă cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 prin extragerea repetată a biomasei cu etanol de 75% cu centrifugarea, unirea supernatantelor și prelucrarea cu hexan, 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 0112

(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, 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, 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 19.07.2019

Examinator

GUȘAN Ala

