



MD 3255 F1 2007.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3255** ⁽¹³⁾ **F1**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/80 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2006 0123 (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; TIURIN Janetta, MD; PAȘA Lilia, MD; BOLOGA Olga, MD; LABLIUC Svetlana, MD; GĂRBĂLĂU Nicolae, MD; RUDIC Valeriu, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium expansum*
CNMN FD 05 C

(57) Rezumat:

1		2		
5	Invenția se referă la microbiologie, în particular la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi <i>Penicillium expansum</i> CNMN FD 05 C și poate fi aplicată pentru obținerea preparatelor celulozolitice, utilizate în oenologie.	KH ₂ PO ₄	1,0	
		CaCl ₂	0,1	
		KCl	0,1	
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	
		NaNO ₃	2,5	
10	Mediul nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi <i>Penicillium expansum</i> CNMN FD 05 C conține KH ₂ PO ₄ , CaCl ₂ , KCl, MgSO ₄ ·7H ₂ O, NaNO ₃ , FeCl ₃ ·6H ₂ O, extract de porumb, paie de porumb, MoO ₂ (acac) ₂ Gly, și apă distilată, având pH-ul 4,5...5,5, ingredientele fiind luate în următorul raport, g/L:	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,01	
		MoO ₂ (acac) ₂ Gly	0,015	
		extract de porumb	15,0	
		paie de porumb	40,0	
		apă distilată	restul.	
		15	Revendicări: 1	

MD 3255 F1 2007.02.28

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie, în particular la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C și poate fi aplicată pentru obținerea preparatelor celulozolitice, utilizate în oenologie.

5 Este cunoscut mediul pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C, care conține (g): KH_2PO_4 1,0; CaCl_2 0,1; KCl 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3; NaNO_3 2,5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01; celuloză microcristalină 10; extract de porumb 15,0; apă distilată 1,0 L; pH 4,5...5,5, pe care tulpina este cultivată submers în baloane Erlenmayer de 0,5 L la temperatura 28...30°C, pe agitator rotativ (180 rot. $\cdot$ min⁻¹), timp de 168 ore. Activitatea enzimatică a componentelor complexului celulazic, și anume a endoglucanazelor, celobiohidrolazelor și β -glucozidazelor constituie, corespunzător, 42,43 U $\cdot$ mL⁻¹, 2,07 U $\cdot$ mL⁻¹ și 4,08 U $\cdot$ mL⁻¹ [1].

10 Este de asemenea cunoscut un mediu pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C, care conține, g/L: KH_2PO_4 1,0; CaCl_2 0,1; KCl 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3; NaNO_3 2,5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01; extract de porumb 15,0, celuloză microcristalină 10,0 și apă, care suplimentar în calitate de biostimulator al biosintezei complexului celulazic include în microdoze compusul $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3\text{Gly}$. Durata de cultivare pe acest mediu de asemenea constituie 168 ore [2].

15 Dezavantajele acestor medii constau în activitatea relativ joasă a β -glucozidazei, conținutul înalt în mediile nutritive al componentei costisitoare celuloză microcristalină, durata mare de cultivare – 168 ore.

20 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C, care să asigure biosinteza sporită a β -glucozidazelor.

25 Mediul nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C conține KH_2PO_4 , CaCl_2 , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, extract de porumb, un compus coordinativ conținând glicină și apă distilată, având pH-ul 4,5...5,5. Suplimentar mediul conține paie de porumb, iar în calitate de compus coordinativ se utilizează $\text{MoO}_2(\text{acac})_2\text{Gly}$, ingredientele fiind luate în următorul raport, g/L:

KH_2PO_4	1,0
CaCl_2	0,1
KCl	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3
NaNO_3	2,5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{MoO}_2(\text{acac})_2\text{Gly}$	0,015
extract de porumb	15,0
paie de porumb	40,0
apă distilată	restul.

30 Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei β -glucozidazei cu 63...65%, activitatea în lichidul cultural constituind 6,82...6,91 U $\cdot$ mL⁻¹ față de 4,10...4,15 U $\cdot$ mL⁻¹ la cultivare pe mediul celei mai apropiate soluții, reducerea duratei de cultivare cu 48 ore, constituind 120 ore față de 168 ore pe mediul conform celei mai apropiate soluții. Un alt avantaj al invenției constă în substituirea componentei costisitoare – celuloza microcristalină cu o componentă ieftină – paie de porumb, care reprezintă un deșeu al fitotehnicii.

Exemple de realizare a invenției

35 *Exemplul 1.* Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C se cultivă în baloane Erlenmayer de 0,5 L cu 0,1 L mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (180...200 rot. $\cdot$ min⁻¹) la temperatura 28°C, durata cultivării 120 ore. Pe mediul nutritiv cu compoziția (g): KH_2PO_4 1,0; CaCl_2 0,1; KCl 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3; NaNO_3 2,5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{MoO}_2(\text{acac})_2\text{Gly}$ 0,015; paie de porumb 40,0; extract de porumb 15,0; apă distilată 1,0 L; pH 4,5.

40 Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și β -glucozidazică s-au determinat prin dozarea zaharurilor reducătoare (metoda Somogy - Nelson) în urma acțiunii lichidului cultural asupra substraturilor specifice: Na-carboximetilceluloză, hârtie de filtru și p-nitrofenil- β -D-glucopiranozid și în varianta propusă au avut valorile respective 29,74 U $\cdot$ mL⁻¹, 1,20 U $\cdot$ mL⁻¹ și 6,82 U $\cdot$ mL⁻¹.

45 *Exemplul 2.* Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C se cultivă în baloane Erlenmayer de 0,5 L cu 0,1 L mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (180...200 rot. $\cdot$ min⁻¹) la temperatura 28°C, timp de 120 ore. Pe mediul cu compoziția (g): KH_2PO_4 1,0; CaCl_2 0,1; KCl 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3; NaNO_3 2,5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{MoO}_2(\text{acac})_2\text{Gly}$ 0,015; paie de porumb 40,0; extract de porumb 15,0; apă distilată 1,0 L;

MD 3255 F1 2007.02.28

4

pH 5,5. Activitatea endoglucanazică, celobiohidrolazică și β -glucozidazică au avut valorile 25,63 U·mL⁻¹, 1,14 U·mL⁻¹, 6,92 U·mL⁻¹ (v. tabelul).

Mediul	Activitatea, U·mL ⁻¹		
	endoglucanazică	celobiohidrolazică	β -glucozidazică
Conform celei mai apropiate soluții	40,12	1,92	4,1
Conform invenției	29,74	1,20	6,82
Conform celei mai apropiate soluții	42,31	2,02	4,15
Conform invenției	25,63	1,14	6,92

- 5 Metoda obținerii combinației MoO₂ (acac)₂Gly: 0,4 g (0,001 moli) de MoO₂ (acac)₂·4H₂O, se dizolvă la încălzire în 30 mL de amestec de apă și metanol (1:2). La soluția obținută se adaugă 0,1 g (0,0001 moli) glicină în 10 H₂O. Amestecul se încălzește 5 min (~40°C). La răcirea lentă MoO₂ (acac)₂Gly se sedimentează sub formă de cristale aciforme de culoare albă-gri. Randamentul ~40%. Substanța este solubilă în apă, alcool metilic și etilic.

- 10 Pentru C₇H₁₁MoNO₄:
găsit, %: C – 27,63; H – 3,48; N – 4,25;
calculat, %: C – 27,92; H – 3,68; N – 4,65; M – 301,11.

15

(57) Revendicare:

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C care conține KH₂PO₄, CaCl₂, KCl, MgSO₄·7H₂O, NaNO₃, FeCl₃·6H₂O, extract de porumb, un compus coordinativ conținând glicină și apă distilată, având pH-ul 4,5...5,5, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține paie de porumb, iar în calitate de compus coordinativ se utilizează MoO₂(acac)₂Gly, ingredientele fiind luate în următorul raport, g/L:

	KH ₂ PO ₄	1,0
	CaCl ₂	0,1
	KCl	0,1
25	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
	NaNO ₃	2,5
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,01
	MoO ₂ (acac) ₂ Gly	0,015
	extract de porumb	15,0
30	paie de porumb	40,0
	apă distilată	restul.

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 2588 G2 2004.10.31
2. MD 2747 G2 2005.04.30

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2006 0123		
(22) Data depozit: 2006.04.13		
(51) : Int.Cl: <i>C12N 1/14</i> (2006.01) <i>C12N 9/42</i> (2006.01) <i>C12N 1/38</i> (2006.01) <i>C12R 1/80</i> (2006.01) Titlul : Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi <i>Penicillium expansum</i> CNMN FD 05 C. (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : Mediu nutritiv, tulpina de fungi <i>Penicillium expansum</i> CNMN FD 05 C, ?-glicozidază		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7)		
(MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nepublică”) MD 1993-2006; EA 1996-2006; SU-colecția BRTȘ		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 2588 G2 2004.10.31	1
A	MD 2747 G2 2005.04.30	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 evidență 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		2006.12.14
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4