



MD 3256 G2 2007.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3256** ⁽¹³⁾ **G2**

(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12N 9/58 (2006.01)
C12R 1/80 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2006 0124 (22) Data depozit: 2006.04.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2007.02.28, BOPI nr. 2/2007
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: DESEATNIC Alexandra, MD; CLAPCO Steliana, MD; PAȘA Lilia, MD; TIURIN Janetta, MD; LABLIUC Svetlana, MD; GHIȚU Dumitru, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN
FD 04 P (variante)

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular
la un procedeu de cultivare submersă a tulpinii de
fungi *Penicillium viride* și poate fi utilizată în
industria microbiologică pentru obținerea enzimelor
pectolitice.

Procedeul de cultivare submersă a tulpinii de
fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P (variante
1) include pregătirea suspensiei de spori, inocularea
ei pe un mediu nutritiv, tratarea culturii de fungi
peste 24 ore de cultivare cu unde de intensitate joasă
cu λ 5,6 mm, emise în regim periodic timp de
15...20 min. Cultivarea se efectuează la temperatura
de 28...30°C timp de 96 ore.

2
5 Procedul de cultivare submersă a tulpinii de
fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P (variante
2) include pregătirea suspensiei de spori, inocularea
ei pe un mediu nutritiv, tratarea suspensiei de spori
înainte de inoculare și a culturii de fungi peste 24
ore de cultivare timp de 15...20 min cu unde de
intensitate joasă cu λ 5,6 mm, emise în regim
10 periodic. Cultivarea se efectuează la temperatura de
28...30°C timp de 96 ore.
Rezultatul invenției constă în sporirea biosin-
tezei enzimelor pectolitice.
15 Revendicări: 2

MD 3256 G2 2007.02.28

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor pectolitice.

5 În calitate de cea mai apropiată soluție s-a utilizat procedeul de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* ce include etapele: pregătirea materialului semincer prin spălarea cu apă distilată a culturii de 21 zile de pe coloane oblice de malț-agar, însămânțarea mediului nutritiv steril cu următoarea componență (g/L): borhot de sfeclă 25,0; făină de porumb 15,0; glucoză 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0; ZnSO_4 0,25; MgSO_4 0,7; apă potabilă până la 1,0 L, pH-ul inițial al mediului 6,0 și procesul cultivării realizat în condiții de agitare continuă pe agitator rotativ (180...200 rot./min), în baloane Erlenmayer cu capacitate de 1,0 L la temperatura de 28...30°C, durata cultivării constituie 96 ore [1].

La cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P în condiții proximale lichidul cultural manifestă activitate pectolitică de 860,0 u/mL.

Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în faptul că în condiții proximale nu se realizează pe deplin potențialul biosintetic al tulpinii și biosinteza enzimelor pectolitice nu atinge valoarea maximă.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P, care să asigure sporirea capacității biosintetice a producătorului.

Esenta invenției constă în aceea că procedeul de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P (variante 1) conform invenției include pregătirea suspensiei de spori, inocularea ei pe un mediu nutritiv, tratarea culturii de fungi peste 24 ore de cultivare cu unde de intensitate joasă cu λ 5,6 mm, emise în regim periodic timp de 15...20 min. Cultivarea se efectuează la temperatura de 28...30°C timp de 96 ore.

Procedeul de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P (variante 2) include pregătirea suspensiei de spori, inocularea ei pe un mediu nutritiv, tratarea suspensiei de spori înainte de inoculare și a culturii de fungi peste 24 ore de cultivare timp de 15...20 min cu unde de intensitate joasă cu λ 5,6 mm, emise în regim periodic. Cultivarea se efectuează la temperatura de 28...30°C timp de 96 ore.

Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei enzimelor cu 28,0...39,0% față de cea mai apropiată soluție.

Efectul biostimulator al undelor milimetrice de intensitate joasă este determinat de activarea sistemelor enzimactice ale celulelor microbiene, urmată de creșterea vitezei de transport a substanțelor nutritive și intensificarea proceselor de formare a produselor metabolice (Пичко В.Б., Поваляева И.В. Электромагнитная стимуляция продуцирующей способности микроорганизмов и её механизмы. Прикладная биохимия и микробиология. 1996, т. 32, № 4, с. 468-472).

Varianta I constă în pregătirea suspensiei de spori, însămânțarea mediului nutritiv steril, procesul cultivării, tratarea culturii de *Penicillium viride* cu unde milimetrice de intensitate joasă cu λ 5,6 mm emise în regim periodic peste 24 ore de cultivare submersă, continuarea procesului de cultivare. Ca sursă de unde milimetrice servește generatorul „Явь-1”.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1. Suspensia de spori se pregătește prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii de *Penicillium viride* crescută timp de 21 zile pe suprafețe oblice de malț-agar. Ulterior, suspensia de spori în concentrație de 10% în bază volumetrică se inoculează pe mediul nutritiv steril cu următoarea compoziție (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0; ZnSO_4 0,25; MgSO_4 0,7; glucoză 1,0; făină de porumb 15,0; borhot de sfeclă 25,0; apă potabilă până la 1,0 L, pH-ul inițial 6,0. Cultivarea micromicetei se efectuează în baloane Erlenmayer de 10,0 L cu 0,1 L mediu nutritiv, pe agitatoare rotative (180...200 rot./min) la temperatura de 28...30°C. Peste 24 ore de cultivare baloanele sunt scoase de pe agitatoare, cultura este transferată steril în pahare de sticlă și supusă acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă timp de 20 min. După iradiere cultura este retransferată în baloane Erlenmayer și se continuă procesul de cultivare în condițiile menționate. Durata cultivării constituie 96 ore.

Activitatea pectolitică în lichidul cultural dozată prin metoda interferometrică a constituit 1100,8 u/mL, ceea ce depășea cu 28,0% activitatea fixată la cultivarea tulpinii în condiții proximale.

Exemplul 2. Suspensia de spori se pregătește prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii de *Penicillium viride* crescută timp de 21 zile pe suprafețe oblice de malț-agar. Ulterior, suspensia de spori în concentrație de 10% în bază volumetrică se inoculează pe mediul nutritiv steril cu următoarea compoziție (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0; ZnSO_4 0,25; MgSO_4 0,7; glucoză 1,0; făină de porumb 15,0; borhot de sfeclă 25,0; apă potabilă până la 1,0 L, pH-ul inițial 6,0. Cultivarea micromicetei se efectuează în baloane Erlenmayer de 10,0 L cu 0,1 L mediu nutritiv, pe agitatoare rotative (180...200 rot./min) la temperatura de 28...30°C. Peste 24 ore de cultivare baloanele sunt scoase de pe agitatoare, cultura este

MD 3256 G2 2007.02.28

4

transferată steril în pahare de sticlă și supusă acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă timp de 15 min. După iradiere cultura este retransferată în baloane Erlenmayer și se continuă procesul de cultivare în condițiile menționate. Durata cultivării constituie 96 ore.

5 Activitatea pectolitică în lichidul cultural dozată prin metoda interferometrică a constituit 1143,8 u/mL, ceea ce depășea cu 33,0% activitatea fixată la cultivarea tulpinii în condiții proxime.

Varianta II constă în pregătirea suspensiei de spori, tratarea ei cu unde milimetrice de intensitate joasă cu λ 5,6 mm emise în regim periodic, însămânțarea mediului nutritiv steril, procesul cultivării, tratarea culturii de *Penicillium viride* cu unde milimetrice de intensitate joasă cu λ 5,6 mm emise în regim periodic peste 24 ore de cultivare submersă, continuarea procesului de cultivare. Ca sursă de unde milimetrice servește generatorul „ЯВЬ-1”.

10 *Exemplul 1.* Suspensia de spori pregătită prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii de *Penicillium viride* crescută timp de 21 zile pe suprafețe oblice de malț-agar se supune acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă timp de 20 min. Ulterior, suspensia de spori în concentrație de 10% în bază volumetrică se inoculează pe mediul nutritiv steril cu următoarea compoziție (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0; ZnSO_4 0,25; MgSO_4 0,7; glucoză 1,0; făină de porumb 15,0; borhot de sfeclă 25,0; apă potabilă până la 1,0 L, pH-ul inițial 6,0. Cultivarea micromicetei se efectuează în baloane Erlenmayer de 10,0 L cu 0,1 L mediu nutritiv, pe agitatoare rotative (180...200 rot./min) la temperatura de 28...30°C. Peste 24 ore de cultivare baloanele sunt scoase de pe agitatoare, cultura este transferată steril în pahare de sticlă și supusă acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă timp de 20 min. După iradiere cultura este retransferată în baloane Erlenmayer și se continuă procesul de cultivare în condițiile menționate. Durata cultivării constituie 96 ore.

20 Activitatea pectolitică în lichidul cultural dozată prin metoda interferometrică a constituit 1169,6 u/mL, ceea ce depășea cu 36,0% activitatea fixată la cultivarea tulpinii în condiții proxime.

25 *Exemplul 2.* Suspensia de spori pregătită prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii de *Penicillium viride* crescută timp de 21 zile pe suprafețe oblice de malț-agar este supusă acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă timp de 15 min.

30 Ulterior, suspensia de spori în concentrație de 10% în bază volumetrică se inoculează pe mediul nutritiv steril cu următoarea compoziție (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0; ZnSO_4 0,25; MgSO_4 0,7; glucoză 1,0; făină de porumb 15,0; borhot de sfeclă 25,0; apă potabilă până la 1,0 L, pH-ul inițial 6,0. Cultivarea micromicetei se efectuează în baloane Erlenmayer de 10,0 L cu 0,1 L mediu nutritiv, pe agitatoare rotative (180...200 rot./min) la temperatura de 28...30°C. Peste 24 ore de cultivare baloanele sunt scoase de pe agitatoare, cultura este transferată steril în pahare de sticlă și supusă acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă timp de 15 min. După iradiere cultura este retransferată în baloane Erlenmayer și se continuă procesul de cultivare în condițiile menționate. Durata cultivării constituie 96 ore.

35 Activitatea pectolitică în lichidul cultural dozată prin metoda interferometrică a constituit 1195,4 u/mL, ceea ce depășea cu 39,0% activitatea fixată la cultivarea tulpinii în condiții proxime.

MD 3256 G2 2007.02.28

5

(57) Revendicări:

5 1. Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P, care include pregătirea suspensiei de spori, inocularea ei pe un mediu nutritiv și cultivarea la temperatura de 28...30°C timp de 96 ore, **caracterizat prin aceea că** peste 24 ore de cultivare cultura de fungi suplimentar se tratează timp de 15...20 min cu unde de intensitate joasă cu λ 5,6 mm, emise în regim periodic.

10 2. Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P, care include pregătirea suspensiei de spori, inocularea ei pe un mediu nutritiv, cultivarea la temperatura de 28...30°C timp de 96 ore, **caracterizat prin aceea că** suplimentar se efectuează tratarea suspensiei de spori înainte de inoculare și a culturii de fungi peste 24 ore de cultivare timp de 15...20 min cu unde de intensitate joasă cu λ 5,6 mm, emise în regim periodic.

15

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 2837 G2 2005.08.31

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2006 0124	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2006.04.13	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.: 32) data : 33) țara : (51) : Int.Cl: C12N 1/14 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01) C12N 13/00 (2006.01) C12N 9/58 (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul : Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi <i>Penicillium viride</i> CNMN FD 04 P (variante) (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici: <i>Penicillium viride</i> , cultivare, condiții cultivării	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7)	
MD 1994-2005, EA 1996-2005, SU fond BRTȘ, inclusiv și colecția „nepublică”)	
II. Documente considerate ca relevante	
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente
A	MD 2613 G2 2005.07.31
A	MD 2837 G2 2005.08.31
Numărul revendicării vizate	
1	
1	
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II	☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:	P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general	T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data	X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)	Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă	& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării	2006.12.06
Examinatorul	Bantaș Valentina