



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.

Procedeu, 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:

5 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.

10 Soluția cea mai apropiată este procedeu 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].

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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

40 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.

45 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

50 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 proximale.

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 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 în mediul nutritiv steril Rieder cu următoarea compoziție, g L^{-1} : glucoză – 30,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 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;
- 10 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 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 proximale.

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 GHz, emise în regim continuu, timp de 30 min. După iradiere, materialul semincer (2×10^6 celule ml^{-1}), în concentrație de 5% vol., se transferă în mediul nutritiv steril Rieder cu următoarea compoziție, g L^{-1} : glucoză – 30,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 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 L, la temperatura de 25°C , durata cultivării – 120 ore.

- 25 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 proximale.

Tabel

Influența undelor milimetrice de intensitate extrăînaltă 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, % în B.U. $X \pm xS$	% față de cea mai apropiată soluție	Spor, %	Conținutul de β -glucani, % în 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 extrăînaltă

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

$X \pm xS$ 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