



MD 3516 G2 2008.02.29

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3516** (13) **G2**  
(51) Int. Cl.: *C12N 1/16* (2006.01)  
*C12N 13/00* (2006.01)  
*C12P 23/00* (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2007 0130 (22) Data depozit: 2007.05.08</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2008.02.29, BOPI nr. 2/2008</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: USATÎI Agafia, MD; MOLODOI Elena, MD; CHIRIȚA Elena, MD; MOLDOVEANU Taisia, MD; BORISOVA Tamara, MD; GHIȚU Dumitru, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) **Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03**

(57) **Rezumat:**

1  
Invenția se referă la biotehnologie, în special la cultivarea submersă a tulpinii de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea pigmentilor carotinoidici.

Procedeu, conform invenției, include creșterea culturii de drojdie pe maț-agar, tratarea culturii de drojdie cu unde milimetrice de intensitate joasă cu  $\lambda=5,6$  mm emise în regim periodic timp de 15...20 min, pregătirea suspensiei de spori prin spălarea culturii de drojdie cu apă distilată, pregătirea inoculului prin cultivarea suspensiei de spori pe must de bere timp de 72 de ore și introducerea inoculului în cantitatea de 5% vol. în mediul nutritiv care conține, g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,0; NaCl - 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5;  $\text{CaCl}_2$  - 1,0;  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  -

2  
0,00003; glicerină - 40,0; melasă - 20,0; ulei de porumb - 1,0; apă potabilă până la 1 L și cultivarea submersă în condiții de agitare continuă, iluminare de 12...15 mii erg/cm<sup>2</sup>, temperatură de 25...27°C, timp de 96 ore.

5  
10 Rezultatul constă în sporirea conținutului de pigmenti carotinoidici și în micșorarea duratei de cultivare.

15  
Revendicări: 1

MD 3516 G2 2008.02.29

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologie, în special la cultivarea submersă a tulpinii de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea pigmentilor carotenoidici.

5 Este cunoscut procedeul de cultivare submersă a tulpinilor de drojdie producătoare de carotenoide în medii care conțin inductorii sau precursorii ai biosintezei carotenoidelor (acid citric, uleiuri vegetale, extracte din șroturi de tomate, mere, poamă) [1].

Neajunsul procedurii constă în creșterea redusă a celulelor microbiene și conținutul mic de carotenoide.

10 Analogul cel mai apropiat al procedurii revendicate este procedeul de cultivare submersă a tulpinii de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 ce include etapele: pregătirea materialului semincer prin spălarea cu apă distilată a culturii crescute pe malț-agar, cultivarea submersă timp de 72 ore, înșămânțarea mediului nutritiv steril cu următoarea componență, g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0; NaCl – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{CaCl}_2$  – 1,0;  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,00003 (urme); glicerină – 40,0; melasă – 20,0; ulei de porumb – 1,0; apă potabilă până la 1 L ; pH-ul inițial al mediului – 5,5. Cultivarea se efectuează în condiții de agitare continuă pe un agitator rotativ (180...200 rot/min), în baloane Erlenmayer cu capacitate de 1,0 l, la temperatura de +25...+27°C, iluminare 12...15 mii  $\text{erg/cm}^2$ , durata cultivării – 120 ore [2].

La cultivarea tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 în condiții proximale, conținutul de carotenoide constituie  $461,4 \pm 6,4$  mkg/g B.U.

20 Dezavantajul procedurii cunoscute constă în aceea că nu se realizează pe deplin potențialul capacității biosintetice - biosinteza pigmentilor carotenoidici nu atinge valoarea maximă.

Problema pe care o rezolvă prezentul procedeu de cultivare submersă a tulpinii de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 constă în sporirea capacității biosintetice a producătorului și micșorarea timpului de cultivare.

25 Esența invenției constă în aceea că procedeul include creșterea culturii de drojdie pe malț-agar, tratarea culturii de drojdie cu unde milimetrice de intensitate joasă cu  $\lambda=5,6$  mm emise în regim periodic timp de 15...20 min, pregătirea suspensiei de spori prin spălarea culturii de drojdie cu apă distilată, pregătirea inoculului prin cultivarea suspensiei de spori pe must de bere timp de 72 de ore și introducerea inoculului în cantitatea de 5% vol. în mediul nutritiv care conține, g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0; NaCl – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{CaCl}_2$  – 1,0;  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,00003; glicerină – 40,0; melasă – 20,0; ulei de porumb – 1,0; apă potabilă până la 1 L și cultivarea submersă în condiții de agitare continuă, iluminare de 12...15 mii  $\text{erg/cm}^2$ , temperatură de 25...27°C, timp de 96 ore.

Conținutul de carotenoide în biomasa drojdiei *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03, la cultivarea submersă în condiții proximale și conform procedurii elaborate este reprezentat în tabel.

35 Rezultatul constă în sporirea conținutului de pigmenți carotenoidici și în micșorarea duratei de cultivare.

Exemple de realizare a invenției.

40 Exemplul 1. Materialul semincer (cultura de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 crescută pe malț-agar) este supus acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă (cu  $\lambda=5,6$  mm) emise în regim periodic timp de 20 min. După iradiere se pregătește suspensia de spori prin spălarea cu apă distilată sterilă și obținerea inoculului prin cultivare submersă în must de bere timp de 72 ore. Ulterior, inoculul, în cantitate de 5% vol., se transferă în mediul nutritiv steril cu următoarea compoziție, g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0; NaCl – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{CaCl}_2$  – 1,0;  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,00003; glicerină – 40,0; melasă – 20,0; ulei de porumb – 1,0; apă potabilă până la 1L; pH-ul inițial al mediului – 5,5. Cultivarea se efectuează în profunzime, în condiții de agitare continuă pe un agitator rotativ (180...200 rot/min), în baloane Erlenmayer cu o capacitate de 1,0 L, la temperatura de 25...27°C, iluminare de 12...15 mii  $\text{erg/cm}^2$ , durata cultivării – 96 ore.

Conținutul de carotenoide în biomasa drojdiei constituie  $620,5 \pm 22,1$  mkg/g B.U., ceea ce depășește cu 34,5% conținutul fixat la cultivarea tulpinii în condiții proximale.

50 Exemplul 2. Materialul semincer (cultura de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 crescută pe malț-agar), este supus acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă (cu  $\lambda=5,6$  mm) emise în regim periodic timp de 15 min. După iradiere se pregătește suspensia de spori prin spălarea cu apă distilată sterilă și obținerea inoculului prin cultivare submersă în must de bere timp de 72 ore. Ulterior, inoculul, în cantitate de 5% vol., se transferă în mediul nutritiv steril cu următoarea compoziție, g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0; NaCl – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{CaCl}_2$  – 1,0;  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,00003; glicerină – 40,0; melasă – 20,0; ulei de porumb – 1,0; apă potabilă până la 1L; pH-ul inițial al mediului – 5,5. Cultivarea se efectuează în profunzime în condiții de agitare continuă pe un agitator rotativ (180...200 rot/min), în baloane Erlenmayer cu o capacitate de 1,0 L, la temperatura de 25...27°C, iluminare de 12...15 mii  $\text{erg/cm}^2$ , durata cultivării – 96 ore.

## MD 3516 G2 2008.02.29

4

Conținutul de carotenoide în biomasa drojdiei constituie  $623,9 \pm 64,8$  mkg/g B.U., ceea ce depășește cu 35,2% conținutul fixat la cultivarea tulpinii în condiții proximale.

5 Influența undelor milimetrice de intensitate joasă asupra conținutului de carotenoide la cultivarea tulpinii de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03

Variante	Durata de iradiere, min	Conținutul de carotenoide, mkg/g B.U., $X \pm xS$	% față de martor	Spor, %
Procedeu revendicat	5	$521,12 \pm 4,93$	112,9	12,9
	10	$534,82 \pm 55,16$	115,9	15,9
	15	$623,97 \pm 64,83$	135,2	<b>35,2</b>
	20	$620,51 \pm 22,11$	134,5	<b>34,5</b>
	30	$575,13 \pm 44,08$	124,6	24,6
	60	$587,22 \pm 6,19$	127,2	27,2
Cea mai apropiată soluție **		$461,45 \pm 56,43$	100	-

\*Cultura de drojdie iradiată cu unde milimetrice de intensitate joasă.

\*\*Cultura de drojdie neiradiată cu unde milimetrice de intensitate joasă.

10  $X \pm xS$  – indică valoarea medie și eroarea.

### (57) Revendicare:

15 Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 care include creșterea culturii de drojdie pe malț-agar, tratarea culturii de drojdie cu unde milimetrice de intensitate joasă cu  $\lambda=5,6$  mm emise în regim periodic timp de 15...20 min, pregătirea suspensiei de spori prin spălarea culturii de drojdie cu apă distilată, pregătirea inoculului prin cultivarea suspensiei de spori pe must de bere timp de 72 de ore, introducerea inoculului în cantitate de 5% vol. în mediul nutritiv, care conține, g/L:  $KH_2PO_4$  – 1,0; NaCl – 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,5;  $CaCl_2$  – 1,0;  $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,00003; glicerină – 40,0; melasă – 20,0; ulei de porumb – 1,0; apă potabilă până la 1 L și cultivarea submersă în condiții de agitare continuă, iluminare de 12...15 mii erg/cm<sup>2</sup>, temperatură de 25...27 °C, timp de 96 de ore.

25

### (56) Referințe bibliografice:

1. Феофилова Е.П. Каротиноиды грибов: биологические функции и практическое использование. Прикладная биохимия и микробиология, 1994, вып. 30, № 2, с.181-195.
2. Chirița Elena. Sinteza orientată a carotinoizilor de către drojdiile și perspectiva utilizării lor. Autoreferat al tezei de doctor în biologie. Chișinău, 2005, p.7

Șef Secție: COLESNIC Inesa

Examinator: GORDIENCO Maria

Redactor: UNGUREANU Mihail