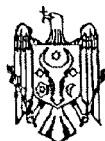




MD 4329 B1 2015.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4329** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12P 19/04* (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2013 0081 (22) Data depozit: 2013.10.30	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.02.28, BOPI nr. 2/2015
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: USATÎI Agafia, MD; CHISELIȚA Natalia, MD; EFREMOVA Nadejda, MD; MOLODOI Elena, MD; FULGA Ludmila, MD; BORISOVA Tamara, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

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

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologii microbiene, în special la un procedeu de cultivare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, și poate fi utilizată în industria microbiologică, alimentară și farmaceutică.

Procedeul, conform invenției, constă în aceea că se cultivă levurile pe must de bere timp de 24 ore, la temperatura de 25°C, apoi se

2
iradiază cu unde milimetrice cu frecvența de 53,3 GHz, emise în regim continuu timp de 20 min, după care cultura de levuri, cu concentrația de 2×10^6 celule/ml, se transferă pe mediul nutritiv steril YPD sau Rieder în cantitate de 5%vol. și se cultivă în profunzime în condiții de agitare continuă de 200 r.p.m., la temperatura de 25°C, timp de 120 ore.

Revendicări: 1

MD 4329 B1 2015.02.28

(54) Process for cultivation of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20

(57) Abstract:

1
The invention relates to microbiological biotechnology, in particular to a process for cultivation of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, and may be used in microbiological, food and pharmaceutical industries.

The process, according to the invention, consists in that the yeast are cultivated on beer wort for 24 hours, at a temperature of 25°C, then are irradiated with millimetric waves with

2
the frequency of 53.3 GHz, emitted continuously for 20 minutes, after which the yeast culture, with the concentration of 2×10^6 cells/ml, is transferred to a YPD or Rieder sterile nutrient medium in an amount of 5 vol.% and is cultivated submerged under continuous stirring conditions of 200 rpm, at a temperature of 25°C, for 120 hours.

Claims: 1

(54) Способ культивирования штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к микробиологическим биотехнологиям, в частности к способу культивирования штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, и может быть использовано в микробиологической, пищевой и фармацевтической промышленности.

Способ, согласно изобретению, состоит в том что культивируют дрожжи на пивном сусле в течение 24-х часов, при температуре 25°C, затем облучают миллиметровыми

2
волнами частотой 53,3 ГГц, испускаемыми непрерывно в течение 20 мин, после чего культуру дрожжей, с концентрацией 2×10^6 клеток/мл, переносят на стерильную питательную среду YPD или Ридер в количестве 5% объёма и культивируют глубинно в условиях непрерывного перемешивания 200 об/мин, при температуре 25°C, в течение 120 часов.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologii microbiene, în special la un procedeu de cultivare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, și poate fi utilizată în industria microbiologică, alimentară și farmaceutică.

Este cunoscut un procedeu de cultivare submersă a tulpinilor de levuri pe medii care conțin precursori ai biosintezei β -glucanilor (monozaharide, extracte din șroturi etc.) [1]. Dezavantajul procedurii constă în conținutul mic de β -glucani acumulat în biomasa celulară.

Soluția cea mai apropiată este procedeul de cultivare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 ce include etapele: prepararea materialului semincer pe must de bere, durata de cultivare de 3 zile la temperatura de 20° C, inocularea germenilor în mediul de fermentare steril YPD sau Rieder. Durata cultivării în profunzime, pe agitator (200 r.p.m.), la temperatura de 20°C sau 25°C este de 120 ore [2].

Cultivarea în mediile de fermentare și condițiile indicate asigură acumularea a 15,38...22,5% β -glucani în biomasa uscată a levurii.

Dezavantajul acestui prototip constă în aceea că nu se realizează pe deplin potențialul biosintetic al tulpinii și conținutul de β -glucani nu atinge valoarea maximă.

Problema pe care o rezolvă invenția este de a elabora un procedeu de cultivare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, care să asigure sporirea capacității de biosinteză a β -glucanilor.

Esența invenției constă în aceea că se cultivă levurile pe must de bere timp de 24 ore, la temperatura de 25°C, apoi se iradiază cu unde milimetrice cu frecvența de 53,3 GHz, emise în regim continuu timp de 20 min, după care cultura de levuri, cu concentrația de 2×10^6 celule/ml, se transferă pe mediul de fermentare steril YPD sau Rieder în cantitate de 5% vol. și se cultivă în profunzime în condiții de agitare continuă (200 r.p.m.), la temperatura de 25°C, timp de 120 ore.

Efectul de activare a biosintezei β -glucanilor la acțiunea undelor milimetrice cu frecvența menționată se asociază cu modificările oscilațiilor de frecvență ale biomembranei celulare a levurii.

Conținutul de β -glucani în biomasa levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, la cultivarea submersă în condiții proximale și conform procedurii elaborat este prezentat în tabel.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea conținutului de β -glucani cu 17,5...25,7% față de cea mai apropiată soluție.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul I

Cultura de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, crescută submers pe must de bere timp de 24 ore, la temperatura de 25°C este supusă acțiunii undelor milimetrice cu frecvența de 53,3 GHz, emise în regim continuu, timp de 10 min. După iradiere, materialul semincer (2×10^6 celule ml⁻¹), în concentrație de 5% vol., se transferă în mediul de fermentare steril YPD cu următoarea compoziție, g L⁻¹: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie – 10 ml; apă potabilă – 1000 ml. Cultivarea se efectuează în condiții de agitare continuă (200 r.p.m.), în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 1,0 L, la temperatura de 25°C, durata cultivării – 120 ore.

Conținutul de β -glucani constituie $19,36 \pm 0,53\%$ în biomasa uscată, ceea ce depășește cu 25,8% conținutul fixat la cultivarea tulpinii în condiții proximale.

Exemplul II

Cultura de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, crescută submers pe must de bere timp de 24 ore, la temperatura de 25° C este supusă acțiunii undelor milimetrice cu frecvența de 53,3 GHz, emise în regim continuu, timp de 20 min. După iradiere, materialul semincer (2×10^6 celule ml⁻¹), în concentrație de 5% vol., se transferă pe mediul de fermentare steril YPD cu următoarea compoziție, g L⁻¹: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie – 10 ml; apă potabilă – 1000 ml. Cultivarea se efectuează în condiții de agitare continuă (200 r.p.m.), în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 1,0 L, la temperatura de 25°C, durata cultivării – 120 ore.

Conținutul de β -glucani constituie $19,34 \pm 0,82\%$ în biomasa uscată, ceea ce depășește cu $25,7\%$ conținutul fixat la cultivarea tulpinii în condiții proxime.

Exemplul III

- 5 Cultura de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, crescută submers pe must de bere timp de 24 ore, la temperatura de 25°C este supusă acțiunii undelor milimetrice cu frecvența de $53,3 \text{ GHz}$, emise în regim continuu, timp de 20 min. După iradiere, materialul semincer (2×10^6 celule ml^{-1}), în concentrație de $5\% \text{ vol.}$, se transferă în mediul nutritiv steril Rieder cu următoarea compoziție, g L^{-1} : glucoză – $30,0$;
- 10 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – $3,0$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,7$; KH_2PO_4 – $1,0$; NaCl – $0,5$; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – $0,4$; autolizat de drojdie – 10 ml ; apă potabilă – 1000 ml . Cultivarea se efectuează în condiții de agitare continuă (200 r.p.m.), în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de $1,0 \text{ L}$, la temperatura de 25°C , durata cultivării – 120 ore .

Conținutul de β -glucani constituie $26,43 \pm 0,73\%$ în biomasa uscată, ceea ce depășește cu $17,5\%$ conținutul fixat la cultivarea tulpinii în condiții proxime.

15 Exemplul IV

- 20 Cultura de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, crescută submers pe must de bere timp de 24 ore, la temperatura de 25°C este supusă acțiunii undelor milimetrice cu frecvența de $53,3 \text{ GHz}$, emise în regim continuu, timp de 30 min. După iradiere, materialul semincer (2×10^6 celule ml^{-1}), în concentrație de $5\% \text{ vol.}$, se transferă în mediul nutritiv steril Rieder cu următoarea compoziție, g L^{-1} : glucoză – $30,0$;
- 25 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – $3,0$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,7$; KH_2PO_4 – $1,0$; NaCl – $0,5$; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – $0,4$; autolizat de drojdie – 10 ml ; apă potabilă – 1000 ml . Cultivarea se efectuează în condiții de agitare continuă (200 r.p.m.), în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de $1,0 \text{ L}$, la temperatura de 25°C , durata cultivării – 120 ore .

Conținutul de β -glucani constituie $23,99 \pm 0,91\%$ în biomasa uscată, ceea ce depășește cu $6,6\%$ conținutul fixat la cultivarea tulpinii în condiții proxime.

Tabel

Influența undelor milimetrice de intensitate extraînaltă asupra biosintezei β -glucanilor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20

Variante	Durata iradierii, min	Mediul de cultură YPD			Mediul de cultură Rieder		
		Conținutul de β -glucani, % in B.U. $X \pm xS$	% față de cea mai apropiată soluție	Spor, %	Conținutul de β -glucani, % in B.U. $X \pm xS$	% față de cea mai apropiată soluție	Spor, %
53,3 GHz*	10	$19,36 \pm 0,53$	125,8	25,8	$21,76 \pm 0,43$	-	-
Soluția cea mai apropiată**		$15,38 \pm 0,14$	100	-	$22,50 \pm 1,41$	100	-
53,3 GHz*	20	$19,34 \pm 0,82$	125,7	25,7	$26,43 \pm 0,73$	117,5	17,5
Soluția cea mai apropiată**		$15,38 \pm 0,14$	100		$22,50 \pm 1,41$	100	-
53,3 GHz*	30	$19,11 \pm 3,25$	124,2	24,2	$23,99 \pm 0,91$	106,6	6,6
Soluția cea mai apropiată**		$15,38 \pm 0,14$	100		$22,50 \pm 1,41$	100	-

30 * Cultura de levuri iradiată cu unde milimetrice de intensitate extraînaltă

** Cultura de levuri neiradiată cu unde milimetrice de intensitate extraînaltă

$X \pm xS$ indică valoarea medie și deviația standard

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Desai Kiran M. Bhalchandra K. Vaidya, Rekha S. Singhal, Sunil S. Bhagwat. Use of an artificial neural network in modeling yeast biomass and yield of b-glucan. Process Biochemistry, 2005, 40, p. 1617-1626
2. MD 4048 B1 2010.06.30

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, care constă în aceea că se cultivă levurile pe must de bere timp de 24 ore, la temperatura de 25°C, apoi se iradiază cu unde milimetrice cu frecvența de 53,3 GHz, emise în regim continuu timp de 20 min, după care cultura de levuri, cu concentrația de 2×10^6 celule/ml, se transferă pe mediul nutritiv steril YPD sau Rieder în cantitate de 5%vol. și se cultivă în profunzime în condiții de agitare continuă de 200 r.p.m., la temperatura de 25°C, timp de 120 ore.

Șef Secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2013 0081

(22) Data depozit: 2013.10.30

(71) Solicitant: **INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**

(54) **Titlul:** Procedeu de cultivare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C12P 19/04* (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

C12N 1/16 (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): “glucani drojdii”, “drojdii unde milimetrice”, “stimularea glucanilor drojdiilor”
Int.Cl : *C12P 19/04* (2006.01), *C12N 13/00* (2006.01), *C12N 1/16* (2006.01)

"Worldwide" (Espacenet): “yeast glucans”, “stimulation yeast glucans”, “waves for glucan synthesis”, “yeast glucans extraction process”

Int.Cl : *C12P 19/04* (2006.01), *C12N 13/00* (2006.01), *C12N 1/16* (2006.01)

EA, CIS (Eapatis): “глюканы дрожжи”, “активация глюканов дрожжей”, “волны стимуляция глюканов”

Int.Cl : *C12P 19/04* (2006.01), *C12N 13/00* (2006.01), *C12N 1/16* (2006.01)

SU (nonpublic): “глюканы дрожжи”, “активация глюканов дрожжей”, “волны стимуляция глюканов”

Int.Cl : *C12P 19/04* (2006.01), *C12N 13/00* (2006.01), *C12N 1/16* (2006.01)

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

А.Л. Бычков, К.Г. Королёв, Е.И. Рябчикова. Изменения клеточной стенки при механической активации растительной и дрожжевой биомассы, Химия растительного сырья, 2010, №1. С. 49–56.

Usatii Agafia, Molodoi Elena, Chiselița Natalia, Chiselița Oleg, Efremova Nadejda, Borisova Tamara, Fulga Ludmila. Yeasts strains – valuable sources of β -glucanes and mannans. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, 2011, No 3 (315), p. 128-134.

Бодрова О.Ю. Интенсификация процессов дрожжегенерирования и брожения в технологии спирта с использованием ультразвуковой обработки засевных дрожжей. Автореф. дисс. на

<http://www.bit-alex.ru/bio/>

<http://chem21.info/info/217112/>

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 3256 G2 2007.02.28	1
A	MD 3301 G2 2007.04.30	1
A	MD 3516 G2 2008.02.29	1
A	MD 3945 C2 2009.07.31	1
A	RU 2208049 C1 2003.07.10	1
A	RU 248794 C2 2013.07.20	1
A	RU 2011140588 A 2013.04.27	1
A	RU 22207 C1 2004.01.10	1
A	JP 2007228974 A 2007.09.13	1
A	CN 102257011 A 2011.11.23	1
A	US 2010190872 A1 2010.07.29	1
A	US 4810646 A 1989.03.07	1
A	US 5037972 A 1991.08.06	1
A	US5028703 A 1991.07.02	1
A	RU 2216595 C1 2003.11.20	1
A	CN 101012468 A 2007.08.08	1
A	CN 101205552 A 2008.06.25	1
A	US 20110250235 A1 2011.10.13	1
A	EP 2370475 A4 2011.10.05	1
A	MX 2007013725 A 2008.07.04	1
A	CN 101184780 B 2008.05.21	1
A	EP 1877447 A1 2008.01.16	1
A	WO 2006121803 A 2006.05.05	1
A	CA 2607004 A1 2006.11.16	1
A	US 5250436 A 1993.10.05	1
A	US 5082936 A 1992.01.21	1
A, D	Desai Kiran M. Bhalchandra K. Vaidya, Rekha S. Singhal, Sunil S. Bhagwat. Use of an artificial neural network in modeling yeast biomass and yield of b-glucan. Process Biochemistry, 2005, 40, p. 1617-1626.	1
A, D, C	MD 4048 B1 2010.06.30	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	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată

singur	
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	23.12.2014
Examinator	LUPAȘCU Lucian