



MD 3301 G2 2007.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3301** <sup>(13)</sup> **G2**

(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)  
*C12N 13/00* (2006.01)  
*C12R 1/80* (2006.01)  
*C12N 9/42* (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2006 0122 (22) Data depozit: 2006.04.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2007.04.30, BOPI nr. 4/2007
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: DESEATNIC Alexandra, MD; PAȘA Lilia, MD; TIURIN Janetta, MD; LABLIUC Svetlana, MD; CLAPCO Steliana, MD; GHIȚU Dumitru, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de funghi *Penicillium expansum*  
CNMN FD 05 C**

(57) **Rezumat:**

1  
Invenția se referă la biotehnologie, în particular  
la un procedeu de cultivare submersă a tulpinii de  
funghi *Penicillium expansum* și poate fi utilizată în  
industria microbiologică pentru obținerea prepara-  
telor celulozolitice cu un conținut sporit de celo-  
biohidrolază.

Procedeul de cultivare submersă a tulpinii de  
funghi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C  
include pregătirea suspensiei de spori, tratarea ei  
timp de 30 min cu unde de intensitate joasă cu  $\lambda$  5,6  
mm, emise în regim periodic, inocularea suspensiei

2  
5 tratate pe un mediu nutritiv cu pH-ul 4,5 cu  
următoarea componență, % mas.:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1,  
 $\text{CaCl}_2$  0,01, KCl 0,01,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,03,  $\text{NaNO}_3$   
0,25,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,001, extract de porumb 1,5,  
strujeni de porumb 4,0, apă distilată restul și cul-  
varea la temperatura de 28...30°C timp de 120 ore.

10 Rezultatul invenției constă în sporirea bio-  
sintezei celobiohidrolazei.

Revendicări: 1

15

MD 3301 G2 2007.04.30

## MD 3301 G2 2007.04.30

3

### Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium expansum* și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea preparatelor celulozolitice cu conținut sporit de celobiohidrolază.

5 Capacitatea de biosinteză a celobiohidrolazei necesare pentru prelucrarea efectivă a materialelor cu conținut înalt de celuloză este o particularitate importantă a microorganismelor fungice la care se referă și reprezentanții genului *Penicillium*. (Pentru informație – bacteriile nu sintetizează celobiohidrolaze). Exo- $\beta$ -1,4-glucan-4-celobiohidrolaza acționează atât asupra formelor simple ale celulozei naturale, cât și asupra celor complexe, punând în libertate unități terminale de celobioză din celuloză. Componenta sistemului celolitic endoglucanaza (endo- $\beta$ -1,4-glucanohidrolaza) nu este necesară pentru acțiunea celobiohidrolazei. Ambele componente sinergeză puternic cu  $\beta$  - glucozidaza (celobiaza). Conținutul redus al celobiohidrolazei în complexul celulozolic limitează viteza de transformare a celulozei în glucoză (Zarnea G., Mencinicopschi Gh., Brăgărea Șt. Bioingineria preparatelor enzimactice microbiene. București, Editura tehnică, 1980, p. 318-330).

15 Micromicetele producătoare de celulaze exocelulare sunt cultivate, în special, submers la temperatura de 28...30°C, pe medii care conțin inductori ai sintezei celulazelor (celuloză microcristalină sau diferite ingrediente naturale cu conținut înalt de celuloză – paie de graminee, coarde de viță de vie, rumeguș de lemnoase, borhot de sfeclă, tărâțe de grâu etc.), cu valori ale pH-ului inițial cuprinse între 4,5...5,5. Etapele principale ale procedurii de sinteză microbiană a enzimelor inclusiv și a celulazelor constituie: pregătirea materialului semincer și a mediilor nutritive, inocularea mediilor nutritive și cultivarea microorganismelor [1].

20 În calitate de cea mai apropiată soluție servește procedeu de cultivare submersă a micromicetei *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C pe un mediu având componența (%):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1,  $\text{CaCl}_2$  0,01,  $\text{KCl}$  0,01,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,03,  $\text{NaNO}_3$  0,25,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,001, celuloză microcristalină 1,0, extract de porumb 1,5, apă distilată – restul, pH-ul inițial 4,5, în condiții de agitare continuă pe agitator rotativ (180 rot./min), temperatura de 28...30°C, durata cultivării 168 ore [2].

25 În aceste condiții de cultivare tulpina sintetizează un complex celulazic activ cu o compoziție echilibrată a componentelor: 42,43 u/mL endoglucanaze, 2,07 u/mL celobiohidrolaze și 4,08 u/mL  $\beta$ -glucozidaze. Procedeu include etapele: pregătirea materialului semincer prin spălarea cu apă distilată a culturii de 14 zile de pe mediul agarizat înclinat, însămânțarea mediului nutritiv steril, cultivarea.

30 Dezavantajele celei mai apropiate soluții sunt conținutul înalt de celuloză microcristalină în mediul nutritiv, durata mare de cultivare (168 ore).

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C, în vederea obținerii unui preparat celulazic cu activitate înaltă celobiohidrolazică avantajos economic.

35 Esența invenției constă în aceea că a fost înlocuită componenta costisitoare – celuloza microcristalină – cu un substrat ieftin ce constituie un produs secundar al fitotehniei, și anume strujeni de porumb.

40 Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C include pregătirea suspensiei de spori, tratarea ei timp de 30 min cu unde de intensitate joasă cu  $\lambda$  5,6 mm, emise în regim periodic, inocularea suspensiei tratate pe un mediu nutritiv cu pH-ul 4,5 cu următoarea componență, % mas.:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1,  $\text{CaCl}_2$  0,01,  $\text{KCl}$  0,01,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,03,  $\text{NaNO}_3$  0,25,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,001, extract de porumb 1,5, strujeni de porumb 4,0, apă distilată restul și cultivarea la temperatura de 28...30°C timp de 120 ore.

45 Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei celobiohidrolazei.

Avantajele procedurii propus sunt:

- sporirea activității celobiohidrolazice (1,98...2,08) u/mL;
- reducerea prețului de cost al mediului de cultivare;
- reducerea duratei de cultivare cu 48 ore.

50 Efectul biostimulator al undelor milimetrice de intensitate joasă este determinat de capacitatea lor de a biostimula și regla activitatea sistemelor enzimactice ale celulelor microbiene, urmată de sporirea vitezei de transport a substanțelor nutritive și intensificarea proceselor de formare a produselor metabolice, cât și de capacitatea de a restabili activitatea biosintetică a celulelor la nivelul original în caz de pierdere a ei în condiții nefavorabile naturale sau artificiale.

*Exemple de realizare a invenției*

55 *Exemplul 1*

Suspensia de spori a culturii de *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C, crescută timp de 14 zile pe suprafețe oblice de malț-agar și spălată cu apă distilată sterilă se supune în condiții sterile iradierii timp de 30 min cu unde de intensitate joasă ( $\lambda=5,6$  mm), emise în regim periodic. În calitate de sursă de UMM servește generatorul „ЯВБ-1”.

## MD 3301 G2 2007.04.30

4

5 Ulterior, suspensia de spori tratată, în concentrație de 10% vol. se inoculează în mediul nutritiv steril cu următoarea componență, % masă:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1,  $\text{CaCl}_2$  0,01,  $\text{KCl}$  0,01,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,03,  $\text{NaNO}_3$  0,25,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,001, strujeni de porumb 4,0, extract de porumb 1,5, apă distilată restul, pH-ul inițial 4,5, durata cultivării 120 ore. Cultivarea tulpinii se realizează în baloane Erlenmayer de 1,0 L cu 0,2 L mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă pe agitatoare rotative (180...200 rot./min) la temperatura de 28...30°C, durata cultivării 120 ore.

10 Activitatea endoglucanazică, celobiohidrolazică și  $\beta$ -glucozidazică determinată în lichidul cultural obținut prin dozarea zaharurilor reducătoare (metoda Somogy - Nelson) în urma acțiunii lichidului cultural asupra substraturilor specifice: Na-carboximetilceluloză, hârtie de filtru și p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranozid au avut respectiv valorile 29,74, 1,98 și 4,15 u/mL. Pe mediul cu strujeni de porumb, fără tratarea materialului semincer cu unde milimetrice de intensitate joasă, activitatea celobiohidrolazică a constituit 1,20 u/mL.

### Exemplul 2

15 Porțiuni de miceliu (1 x 2 cm) al culturii de *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C crescută timp de 14 zile pe cutii Petri cu maț-agar se supun, în condiții sterile, iradierii timp de 30 min cu unde milimetrice de intensitate joasă ( $\lambda=5,6$  mm), emise în regim periodic. Ulterior, suspensia de spori astfel tratată se inoculează în mediul nutritiv steril. Cultivarea tulpinii se realizează în baloane Erlenmayer de 0,5 L, cu 0,2 L mediu nutritiv, pe agitatoare rotative (180...200 rot./min) la temperatura de 28...30°C pe mediu cu următoarea componență, % mas.:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1,  $\text{CaCl}_2$  0,01,  $\text{KCl}$  0,01,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,03,  $\text{NaNO}_3$  0,25,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,001, strujeni de porumb 4,0, extract de porumb 1,5, apă distilată restul, pH-ul inițial 4,5, durata cultivării 120 ore. În calitate de sursă de UMM servește generatorul „ЯВЬ-1”.

20 Activitatea endoglucanazică, celobiohidrolazică și  $\beta$ -glucozidazică determinată în lichidul cultural a avut respectiv valorile 26,23, 2,08 și 4,12 u/mL.

25 Pe mediul cu strujeni de porumb, fără tratarea materialului semincer cu unde milimetrice de intensitate joasă, activitatea celobiohidrolazică a constituit 1,26 u/mL.

Tabel

Activitatea celobiohidrolazică a tulpinii *Penicillium expansum*  
CNMN FD 05 C în funcție de varianta de cultivare

Mediu de cultivare	Materialul cultivat	Durata cultivării, ore	Activitatea celobiohidrolazică, u/mL
Mediu cu celuloză microcristalină	suspensie de spori neiradiată	168	2,07
Mediu cu strujeni de porumb	suspensie de spori neiradiată	120	1,20
Mediu cu strujeni de porumb	suspensie de spori iradiată (30 min) (exemplul 1)	120	1,98
	porțiuni de miceliu iradiat (30 min) (exemplul 2)	120	2,08

30

## MD 3301 G2 2007.04.30

5

### (57) Revendicare:

5       Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de funghi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C, care  
include pregătirea suspensiei de spori, inocularea ei pe un mediu nutritiv cu pH-ul 4,5, conținând  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaNO<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, extract de porumb, sursă de carbon, apă  
distilată și cultivarea la temperatura de 28...30°C, **caracterizat prin aceea că** înainte de inoculare  
10       suspensia de spori se tratează timp de 30 min cu unde de intensitate joasă cu λ 5,6 mm, emise în regim  
periodic, în calitate de sursă de carbon se utilizează strujeni de porumb, totodată componentele mediului  
nutritiv sunt luate în următorul raport, % mas.: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1, CaCl<sub>2</sub> 0,01, KCl 0,01, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,03,  
NaNO<sub>3</sub> 0,25, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,001, extract de porumb 1,5, strujeni de porumb 4,0, apă distilată restul, iar  
cultivarea se efectuează timp de 120 ore.

15

### (56) Referințe bibliografice:

1. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. Москва, Агропромиздат, 1987,  
с. 197-216
2. MD 2588 G2 2004.10.31

Șef Secție:	GROSU Petru
Examinator:	BANTAȘ Valentina
Redactor:	LOZOVANU Maria

## RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2006 0122	(85) Data fazei naționale PCT:	
(22) Data depozit: 2006.04.13	(86) Cerere internațională PCT:	
<p>Prioritatea invocată :</p> <p>(31) nr.:        32) data :        33) țara :</p> <p>(51) : <b>Int.Cl:</b> <i>C12N 1/14</i> (2006.01)  <i>C12N 9/42</i> (2006.01)  <i>C12N 13/00</i> (2006.01)  <i>C12R 1/80</i> (2006.01)</p> <p>Alți indici de clasificare:</p> <p><b>Titlul</b> : Procedeu de sinteza orientata a celobiohidrolazelor de catre tulpina de fungi <i>Penicillium expansum</i> CNMN FD 05 C in cultura submersa</p> <p>(71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD</p> <p>Termeni caracteristici: celobiohidrolaze, tulpina de fungi <i>Penicillium expansum</i> , mediu nutritiv, paie de porumb</p>		
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	Numărul revendicării vizate
A	MD 2588 G2 2004.10.31	1
A	MD 2747 G2 2005.04.30	1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		<b>P</b> - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
<b>A</b> - document care definește stadiul anterior general		<b>T</b> - 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
<b>E</b> - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		<b>X</b> - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
<b>L</b> - 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)		<b>Y</b> - 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
<b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		<b>&amp;</b> - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2006.12..21
Examinatorul		Bantaș Valentina