SACCHAROMYCES CEREVISIAE ALTO EN PROTEÍNAS Y SU APLICACIÓN

Campo de la Invención

La presente invención pertenece al campo técnico de los microorganismos y, más particularmente, se refiere a *Saccharomyces cerevisiae* rica en proteínas y una aplicación de la misma.

Antecedentes de la Invención

Saccharomyces cerevisiae es un organismo unicelular, seguro y no patógeno, con las ventajas de un ciclo de crecimiento corto, un metabolismo vigoroso, una fuerte capacidad de fermentación y ricos nutrientes como una variedad de proteínas, aminoácidos, vitaminas y sustancias activas para la vida. , funciona como un microorganismo industrial muy importante en los campos biotecnológicos tradicionales y modernos, y se aplica ampliamente en la producción de medicamentos, química fina, bioenergía, preparaciones enzimáticas industriales, aditivos para piensos, alimentos fermentados, etc.

Existen ciertas diferencias en los nutrientes contenidos en las diferentes levaduras. Las cepas de levadura pueden producir ricos recursos proteicos después de la hidrólisis, que pueden usarse como proteínas alimentarias eficaces para ganado y aves de corral, productos acuáticos, animales rumiantes y otros animales criados, a fin de promover una cría saludable de ganado y aves de corral y mejorar la productividad del ganado. y aves de corral, mejorar la fecundidad del ganado y las aves de corral, estabilizar la calidad de los piensos, mejorar la vitalidad y la calidad de los productos ganaderos y avícolas, etc.; o pueden usarse como agentes umami nutricionales multifuncionales y potenciadores del sabor para dotar a los productos de diferentes propiedades sensoriales; o también puede usarse como la mejor fuente de proteínas de alta calidad para el cuerpo humano para mejorar la inmunidad humana, reducir la fatiga y proporcionar suplementos nutricionales equilibrados para el cuerpo. Por lo tanto, las cepas de levadura ricas en proteínas son un factor clave para obtener fuentes proteicas de alta calidad, que pueden sentar las bases para la producción industrial de extractos de levadura, y también satisfacer las rígidas demandas de un desarrollo integral, equilibrado y sostenible en la alimentación, la alimentación y la salud. industrias del cuidado.

El documento de técnica anterior CN106399135 proporciona proteína de alto rendimiento de *Saccharomyces cerevisiae* C20140911, así como sus métodos de reproducción y cultivo y una aplicación de los mismos, que se utiliza para preparar mejores preparaciones microecológicas y

aditivos alimentarios, con el fin de mejorar su efecto de uso clínico y servir al alimento. seguridad y producción ganadera.

Otro documento de técnica anterior CN106399135 proporciona una cepa de levadura proteica de alto rendimiento, que se cultiva mediante el uso de una tecnología de evolución adaptativa. El método de implementación específico incluye: realizar un cultivo de pase utilizando un medio de extracto de malta, realizar una domesticación de la tolerancia al crecimiento en la cepa de levadura a partir de peptona que tiene una dosis baja del 1%, aumentar una dosis de peptona gradualmente hasta un 8% y seleccionar el cultivo de alto rendimiento. cepa de levadura proteica después de múltiples pruebas de selección y aprobación; realizar análisis bioinformáticos, de especies y de contenido de proteínas en el caldo de fermentación de esta cepa de levadura, incluido el análisis GO, el análisis de la vía metabólica KEGG, el análisis de proteínas comunes, el análisis de agrupamiento de la anotación funcional WEGO de histonas comunes, etc.; seleccionar factores individuales tales como pH inicial, temperatura del cultivo y volumen de carga de líquido para el análisis de la superficie de respuesta, y determinar las condiciones óptimas de cultivo mediante índices de número de colonias y una ecuación de simulación de análisis de varianza; y luego, realizar un análisis de la microflora intestinal de los lechones para detectar los cambios en la cantidad de microorganismos en el íleon, el ciego y el colon, incluidos *Escherichia coli,* Salmonella, bacterias aeróbicas, bifidobacterias, lactobacilos y bacterias anaeróbicas, y realizar un análisis del rendimiento de la producción de acuerdo con las normas diarias. ganancia, ingesta diaria de alimento, peso corporal y otros índices de los lechones.

Sumario de la Invención

Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de la técnica anterior no puede lograr un alto rendimiento de biomasa, alto contenido de proteínas y alto rendimiento de ARN al mismo tiempo. Debido a los problemas existentes en la técnica anterior, la presente invención proporciona una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con alta biomasa, alto contenido de proteínas y alto contenido de ARN. Generalmente, la levadura tiene un contenido de proteína intracelular superior al 40%. En la actualidad, el contenido de proteínas de las cepas de levadura en la literatura o las patentes reportadas es de hasta el 62,4%. En la presente invención se obtiene mediante cribado natural una cepa de levadura con un contenido de proteína del 68,13%, que es superior al nivel de investigación de la literatura o las patentes existentes.

En el primer aspecto, la presente invención proporciona una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* rica en proteínas, que es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743 (Saccharcmyces cerevisiae AMCC 30743), estando conservada la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743 (*Saccharcmyces cerevisiae* AMCC 30743) en el Centro de China. para la

Colección de Cultivos Tipo (CCTCC) el 27 de julio de 2021, y que tiene un número de conservación de CCTCC NO: M 2021941.

Preferentemente, en la SEQ ID NO.1 se muestra una secuencia del gen 26S rDNA de la cepa Saccharomyces cerevisiae AMCC 30743.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación de fermentación para la cepa *Saccharomyces cerevisiae*, en donde el método incluye el siguiente paso: cultivar la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743.

Preferentemente, el método de preparación incluye además los siguientes pasos:

(1) realizar un cultivo amplificado en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743; y

(2) añadir el producto obtenido en la etapa (1) a un medio líquido y realizar cultivo fermentado a 26-32°C.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un agente microbiano, obteniéndose el agente microbiano de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una aplicación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743 en un extracto de levadura.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un extracto de levadura, preparándose el extracto de levadura a partir de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743 o el agente microbiano.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un agente microbiano, obteniéndose el agente microbiano mediante fermentación según el método de preparación antes mencionado.

Preferentemente, el agente microbiano obtenido cultivando en un matraz agitado durante 15-20 h tiene una biomasa de 48-52 g/l; o

preferentemente, el agente microbiano tiene un contenido de proteína intracelular superior al 65% en peso del peso seco de células de levadura; o

preferentemente, el agente microbiano tiene un contenido de ARN superior al 15% en peso del peso seco de las células de levadura; o

preferentemente, el agente microbiano tiene un contenido de ácido glutámico intracelular superior al 9%; o

preferentemente, el contenido de ácido succínico intracelular del agente microbiano es un contenido de ácido succínico medido en un sobrenadante que se obtuvo después de agregar

agua desionizada de acuerdo con una relación de volumen de masa de la leche de levadura al agua desionizada de 1:10 y de romper las células, y el contenido de ácido succínico en un sobrenadante es superior a 460 μg/ml.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona una aplicación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743 o el agente microbiano o el extracto de levadura en piensos, alimentos y productos para el cuidado de la salud.

La presente invención proporciona además una aplicación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743 o el agente microbiano o el extracto de levadura en condimentos.

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* proporcionada por la presente invención tiene las características de alta biomasa, alto contenido de proteínas y alto contenido de ARN, y puede aplicarse a piensos, alimentos, atención sanitaria y otras industrias para lograr el desarrollo sostenible de la industrialización del hidrolizado con alto contenido de proteínas.

Información sobre conservación de cepas.

La cepa Saccharomyces cerevisiae AMCC 30743 (Saccharomyces cerevisiae AMCC 30743) proporcionada por la presente invención se conserva en el Centro de China para la Colección de Cultivos Tipo (CCTCC) el 27 de julio de 2021, y tiene un número de conservación de CCTCC NO: M 2021941 (una conservación dirección: Universidad de Wuhan, Wuhan, China, código postal: 430072, teléfono: 027-68754052).

Breve Descripción de las Figuras

La FIGURA 1, muestra los resultados de la determinación de biomasas de cepas de levadura en el Ejemplo 3;

La FIGURA 2, muestra los resultados de la determinación del contenido de proteínas de las cepas de levadura en el Ejemplo 3;

La FIGURA 3, muestra los resultados de la determinación del contenido de ARN de las cepas de levadura en el Ejemplo 3;

La FIGURA 4, muestra los resultados de la determinación del contenido de componentes de aminoácidos de cepas de levadura en el Ejemplo 4; y

La FIGURA 5, muestra los resultados de la determinación del contenido de ácido succínico en el Ejemplo 5.

Descripción Detallada de la Invención

Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* proporcionada por la presente invención tiene las características de alta biomasa, alto contenido de proteínas y alto contenido de ARN. La presente invención proporciona una cepa de Saccharomyces cerevisiae. En primer lugar, se obtuvieron seis cepas de levadura, cada una con una tasa de crecimiento específica mayor o igual a 0.3 h^{-1}, mediante aislamiento, purificación e identificación a partir de muestras de yogur fermentado en el área de Ali de Xizang; y luego, la leche de levadura se recogió mediante fermentación en matraz agitado y se evaluaron sus índices fisiológicos y bioquímicos (incluyendo biomasa, proteína y ARN). La presente invención toma *Saccharomyces cerevisiae* FX-2 como cepa de control, y los criterios de selección fueron que una biomasa alcanzara el 110-120% de la biomasa de la cepa de control, un contenido de proteína alcanzara el 100-110% del contenido de proteína de la cepa de control, y el contenido de ARN alcanzó el 110-120% del contenido de ARN de la cepa de control. Finalmente, se realizaron análisis del contenido de ácido glutámico y del contenido de ácido succínico en una cepa preferida, y un criterio de selección para el análisis del contenido de ácido glutámico fue que el contenido de ácido glutámico alcanzara al menos el 125-130 % del contenido de ácido glutámico de la cepa de control. y un criterio de selección para el análisis del contenido de ácido succínico fue que el contenido de ácido succínico alcanzara el 110-120 % del contenido de ácido succínico de la cepa de control.

El control *Saccharomyces cerevisiae* FX-2 utilizado en la presente invención se conservó en el Centro Chino para la Colección de Cultivos Tipo (CCTCC) (una dirección de conservación: Universidad de Wuhan, Wuhan, China) el 1 de agosto de 2016, tenía un número de conservación de CCTCC NO: M 2016418, y había sido inscrito en CN108220175A.

Las cepas de levadura ricas en proteínas son un factor clave para obtener fuentes de proteínas de alta calidad, que pueden sentar las bases para la producción industrial de extractos de levadura, y también satisfacer las rígidas demandas de un desarrollo integral, equilibrado y sostenible en los piensos, los alimentos y el cuidado de la salud. industrias.

Los componentes de un medio involucrados en los siguientes ejemplos fueron los siguientes:

Medio YPD: 10 g de extracto de levadura en polvo, 20 g de glucosa, 20 g de peptona, 20 g de agar y 1000 ml de agua, todos los cuales se esterilizaron a 115°C durante 20 min.

La leche de levadura en la presente invención se refiere a células de levadura que se obtuvieron mediante eliminación centrífuga de un sobrenadante del caldo de fermentación obtenido mediante fermentación y luego lavado, filtración por succión, filtración por presión, así como separación y recolección.

La Tabla 1 y la Tabla 2 a continuación muestran información fuente de reactivos e instrumentos usados en los ejemplos de la presente invención.

Tabla 1 Tabla de información de reactivos

Reactivos	Fabricante
Extracto de levadura en polvo	Angel yeast
Glucosa	SCR
peptona	Angel yeast
Agar	Guixing Chemical
Ácido sulfúrico concentrado	Xilong Chemical
Ácido bórico	Macklin
rojo de metilo	Macklin
verde bromocresol	Macklin
Hidróxido de sodio	SCR
Ácido perclórico	Xiongda Chemical
ácido sulfosalicílico	JINKO Chemical
Citrato de sodio	Huahang Chemical
2×Mezcla PCR	TIANGEN BIOTECH

Tabla 2 Tabla de información del instrumento

Instrumento	Modelo	Fabricante
Balanza analítica	ME4002E	METTLER TOLEDO
Medidor de pH	PB-10	Sartorius
Medidor de humedad rápido	MJ33	METTLER TOLEDO
Banco superlimpio	SKJH-1109	Shanghai Sukun
Agitador de temperatura constante	ZWYR-2102C	Shanghai Zhicheng
Incubadora bioquímica	SPX-158L	Ningbo Xinzhi
Baño María con termostato	HH-2	Jiangsu Guohua
Instrumento de PCR	C1000	BIO-RAD
Sistema de imágenes en gel	GelDoc™XR＋	BIO-RAD
Centrífuga	DL-5200B-II	Flying Pigeon (Shanghai)
Aparato de electroforesis	EPS-300	Shanghai Tanon

Espectrofotómetro ultravioleta y visible	UV2310II	Hangzhou Allsheng
Microscopio optico	CX43	OLYMPUS
Analizador de curva de crecimiento completamente automático	BioscreenC	OY Growth Curves
Analizador de aminoácidos	HT1010	Qingdao HiTech Innovative
Cromatógrafo líquido	1260II	Aigilent
Caja seca soplado electrotérmica	DHG-9070A	Shanghai Jinghong

Ejemplo 1: Aislamiento, purificación e identificación de cepas de levadura.

Cada muestra de producto lácteo fermentado recolectada en Shannan, Xizang se disolvió en agua esterilizada y se mezcló bien; se pipeteó una suspensión microbiana y se diluyó en series de 10 veces para preparar una suspensión microbiana de 10-5 y una suspensión microbiana de 10-6, que luego se recubrieron con un medio YPD y se cultivaron a 30°C durante 24-48 h; se observó al microscopio la morfología de la levadura en un portaobjetos preparado y al mismo tiempo se observaron las características de las colonias individuales en una placa plana; y se aisló una cepa con características típicas de colonia de levadura, se sembró y se purificó dos veces, se inoculó en un medio inclinado YPD y se almacenó a 4°C. Se obtuvieron un total de treinta cepas de levadura.

Las colonias de cepas de levadura resultantes tenían apariencia de queso, de color blanco lechoso, con superficies arrugadas, onduladas en los bordes, ovaladas en micromorfología y en ciernes y reproductivas.

Ejemplo 2: Selección preliminar de la curva de crecimiento

Las treinta cepas de levadura obtenidas después del aislamiento y la purificación en el Ejemplo 1 se inocularon en un tubo de ensayo que contenía 5 ml de medio líquido YPD a 30°C y 180 rpm durante 20 h, luego se inocularon en una placa de cultivo de 100 pocillos que contenía 300 µL de YPD. medio líquido según una cantidad de inoculación del 3%, y preparado para determinación en máquina en un instrumento Bioscreen; y se establecieron parámetros: una temperatura de 30°C, un tiempo de 24 h y una longitud de onda de 600 nm; los datos se midieron una vez cada 30 min; se analizó una tasa de crecimiento específica; y la fórmula específica fue la siguiente:

$$\text{Tasa de crecimiento específica} = \frac{\text{LNOD2} - \text{LNOD1}}{\text{t2} - \text{t1}}$$

OD1: un valor de OD_{600} correspondiente en t1;

OD2: un valor de OD_{600} correspondiente en t2;

t2: un tiempo de finalización de una fase de crecimiento logarítmico; y

t1: un momento de inicio de la fase de crecimiento logarítmico.

Un criterio de selección fue que la tasa de crecimiento específico fuera mayor o igual a 0.3 h-1. Entre las treinta cepas de levadura, se obtuvieron preferentemente seis cepas de levadura con dominancia en el crecimiento, y se denominaron cepa 1, cepa 2, cepa 3, cepa 4, cepa 5 y cepa 6 respectivamente. La información de especies de las seis cepas de levadura fue *Saccharomyces cerevisiae* según los resultados del Ejemplo 1. Las tasas de crecimiento específicas de las seis cepas de levadura con dominancia de crecimiento se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3 Tasas de crecimiento específicas de seis cepas de levadura con dominancia de crecimiento

Nombre de la cepa	Tasa de crecimiento específico $\mu(h^{-1})$
Cepa 1	0.3085
Cepa 2	0.3217
Cepa 3	0.3173
Cepa 4	0.3200
Cepa 5	0.3049
Cepa 6	0.3108

Ejemplo 3: Selección de fermentación en matraz agitado

Se determinaron biomasa, proteína, ARN y otros índices de las seis cepas de levadura con dominancia de crecimiento en el Ejemplo 2, con el *Saccharomyces cerevisiae* FX-2 existente como control. Se inocularon siete cepas de levadura en tubos de ensayo que contenían cada uno 5 ml de medio líquido YPD a 30°C y 180 rpm durante 20 h, y luego se inocularon en matraces triangulares que contenían cada uno 300 ml de medio líquido YPD según una cantidad de inoculación del 0.6%. se cultivaron a 30°C y 180 rpm durante 18 h y se centrifugaron; se descartó un sobrenadante; se recogió leche de levadura; y se determinaron índices de biomasa, proteína, ARN y otros.

Los criterios de selección para los índices fisiológicos de la leche de levadura fueron los siguientes: la biomasa alcanzó el 110-120% de la biomasa de la cepa control; el contenido de proteína alcanzó el 100-110% del contenido de proteína de la cepa control; y el contenido de ARN alcanzó el 110-120% del contenido de ARN de la cepa control. Se calculó una ganancia relativa según la siguiente fórmula:

cierto contenido de índice fisiológico de la cepa seleccionada

$$\text{Ganancia relativa(\%)} = \frac{\text{certain physiological index content of screened strain}}{\text{cierto contenido de índice fisiológico de la cepa de control}} \times 100$$

1. Determinación de biomasa

Pesar la leche de levadura se conocía como determinación de biomasa.

Los resultados de la determinación de los índices de biomasa se muestran en la FIGURA 1 y FIGURA 4, en donde la biomasa de la cepa control fue de 42 g/L, la cepa 3 (48 g/L) y la cepa 4 (52 g/L) tienen cada una una biomasa superior a este índice de la cepa control, que fue de 14,3. % y 23,8% mayor que el de la cepa control, respectivamente; y los niveles de biomasa de la cepa 5 y la cepa 6 fueron consistentes con los de la cepa de control.

2. Método de detección de sustancias secas

Se secó una muestra directamente en una estufa de secado a 103 ± 2°C; y tras la pérdida de humedad, el porcentaje en masa resultante fue un porcentaje de sustancia seca.

3. Método de detección de proteína de leche de levadura.

Se pesó con precisión 1 g de leche de levadura (con una precisión de 0.0002 g) y se colocó en un tubo digestivo, se le agregaron 2.5 g de polvo digestivo, se agregaron lentamente 10 ml de ácido sulfúrico concentrado a lo largo de una pared del tubo y luego se colocó en un tubo de digestión. dispositivo y se digiere durante aproximadamente 3 h hasta que no produzca humo; la solución se volvió transparente y de color amarillo claro y luego se continuó calentando durante 10 min. Se sacó el tubo digestivo, se colocó para enfriar, se enjuagó la pared del tubo con aproximadamente 30 ml de agua destilada, se enfrió nuevamente, luego se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml, se enjuagó con una pequeña cantidad de agua tres veces y se vertió en un matraz aforado, se le añadió agua a escala de volumen constante y se agitó bien para obtener una solución digestiva para su uso posterior. Se pipetearon con precisión 25 ml de la solución digestiva en el tubo digestivo y se colocaron en un dispositivo de destilación. Se agregaron 25 ml de solución de ácido bórico a un matraz triangular, se agregaron 4-6 gotas de indicador mixto rojo de metilo-verde de bromocresol como solución receptora y se colocaron sobre una mesa receptora. Se abrió una válvula de circulación de agua; A un tubo digestivo se le agregaron 25 mL de solución de hidróxido de sodio; se encendió un interruptor de vapor y se levantó la mesa receptora, de modo que se sumergió un tubo receptor en la solución receptora y se destiló hasta que la solución receptora fue de 150-200 ml; se dejó la mesa receptora y se cortó el vapor y el agua circulante; se enjuagó una boquilla receptora con agua destilada; y se sacó la botella receptora. La solución receptora se tituló con una solución estándar de ácido sulfúrico de 0,05 mol/L; se alcanzó un punto final cuando el color pasó de verde a rojizo; al mismo tiempo se realizó

una prueba en blanco según el método anterior; y el contenido de proteína se calculó según la siguiente fórmula:

$$X = \frac{C(V1 - V2) \times 0.01401}{W \times Ds \times 25 \div 100} \times 100 \times 6.25$$

en donde: X representó un porcentaje de proteína en la muestra, %;

C representó una concentración de una solución estándar de ácido sulfúrico, mol/L;

V1 representó un volumen de solución estándar de ácido sulfúrico consumido por la titulación de la muestra, mL;

V2 representó un volumen de solución estándar de ácido sulfúrico consumido por la titulación de un control, mL;

0.01401 se refiere a una masa de nitrógeno expresada en gramos equivalente a 1,00 ml de solución estándar de ácido sulfúrico [$C(1/2H_2SO_4)$=1.000 mol/L];

W representó la masa de la muestra, g;

Ds representó un porcentaje de sustancia seca en la muestra, %; y

6.25 representó un factor de conversión de nitrógeno en proteína cruda.

Los resultados de la determinación del contenido de proteínas se muestran en la FIGURA 2 y Tabla 4. El contenido de proteína de la cepa de control fue del 60,91%, y las cepas 1, la cepa 3, la cepa 4 y la cepa 6 tenían cada una un contenido de proteína superior al 60%, entre las cuales la cepa 3 y la cepa 4 cada una. tenía un contenido de proteína superior al contenido de proteína del control, el contenido de proteína de la cepa 3 fue del 68,13% y el contenido de proteína de la cepa 4 fue del 65.25%.

4. Método de detección de ARN

Se pesaron 0.4-0.8 g de muestra de leche de levadura, se colocaron en un tubo de centrífuga y luego se pesaron, se les agregaron 8 ml de $HCLO_4$ frío de 0.25 mol/l, se agitaron y se mezclaron bien, se colocaron inmediatamente en agua fría a 4°C y se dejaron reposar durante 15 minutos. min, y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min; se descartó un sobrenadante; Se añadieron 5 ml de $HCLO_4$ 0.5 mol/l a los precipitados, se agitaron y se mezclaron bien; el tubo de centrífuga se colocó en un baño de agua a 70°C, se conservó térmicamente durante 15 min, se agitó una vez cada 5 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min; y se pipeteó 1 ml de sobrenadante, se añadió agua destilada hasta un volumen constante de 100 ml y se mezcló bien. Se enjuagó una cubeta con una muestra a medir y se colocó un espectrofotómetro después de

llenar la cubeta con la muestra. Se limpió la superficie, se midió un valor de absorbancia a 260 nm, se usó agua destilada como blanco, se registró la absorbancia y la fórmula fue la siguiente:

$$\mathrm{RNA}(\%) = \frac{\mathrm{A} \times 100 \times 0.03365 \times 5 \times 100}{\mathrm{m} \times \mathrm{Ds}}$$

en donde: A representó una absorbancia de una solución de muestra;

m representó la masa de la muestra ponderada, mg;

Ds representó una sustancia seca de la muestra;

5 representó un volumen de solución después de añadir 0.5 mol/l de $HCLO_4$; y

0.03365 correspondió al contenido de ARN en la solución a medir cuando la absorbancia fue de 1, mg/100 mL.

Los resultados de la determinación de los índices de ARN se muestran en la FIGURA 3 y la Tabla 4, el contenido de ARN de la cepa de control fue del 13.9%, y la cepa 2, la cepa 3 y la cepa 4 tenían cada una un contenido de ARN superior al del control.

Tabla 4 Índices fisiológicos y ganancia relativa (%) de la leche de levadura

	Biomasa (g/L)	Ganancia relativa (%)	Proteina (%)	Ganancia relativa (%)	ARN (%)	Ganancia relativa (%)
Control	42	100%	60.91	100%	13.9	100%
Cepa 1	35	83%	60.71	100%	12.43	89%
Cepa 2	38	90%	59.57	98%	14.13	102%
Cepa 3	48	114%	68.13	112%	15.99	115%
Cepa 4	52	124%	65.25	107%	15.29	110%
Cepa 5	42	100%	58.85	97%	13.24	95%
Cepa 6	42	100%	60.53	99%	13.75	99%

Como se muestra en la Tabla 4 anterior, el índice de biomasa de cada una de las cepas 3 y 4 alcanzó el 110-120% del índice de biomasa del estándar preferido; el índice proteico de cada una de las cepas 1, la cepa 3 y la cepa 4 alcanzó el 100-110% del índice proteico del estándar preferido; y el índice de ARN de cada una de las cepas 3 y 4 alcanzó el 110-120% del índice de ARN del estándar preferido. En resumen, los índices de contenido de biomasa, proteínas y ARN de las cepas 3 y 4 fueron superiores a los de la cepa control, y se pudieron determinar índices posteriores.

Ejemplo 4: Análisis del contenido de ácido glutámico

Las diferencias en los componentes de aminoácidos de las cepas de levadura dieron lugar a abundantes características de sabor de los metabolitos de las cepas, entre los cuales el ácido glutámico era un aminoácido representativo del umami.

La cepa 3, la cepa 4 y la cepa de control se inocularon cada una en un tubo de ensayo que contenía 5 ml de medio líquido YPD, se cultivaron a 30 °C y 180 rpm durante 20 h y luego se inocularon cada una en un matraz triangular que contenía 300 ml de YPD. medio líquido según una cantidad de inoculación del 0.6%, se cultivó a 30°C y 180 rpm durante 18 h y se centrifugó; se descartó un sobrenadante y se recogió leche de levadura; Se pesaron 0.5-1 g de leche de levadura, se colocaron en un matraz volumétrico de 50 ml, se les agregaron 20 ml de ácido sulfosalicílico, se trataron ultrasónicamente hasta su completa disolución, se midieron a una escala de volumen constante de 50 ml, se mezclaron bien y se dejaron reposar durante 1 h; Luego se pipeteó con precisión 1 ml de sobrenadante y se colocó en un matraz volumétrico de 25 ml, se añadió tampón de citrato de sodio a una escala de volumen constante, se mezcló bien y se filtró a un frasco de inyección a través de una membrana de filtro microporosa de 0.45 μm; se seleccionó una solución estándar de aminoácidos mixtos como estándar externo; y los contenidos de diversos componentes de aminoácidos se detectaron mediante un analizador automático de aminoácidos de acuerdo con la siguiente fórmula:

el contenido de aminoácidos en una solución de determinación de muestra:

$$\mathrm{Ci} = \frac{\mathrm{Cs}}{\mathrm{As}} \times \mathrm{Ai}$$

en donde: Ci representó el contenido del aminoácido i en la solución de determinación de muestra, nmol/L;

Ai representó un área del aminoácido i en la solución de determinación de muestra, mg;

Como se representa un área de pico de los aminoácidos en una solución de trabajo estándar de aminoácidos;

Cs representó el contenido de aminoácidos en la solución de trabajo estándar de aminoácidos, nmol/L;

el contenido de aminoácidos en una muestra:

$$\mathrm{Xi} = \frac{\mathrm{Ci} \times \mathrm{F} \times \mathrm{V} \times \mathrm{M}}{\mathrm{m} \times 10^{9}} \times 100$$

en donde: Xi representó el contenido del aminoácido i en la muestra, g/100g;

Ci representó el contenido del aminoácido i en la solución de determinación de muestra, nmol/L;

F representó un factor de dilución;

V representó un volumen constante de la muestra, mL;

M representó la masa molar del aminoácido i, g/mol;

m representaba una cantidad de pesaje, g;

10^9 representó un coeficiente de conversión del contenido de la muestra de ng a g; y

100 representaba un factor de conversión.

Cs representó el contenido de los aminoácidos en la solución de trabajo estándar de aminoácidos, nmol/L.

La FIGURA 4 mostró el contenido de los componentes de aminoácidos en la cepa 3, la cepa 4 y la cepa de control, y los resultados mostraron que el ácido glutámico representó la mayor proporción de diecisiete aminoácidos libres. La Tabla 5 mostró el contenido de componentes de ácido glutámico en la cepa 3, la cepa 4 y la cepa control, en la que el contenido de ácido glutámico de la cepa 3 fue 130% del contenido de ácido glutámico del control, y el contenido de ácido glutámico de la cepa 4 era 123% del contenido de ácido glutámico del control, es decir, el contenido de ácido glutámico de la cepa 3 alcanzó un estándar preferido de 125-130%.

Tabla 5 Contenido de componentes de ácido glutámico en cepa de levadura (%)

	Acido glutámico (%)	Ganancia relativa
Control	7.45	
Cepa 3	9.69	130%
Cepa 4	9.18	123%

Ejemplo 5: Análisis del contenido de ácido succínico

La cepa 3, la cepa 4 y la cepa control se activaron y luego cada una se cultivó en un matraz de 250 ml, con líquido YPD como medio, se cultivó en un tanque de fermentación de 20 L, luego se lavó y se sometió a filtración por succión y filtración prensada. ; se aislaron y recolectaron células microbianas para obtener leche de levadura; y se añadió agua desionizada de acuerdo con una relación másica en volumen de la leche de levadura al agua desionizada de 1:10, se ajustó el pH a 6.5 y se homogeneizó dos veces a alta presión. La levadura se agitó a 45°C, se autolizó durante 36 h y se centrifugó a 9000 rpm; Se tomó un sobrenadante, se filtró a través de un filtro de jeringa de 0.22 μm y se inyectó en un cromatógrafo líquido para su determinación. Al mismo tiempo se seleccionó un producto estándar de ácido succínico para la cromatografía

líquida. La FIGURA 5 y la Tabla 6 mostraron los contenidos de ácido succínico de la cepa 3, la cepa 4 y la cepa control.

Tabla 6: Contenido de ácido succínico

	Acido succinico (μg/mL)	Ganancia relativa
Control	371.4	
Cepa 3	463.6	125%
Cepa 4	406	109%

Los resultados de la FIGURA 5 y la Tabla 6 mostraron que el contenido de ácido succínico de la cepa 3 fue de 463,6 μg/ml y la ganancia relativa fue del 125%, alcanzando un estándar preferido del 110-120 %.

Ejemplo 6: Identificación de cepas

Se extrajo un genoma de la cepa 3, se amplificó una secuencia de ADNr 26S de la levadura tomando como cebadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGAGGAA AA G-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAAGACGG -3'), y se obtuvo una secuencia del gen 26S rDNA de la cepa 3 después de la detección y secuenciación por electroforesis en gel al 1%, como se muestra en SEQ ID NO. 1. Una secuencia genética para SEQ ID NO.1 fue la siguiente:

acggggatgcttagtaacggcgagtgaagcggcaaaagctcaaatttgaaatctggtaccttcggtgcccgagttgtaatttggagagggcaactttggggccgtt
ccttgtctatgttccttggaacaggacgtcatagagggtgagaatcccgtgtggcgaggagtgcggttctttgtaaagtgccttcgaagagtcgagttgtttgggaat
gcagctctaagtgggtggtaaattccatctaaagctaaatattggcgagagaccgatagcgaacaagtacagtgatggaaagatgaaaagaactttgaaaagaga
gtgaaaaagtacgtgaaattgttgaaagggaagggcatttgatcagacatggtgttttgtgccctctgctccttgtgggtaggggaatctcgcatttcactgggccag
catcagttttggtggcaggataaatccataggaatgtagcttgcctcggtaagtattatagcctgtgggaatactgccagctgggactgaggactgcgacgtaagtca
aggatgctggcataatggttatatgccgcccgtcttgaacccccggacca

La cepa 3 se denominó cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743 (*Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743), y se conservó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743 (*Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743). La cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743 (*Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743) se conservó en el Centro de Colección de Cultivos Tipo de China (CCTCC) el 27 de julio de 2021 y tenía un número de conservación de CCTCC NO: M 2021941.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* rica en proteínas y una aplicación de la misma, caracterizada porque la cepa de Saccharomyces cerevisiae es:

una cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743 (*Saccharcmyces cerevisiae* AMCC 30743), la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AMCC 30743 (*Saccharcmyces cerevisiae* AMCC 30743) se conserva en el Centro de Colección de Cultivos Tipo de China (CCTCC) el 27 de julio de 2021 y tiene un número de conservación de CCTCC NO. M 2021941.

2. Un método de preparación de fermentación para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo con la reivindicación 1, se caracteriza porque el método de preparación de fermentación comprende el siguiente paso: cultivar la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo con la reivindicación 1.

3. El método de preparación de la fermentación según la reivindicación 2, se caracteriza porque el método de preparación de la fermentación comprende los siguientes pasos:

(1) realizar un cultivo amplificado en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación 1; y

(2) añadir el producto obtenido en la etapa (1) a un medio de cultivo líquido y realizar un cultivo fermentado a 26-32°C.

4. Un agente microbiano, caracterizado porque el agente microbiano se obtiene de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación 1.

5. Una aplicación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación 1 o el agente microbiano según la reivindicación 4 en un extracto de levadura.

6. Un extracto de levadura, caracterizado porque el extracto de levadura se prepara a partir de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación 1 o el agente microbiano según la reivindicación 4.

7. Un agente microbiano, caracterizado porque el agente microbiano se obtiene mediante el método de preparación por fermentación según la reivindicación 2 o 3.

8. El agente microbiano según la reivindicación 7, caracterizado porque

el agente microbiano obtenido cultivando en un matraz agitado durante 15-20 h tiene una biomasa de 48-52 g/L; o

preferentemente, el agente microbiano tiene un contenido de proteína intracelular superior al 65% en peso del peso seco de células de levadura; o

preferentemente, el agente microbiano tiene un contenido de ARN superior al 15% en peso del peso seco de las células de levadura; o

preferentemente, el agente microbiano tiene un contenido de ácido glutámico intracelular superior al 9%; o

preferentemente, el contenido de ácido succínico intracelular del agente microbiano es un contenido de ácido succínico medido en un sobrenadante que se obtuvo después de añadir agua desionizada de acuerdo con una relación másica en volumen de la leche de levadura al agua desionizada de 1:10 y se rompen las células. , y el contenido de ácido succínico en un sobrenadante es superior a 460 µg/ml.

9. Una aplicación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación 1 o el agente microbiano según la reivindicación 4 o el extracto de levadura según la reivindicación 6 o el agente microbiano según la reivindicación 7 u 8 en piensos, alimentos y productos para el cuidado de la salud.

10. Una aplicación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación 1 o el agente microbiano según la reivindicación 4 o el extracto de levadura según la reivindicación 6 o el agente microbiano según la reivindicación 7 u 8 en condimentos.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporciona *Saccharomyces cerevisiae* rico en proteínas y una aplicación del mismo. La cepa AMCC de *Saccharomyces cerevisiae* proporcionada se conservó en el Centro de Colección de Cultivos Tipo de China (CCTCC) el 27 de julio de 2021 y tiene un número de conservación de CCTCC NO: M 2021941. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* proporcionada tiene las características de alta biomasa, alta proteínas y ARN elevado.

1/4

55

Biomasa (g/L)

Control Cepa 1 Cepa 2 Cepa 3 Cepa 4 Cepa 5 ……..Cepas 6

FIGURA 1

70

Contenido de proteína (%)

Control Cepa 1 Cepa 2 Cepa 3 Cepa 4 Cepa 5 ……..Cepas 6

FIGURA 2

18

Contenido de ARN (%)

Control Cepa 1 Cepa 2 Cepa 3 Cepa 4 Cepa 5 .....Cepas 6

FIGURA 3

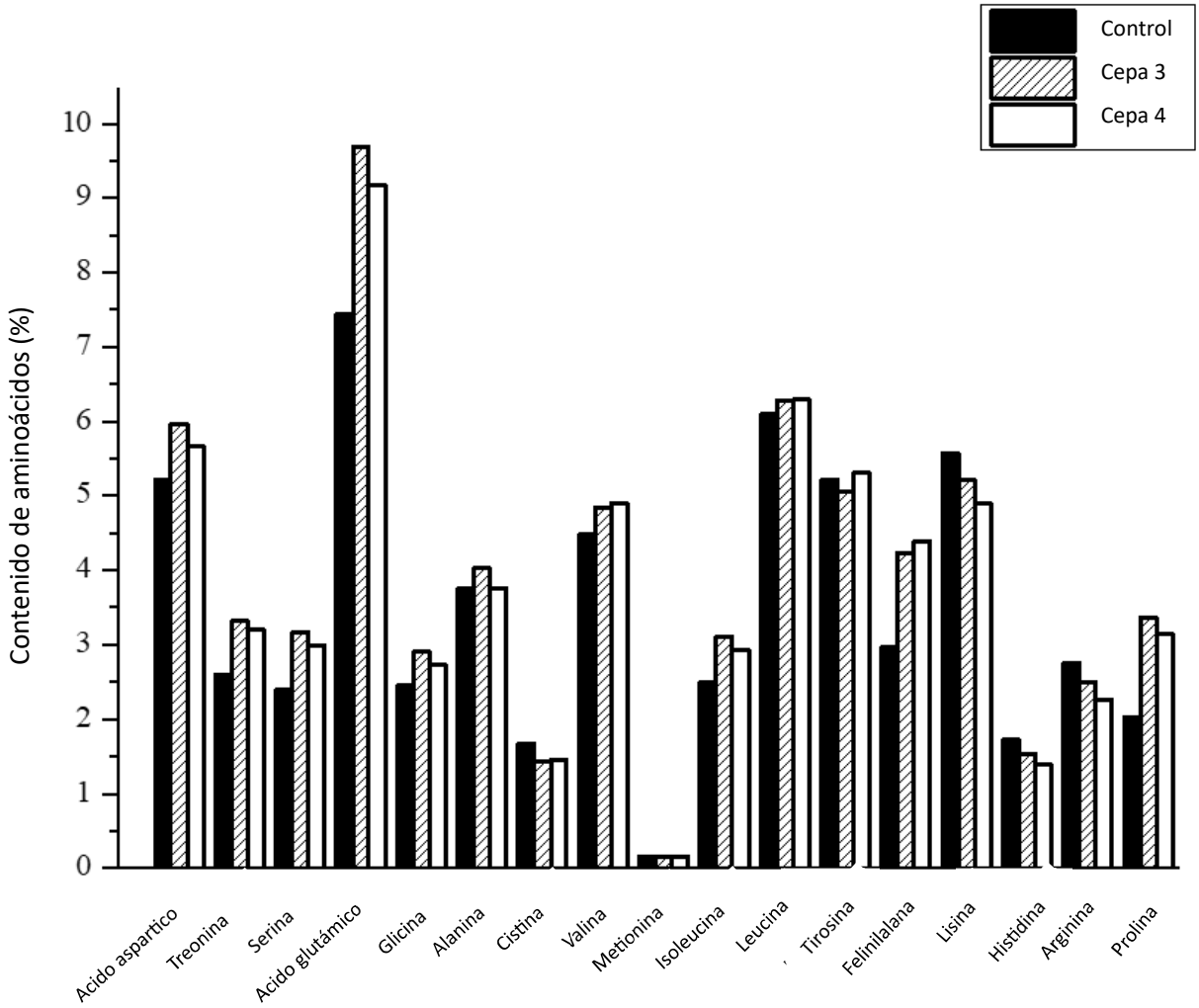
Control
Cepa 3
Cepa 4
Contenido de aminoácidos (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Acido aspartico
Treonina
Serina
Acido glutámico
Glicina
Alanina
Cistina
Valina
Metionina
Isoleucina
Leucina
Tirosina
Felinilalana
Lisina
Histidina
Arginina
Prolina

FIGURA 4

4/4

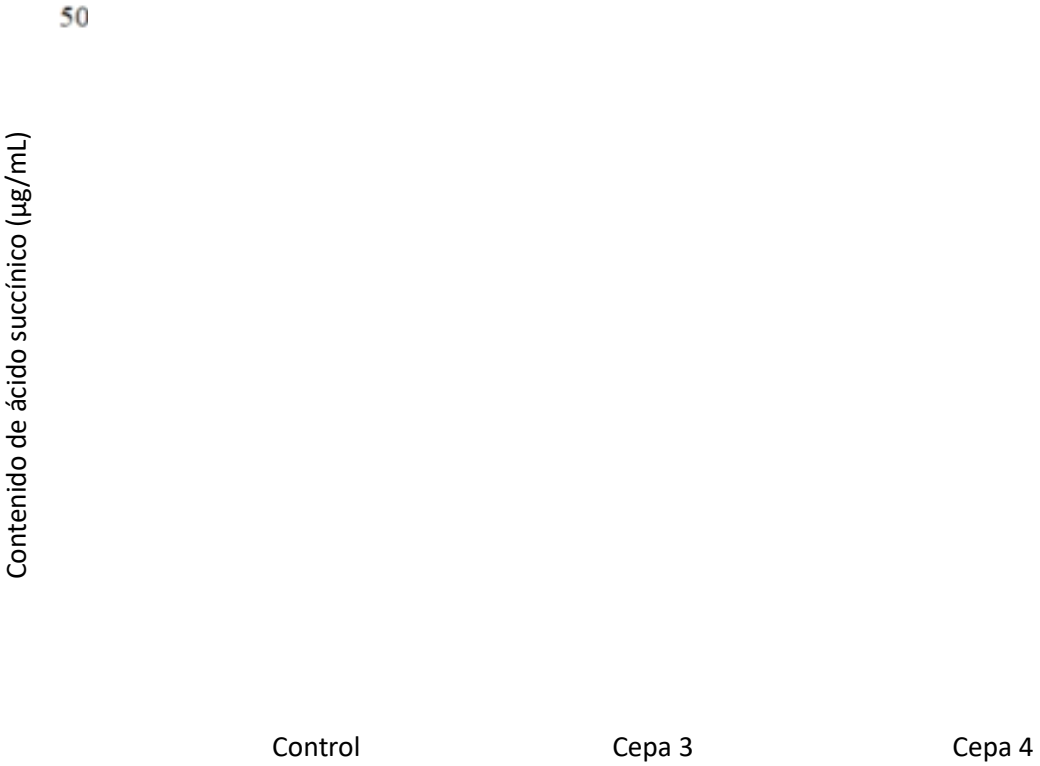

FIGURA 5