



MD 2747 G2 2005.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **2747** <sup>(13)</sup> **G2**  
(51) **Int. Cl.<sup>7</sup>**: C 12 N 1/14, 1/38,  
(C 12 N 1/14,  
C 12 R 1:80) //  
C 12 N 9/42

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) <b>Nr. depozit:</b> a 2004 0228<br>(22) <b>Data depozit:</b> 2004.09.16                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | (45) <b>Data publicării hotărârii de<br/>acordare a brevetului:</b><br>2005.04.30, BOPI nr. 4/2005 |
| (71) <b>Solicitant:</b> INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII<br>MOLDOVA, MD<br>(72) <b>Inventatori:</b> DESEATNIC Alexandra, MD; PAȘA Lilia, MD; BOLOGA Olga, MD; TIURIN Jana, MD;<br>LABLIUC Svetlana, MD; GĂRBĂLĂU Nicolae, MD; RUDIC Valeriu, MD<br>(73) <b>Titular:</b> INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII<br>MOLDOVA, MD |                                                                                                    |

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

(57) **Rezumat:**

1  
Invenția se referă la microbiologie, în particular  
la mediile de cultivare a tulpinii de fungi  
*Penicillium expansum* CNMN FD 05 C, producă-  
toare de celulaze și poate fi aplicată pentru obținerea  
preparatelor celulozolitice, utilizate în industriile  
alimentară, eterooleaginoasă, textilă, farmaceutică.

Mediul nutritiv conține, în g/L de apă: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
-1,0; CaCl<sub>2</sub> - 0,1; KCl - 0,1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,3;

2  
NaNO<sub>3</sub> - 2,5; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O - 0,01; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>·Gly -  
0,010...0,015; celuloză microcristalină - 10,0 și  
5 extract de porumb - 15,0; pH-ul fiind 4,5.

Rezultatul constă în sporirea conținutului de  
endoglucanaze, celobiohidrolaze și β-glucozidaze  
în preparatele celulozolitice.

Revendicări: 1

10

MD 2747 G2 2005.04.30

## MD 2747 G2 2005.04.30

3

### Descriere:

Invenția se referă la microbiologie, în particular la mediile de cultivare a tulpinii de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C producătoare de celuloze și poate fi aplicată pentru obținerea preparatelor celulozolitice, utilizate în industriile textilă, alimentară, eterooleaginoasă, farmaceutică.

5 Pentru cultivarea enzimelor celulozolitice cele mai utilizate sunt mediile modificate Czapek, Omleansch, Reese, Ghetcinson, la care se adaugă anumite surse de carbon (celuloză microcristalină, hârtie de filtru, diferite deșeuri vegetale), biostimulatori etc.

În calitate de cea mai apropiată soluție servește mediul cu următoarea componență (g):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1;  $\text{KCl}$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,01; celuloză microcristalină – 10,0; extract de porumb – 15,0; apă distilată – 1 L, pH – 5,5, pe care tulpina fiind cultivată submers în baloane Erlenmayer de 0,5 L la temperatura de 28...30°C, pe agitator rotativ (180 rot/min), timp de 68 ore, atinge următorii indici ai activității celulozolitice: 42,43  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  endoglucanaze, 2,07  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  celobiohidrolaze și 4,08  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\beta$ -glucozidaze [1].

Dezavantajul mediului utilizat constă în aceea că el nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al tulpinii.

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 componentelor complexului celular: endoglucanaze, celobiohidrolaze,  $\beta$ -glucozidaze.

20 Problema pusă se soluționează prin aceea că a fost creat un mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C, care pe lângă componentele mediului din cea mai apropiată soluție mai conține  $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3 \cdot \text{Gly}$ , raportul cantitativ al ingredientelor fiind (g):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1;  $\text{KCl}$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3 \cdot \text{Gly}$  – 0,01...0,015; celuloză microcristalină – 10,0; extract de porumb – 15,0; apă distilată – 1 L, pH – 4,5.

25 Rezultatul invenției constă în asigurarea posibilității de obținere a unor preparate enzimatice celulozolitice cu conținut sporit de endoglucanaze, celobiohidrolaze și  $\beta$ -glucozidaze.

Exemple de realizare a invenției

#### Exemplul 1

30 Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C s-a cultivat în baloane Erlenmayer de 0,5 L cu 0,1 L de mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (180 rot/min), la temperatura de 28°C, timp de 168 ore. Compoziția mediului (g):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{KCl}$  – 0,1;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3 \cdot \text{Gly}$  – 0,01; celuloză microcristalină – 10,0; extract de porumb – 15,0; apă distilată – 1 L; pH – 4,5. Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și  $\beta$ -glucozidazică s-au determinat prin dozarea zaharurilor reducătoare (metoda Somogy - Nelson) în urma acțiunii lichidului cultural asupra substratelor specifice: Na-carboximetilceluloză, hârtie de filtru și p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranozid și în varianta propusă au avut valorile 55,76, 1,84 și, respectiv, 4,4  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , observandu-se majorarea activității endoglucanazice cu 41,38% față de valorile obținute la cultivarea tulpinii în aceleași condiții pe mediul din cea mai apropiată soluție. Datele obținute sunt incluse în tabel.

#### Exemplul 2

45 Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C s-a cultivat în baloane Erlenmayer de 0,5 L cu 0,1 L de mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (180 rot/min), la temperatura de 28°C, timp de 168 ore. Compoziția mediului (g):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{KCl}$  – 0,1;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3 \cdot \text{Gly}$  – 0,015; celuloză microcristalină – 10,0; extract de porumb – 15,0; apă distilată – 1 L; pH – 4,5.

50 Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și  $\beta$ -glucozidazică au avut valorile 40,8, 2,6 și, respectiv, 5,91  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Astfel activitatea celobiohidrolazică față de datele din cea mai apropiată soluție sporește cu 39,04%, iar cea  $\beta$ -glucozidazică cu 43,45% pe fondul practic nemodificat al activității endoglucanazice. Datele obținute sunt incluse în tabel.

| Concentrația<br>( $\text{NH}_4)_2\text{VO}_3 \cdot \text{Gly}$ , g·L <sup>-1</sup> | Activitatea, U·mL <sup>-1</sup> |                    |                        |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------|------------------------|
|                                                                                    | endoglucanazică                 | celobiohidrolazică | $\beta$ -glucozidazică |
| 0,01                                                                               | 55,76                           | 1,84               | 4,40                   |
| 0,015                                                                              | 40,80                           | 2,60               | 5,91                   |
| Cea mai apropiată soluție                                                          | 39,44                           | 1,87               | 4,12                   |

## MD 2747 G2 2005.04.30

4

- Metoda obținerii combinației  $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3 \cdot \text{Gly}$ : 0,2 g (0,01 moli) de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  se dizolvă în 20 mL de metanol la încălzire, se adaugă 10 mL de soluție ce conține 0,07 g (0,001 moli) de glicină în  $\text{H}_2\text{O}$ . Amestecul se încălzește timp de 5 minute la temperatura de 40°C. La răcirea lentă  $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3 \cdot \text{Gly}$  se sedimentează sub formă de cristale mărunte de culoare galbenă-cafenie. Randamentul – 45%.
- 5 Substanța este solubilă în apă, alcool metilic și etilic.
- Pentru  $\text{C}_2\text{H}_{13}\text{VN}_3\text{O}_5$  determinat, %: C – 10,76; H – 4,87; N – 1,85, calculat, %: C – 27,90; H – 4,29; N – 4,62.

10

### (57) Revendicare:

- Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C care conține  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , KCl,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , celuloză microcristalină, extract de porumb și apă, având pH-ul inițial 4,5, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține
- 15  $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3 \cdot \text{Gly}$ , ingredientele fiind luate în următorul raport, g/L:

|    |                                               |               |
|----|-----------------------------------------------|---------------|
|    | $\text{KH}_2\text{PO}_4$                      | 1,0           |
|    | $\text{CaCl}_2$                               | 0,1           |
|    | KCl                                           | 0,1           |
| 20 | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$     | 0,3           |
|    | $\text{NaNO}_3$                               | 2,5           |
|    | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$     | 0,01          |
|    | $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3 \cdot \text{Gly}$ | 0,010...0,015 |
|    | celuloză microcristalină                      | 10,0          |
| 25 | extract de porumb                             | 15,0.         |

### (56) Referințe bibliografice:

1. MD 2588 F1 2004.10.31

Director Departament:

CRECETOV Veaceslav

Examinator:

GUȘAN Ala

Redactor:

LOZOVANU Maria

## RAPORT DE DOCUMENTARE

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) Nr. depozit: a 2004 0228                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | (85) Data fazei naționale PCT:                                                                                                                                                                                                                                               |
| (22) Data depozit: 2004.09.16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | (86) Cerere internațională PCT:                                                                                                                                                                                                                                              |
| Prioritatea invocată :<br>(31) nr.:            32) data :            33) țara :<br>(51) <sup>7</sup> : C 12 N 1/14, 1/38 , (C 12 N 1/14, C 12 R 1:80) // C 12 N 9/42<br>Alți indici de clasificare:<br><b>Titlul</b> : Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi <i>Penicillium expansum</i> CNMN FD 05 C<br>(71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD<br>Termeni caracteristici :<br>mediu nutritiv, tulpină de fungi, <i>Penicillium expansum</i> |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| MD 1994-2004, EA 1996-2004, SU 1970-1994<br>Int. Cl. <sup>7</sup> C 12 N 1/14, 1/38 , (C 12 N 1/14, C 12 R 1:80) // C 12 N 9/42                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| II. Documente considerate ca relevante                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Categoria*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente                                                                                                                                                                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | MD 2588 F1 2004.10.31                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Numărul revendicării vizate                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 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:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| A - document care definește stadiul anterior general                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate                                                                                                                                                                                          |
| E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 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                                                     |
| 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)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă                                                                                                                                                    |
| O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 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 |
| & - document care face parte din aceeași familie de documente                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Data finalizării documentării                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 10.02.2005                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Examinatorul                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Ala Gușan                                                                                                                                                                                                                                                                    |