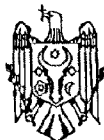




MD 4243 B1 2013.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4243** ⁽¹³⁾ **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/16* (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2012 0095 (22) Data depozit: 2012.10.31	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.07.31, BOPI nr. 7/2013
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: EFREMOVA Nadejda, MD; USATII Agafia, MD; MOLODOI Elena, MD; FULGA Ludmila, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Tulpină de drojdii *Saccharomyces cerevisiae* - sursă de superoxiddismutază

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în
special la o tulpină de drojdii *Saccharomyces*
cerevisiae și poate fi utilizată în industria
microbiologică pentru obținerea enzimelor cu
proprietăți antioxidante, și anume a super-
oxiddismutazei.

2
Tulpina de drojdii este depozitată în
5 Colecția Națională de Microorganisme
Nepatogene a Institutului de Microbiologie și
Biotehnologie al AȘM cu numărul CNMN-Y-
10 11 și poate fi utilizată în calitate de sursă de
superoxiddismutază.

Revendicări: 1

15

MD 4243 B1 2013.07.31

(54) Strain of *Saccharomyces cerevisiae* yeast - source of superoxide dismutase

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology,
particularly to a strain of *Saccharomyces*
cerevisiae yeast and can be used in
microbiological industry for the production of
enzymes with antioxidant properties, in
particular superoxide dismutase.

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-11 and may be used as the source of
superoxide dismutase.

Claims: 1

(54) Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* - источник супероксиддисмутазы

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехно-
логии, в частности к штамму дрожжей
Saccharomyces cerevisiae и может быть
использовано в микробиологической про-
мышленности для получения ферментов с
антиоксидантными свойствами, а именно
супероксиддисмутазы.

2
Штамм дрожжей депонирован в
Национальной Коллекции Непатогенных
Микроорганизмов Института Микробиоло-
гии и Биотехнологии АНМ под номером
CNMN-Y-11 и может быть использован в
качестве источника супероксиддисмутазы.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de drojdii *Saccharomyces cerevisiae* și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor cu proprietăți antioxidante, și anume a superoxidismutazei.

5 Este cunoscută tulpina de drojdii *Hansenula polymorpha* CBS 4732 ce posedă activitate superoxidismutazică de 42,9...63,67 U/mg de proteină [1]. Dezavantajul acestei tulpini constă în nivelul scăzut al activității acestei enzime.

Mai este cunoscută o tulpină de drojdii *Saccharomyces cerevisiae*, la care activitatea superoxidismutazei constituie 86,2 U/mg de proteină [2]. Dezavantajul acestei tulpini

10 constă în activitatea redusă a superoxidismutazei.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unei tulpini noi de *Saccharomyces cerevisiae* care ar asigura o activitate sporită a superoxidismutazei.

Esența invenției constă în faptul că se propune tulpina de drojdii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-11 în calitate de sursă de superoxidismutază.

15 Tulpina *Saccharomyces cerevisiae* este izolată în cultură pură și depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neptogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM ca producător de proteine cu numărul CNMN-Y-11.

Caracterele morfo-culturale ale tulpinii.

20 Celulele sunt ovale sau rotunde care înmuguresc, ocazional formează pseudohife și asce persistente direct din celula diploidă, ascospori neeliberați, rotunzi sau ovali, netezi, modul de reproducere – prin înmugurire. Pe medii solide formează colonii S-formă, de culoare albă, consistență păstoasă. Tipul respirației – aerob, nu formează peliculă.

Caractere fiziologo-biochimice ale tulpinii.

25 Tulpina crește bine pe medii lichide ce conțin must de malț sau melasă cu adaos de săruri nutritive. Se dezvoltă pe medii ce conțin hexoze, precum D-glucoză, D-manoză, D-fructoză. Dintre dizaharide asimilează zaharoza, D-maltoza. Fermentația +; nitrat -; ureaza -; testul – Diazonium Blue B (DBB) -.

Temperatura optimă de dezvoltare este de 28...30°C, pH-ul optim – 4,5...5,0.

30 Pentru asigurarea activității sporite a superoxidismutazei, tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-11 se cultivă pe următoarele medii de cultură.

1) Mediul Rieder care conține, în g/L: glucoză – 30,0; (NH₄)₂SO₄ – 3,0; MgSO₄ · 7H₂O – 0,7; KH₂PO₄ – 1,0; NaCl – 0,5; Ca(NO₃)₂ – 0,4; autolizat de drojdie – 10 ml; apă potabilă – 1 L.

35 La cultivare în profunzime pe mediul Rieder timp de 72 ore, activitatea superoxidismutazei la tulpina dată constituie 185 U/mg de proteină, ceea ce este cu 115% mai mult față de soluția cea mai apropiată.

2) Mediul YPD care conține, g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie – 10; apă potabilă – 1 L.

40 La cultivare în profunzime pe mediul YPD timp de 72 ore, activitatea superoxidismutazei la tulpina dată constituie 220 U/mg de proteină, ceea ce este cu 155% mai mult față de cea mai apropiată soluție.

Rezultatul tehnic obținut în comparație cu cea mai apropiată soluție constă în asigurarea unei majorări a activității superoxidismutazei până la 185...220 U/mg de proteină.

45 Rezultatul obținut se datorează particularităților fiziologo-biochimice ale tulpinii, în special proceselor anabolice și catabolice.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

50 Materialul semincer se obține prin cultivarea tulpinii de drojdii pe must de bere de 7%, în condiții aseptice, timp de 24 ore, la agitator (200...250 rpm), la temperatura de 20...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; (NH₄)₂SO₄ – 3,0; MgSO₄ · 7H₂O – 0,7; KH₂PO₄ – 1,0; NaCl – 0,5; Ca(NO₃)₂ – 0,4; autolizat de drojdie – 10; apă potabilă – 1L, pH 5,5. Durata de cultivare – 72 ore la temperatura de 25...28°C.

55 Activitatea superoxidismutazei la cultivarea tulpinii de drojdii în condițiile indicate constituie 185 U/mg de proteină.

Exemplul 2

Materialul semincer se obține prin cultivarea tulpinii de drojdii pe must de bere de 7%, în condiții aseptice, timp de 24 ore, la agitator (200...250 rpm), la temperatura de 20...25°C. Inoculul obținut se utilizează pentru mediile de fermentație în volum de 5%.

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 drojdii – 10, peptonă – 20, glucoză – 20, apă potabilă – 1L, pH 5,5. Durata de cultivare – 72 ore la temperatura de 25...28°C.

Activitatea superoxidismutazei la cultivarea tulpinii de drojdii în condițiile indicate constituie 220 U/mg de proteină.

10

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Hristozova T., Rasheva T., Nedeva T. and Kujumdzieva A. Superoxide dismutase during glucose repression of *Hansenula polymorpha* CBS 4732. Biosciences, 2002, 57, p. 313-318
2. Lushchak V., Gospodaryov D. Catalases protect proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. Cell Biology International, 2005, 29, p. 187-192

(57) Revendicări:

Tulpină de drojdii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-11 în calitate de sursă de superoxidismutază.

Șef Secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii
(21) Nr. depozit: a 2012 0095 (22) Data depozit: 2012.10.31 (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 superoxiddismutază
II. Clasificarea obiectului invenției: (51) Int.Cl: <i>C12N 1/16</i> (2006.01) <i>C12R 1/865</i> (2006.01) <i>C12N 9/02</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): “ tulpini de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> activitate superoxiddismutazică ”, “tulpini de drojdii activitate superoxiddismutazică” Int. Cl: <i>C12N 1/16</i> , <i>C12R 1/865</i>, <i>C12N 9/02</i> "Worldwide" (Espacenet): “<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains superoxidedismutase activity”, “yeast strains superoxidedismutase activity” Int. Cl: <i>C12N 1/16</i> , <i>C12R 1/865</i>, <i>C12N 9/02</i> EA, CIS (Eapatis): “<i>Saccharomyces cerevisiae</i> супероксиддисмутазная активность ”, “штаммы дрожжей супероксиддисмутазная активность ” Int. Cl: <i>C12N 1/16</i> , <i>C12R 1/865</i>, <i>C12N 9/02</i> SU (nonpublic): “<i>Saccharomyces cerevisiae</i> супероксиддисмутазная активность ”, “штаммы дрожжей супероксиддисмутазная активность ” Int. Cl: <i>C12N 1/16</i> , <i>C12R 1/865</i>, <i>C12N 9/02</i> RO-Patent : “ tulpini de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> activitate superoxiddismutazică ”, “tulpini de drojdii activitate superoxiddismutazică ” Int. Cl: <i>C12N 1/16</i> , <i>C12R 1/865</i>, <i>C12N 9/02</i>
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate http://www.jbc.org/content/271/21/12275.long http://www.diagnosisp.com/dp/journals/view_pdf.php?journal_id=1&archive=1&issue_id=25&article_id=888 http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTerm.pl?goid=4784 Ventsislava Yankova Petrova.Catalase enzyme in mitochondria of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EJB

V.Y. Petrova, Z.G. Uzunov and A.V. Kujumdzieva. Peroxisomal localization of mn sod enzyme in *saccharomyces cerevisiae* yeasts: in silico analysis. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 2009, 23(4), 1531-1536

Longo VD, Gralla EB, Valentine JS. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem.* 1996 May 24;271(21):12275-80.

O Bermingham-McDonogh, E B Gralla, and J S Valentine. The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 July; 85(13): 4789–4793.

Lena Hansson, Margareta H. Haggstrom. Effects of growth conditions on superoxide dismutase and catalase activities in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Current Microbiology* 1983, Volume 9, Issue 1, pp 19-23

Jamieson, D.J. The effects of oxidative stress on *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report*, January 1995, vol. 1, no. 1, p. 89-95.

Trayana S Nedeva, Ventzislava Y Petrova, Daniela R Zamfirova, Elena V Stephanova, Anna V Kujumdzieva. Cu/Zn superoxide dismutase in yeast mitochondria – a general phenomenon *FEMS Microbiology Letters.* Volume 230, Issue 1, 2004, p. 19 – 25

Fang-Jen Lee, Hosni M. Hassan Biosynthesis of superoxide dismutase and catalase in *Saccharomyces cerevisiae*: effects of oxygen and cytochrome c deficiency, *Journal of Industrial Microbiology*, 1986, Volume 1, Issue 3, p. 187-193

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	RU 02200196 C2 2003.09.10	1
A	EP 1693447 A1 2006.08.23	1
A	RU 02186848 C1 2002.08.10	1
A	CN 101633916 A 2010.01.27	1
A	RU 92009230 A 1996.04.20	1
A	RU 2200196 C2 2002.11.10	1
A	RU 93028609 A 1998.01.10	1
A	RU 2113477 C1 1998.06.20	1
A	RU 2000129024 A 2002.11.10	1
A	RU 2044771 C1 1995.09.27	1
A, D	Hristozova T., Rasheva T., Nedeva T. and Kujumdzieva A. Superoxide dismutase during glucose repression of <i>Hansenula polymorpha</i> CBS 4732. <i>Biosciences.</i> , 2002, 57, p. 313-318	1

A, D, C	Lushchak V., Gospodaryov D. Catalases protect proteins from oxidative modification in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Cell Biology International, 2005, 29, p. 187-192	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		18.03.2013
Examinator		LUPĂȘCU Lucian