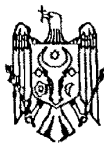




MD 4843 B1 2023.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4843** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
C07D 213/79 (2006.01)
C07F 15/06 (2006.01)
C07F 3/00 (2006.01)
A01G 18/20 (2018.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2021 0060 (22) Data depozit: 2021.09.09	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2023.01.31, BOPI nr. 1/2023
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE, MD	
(72) Inventatori: CILOCI Alexandra, MD; DVORNINA Elena, MD; RUDIC Valeriu, MD; BULHAC Ion, MD; URECHE Dumitru, MD; COCU Maria, MD	
(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE, MD	

(54) **Procedeu de cultivare submersă a tulpinii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la cultivarea submersă a tulpinii de funghi *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01, producătoare de biomasă care poate fi utilizată pentru fabricarea preparatelor medicamentoase cu proprietăți curative și nutraceutice.

Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de funghi *Lentinus edodes* (Berk) Sing CNMN-FB-01 prevede inocularea materialului semincer în cantitate de 10% v/v pe mediul nutritiv, care conține, g/L: NH_4NO_3 0,20,

2
 KH_2PO_4 1,30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,35, tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di- μ -(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II) 0,005-0,015, malț de 5° Balling restul, și cultivarea la agitare continuă la temperatura de 28-30°C în decurs de 144 de ore.

Rezultatul tehnic al invenției constă în reducerea ciclului de cultivare cu 48 de ore și sporirea producției de biomasă.

Revendicări: 1

MD 4843 B1 2023.01.31

(54) Method for submerged cultivation of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01 fungi strain

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, namely to the submerged cultivation of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01 fungi strain, producer of biomass that can be used for producing medicinal preparations with curative and nutraceutical properties.

The method for submerged cultivation of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01 fungi strain provides for the inoculation of seed material in the amount of 10% v/v into a nutrient medium, containing, g/L: NH_4NO_3 0.20, KH_2PO_4 1.30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.35,

2
tris(2,6-dimethyl pyridinedicarboxylate-1kONO)-di- μ -(isothiocyanato-1.2kN)-(diisocyanato-2kN)barium(II)cobalt(II) 0.005-0.015, beer wort 5° Balling the rest, and cultivation with continuous stirring at a temperature of 28-30°C for 144 hours.

The technical result of the invention consists in reducing the duration of cultivation by 48 hours and increasing the production of biomass.

Claims: 1

(54) Способ глубинного культивирования штамма *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к глубинному культивированию штамма грибов *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01, производителя биомассы, которая может быть использована для получения лекарственных препаратов с лечебными и нутрацевтическими свойствами.

Способ глубинного культивирования штамма грибов *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01 предусматривает инокуляцию семенного материала в количестве 10% об./об. в питательную среду, которая содержит, г/л: NH_4NO_3 0,20, KH_2PO_4 1,30,

2
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,35, трис(2,6-диметил пиридиндикарбоксилат-1kONO)-ди- μ -(изотиоцианато-1,2kN)-(диизоцианато-2kN)барий(II)кобальт(II) 0,005-0,015, пивное сусло 5° Баллинга остальное, и культивирование при непрерывном перемешивании при температуре 28-30°C в течение 144 часов.

Технический результат изобретения состоит в сокращении продолжительности культивирования на 48 часов и повышении производства биомассы.

II. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la cultivarea submersă a tulpinii de funghi *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01, producătoare de biomasă care poate fi utilizată pentru fabricarea preparatelor medicamentoase cu proprietăți curative și nutraceutice.

Bazidiomicetele se referă la obiecte micologice de perspectivă pentru cultivarea în profunzime în calitate de sursă suplimentară de proteine și substanțe bioactive valoroase.

Totodată, funghi *Lentinus edodes* se caracterizează prin viteză mică de creștere, fapt ce provoacă scăderea productivității culturii ca urmare a asimilării neefective a substratului. Pentru elaborarea tehnologiilor intensive de cultivare și sporire a productivității sunt necesare cercetări de stabilire a particularităților fiziologice ale speciei în raport cu diverși biostimulatori specifici de diferită origine (Усачёва Р. В. Физиолого-биохимические особенности некоторых штаммов культивируемого гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Дисс. кбн, Воронеж, 2003).

În ultimele decenii în scopul modificării biosintezei substanțelor bioactive la microorganisme intensiv se studiază compușii coordinați ai elementelor 3d, dintre care unii, alături de sporirea biosintezei principiilor bioactive manifestă și capacitate de intensificare (accelerare) a proceselor biosintetice exprimate în reducerea ciclului de dezvoltare a microorganismului (MD 2837 G2 2005.08.31).

Este cunoscut procedeul de obținere a masei miceliale la cultivarea diferitor variante ale speciei *Lentinus edodes* pe medii ce conțin în calitate de stimulatori ai sintezei biomasei tărâțe și melasă, și, selectiv, săruri minerale [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în calitatea nesatisfăcătoare a biomasei, în particular, aromă slab pronunțată de ciuperci, perioada lungă de cultivare 10-13 zile.

Mai este cunoscut procedeul de obținere a biomasei miceliale la cultivarea ciupercii *Lentinus edodes* timp de 8-10 zile pe medii ce conțin în calitate de stimulatori ai sintezei biomasei must de bere (4° Balling) la pH 5,0-6,0 [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în cantitatea mică de biomasă sintetizată - 10 g/L. Maxima biosintezei (10 g/L) se atinge în ziua a 7-a de cultivare. Procesul de acumulare a biomasei este însoțit de scăderea pH-ului mediului până la valoarea 3,0-3,05, ceea ce inhibă creșterea activă a culturii, provocând "îmbătrânirea" ei. În aceste condiții continuarea cultivării până la 8-10 zile nu este oportună, deoarece la pH-ul 3,0 acumularea biomasei nu are loc și cultura trece în faza staționară.

Cea mai apropiată soluție după esența tehnică și rezultatul obținut este procedeul de cultivare a tulpinii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01, utilizată în calitate de produs alimentar, care se realizează timp de 8-10 zile, pe un mediu nutritiv ce conține ca ingrediente de bază must de bere, melasă, ulei de floarea soarelui. Temperatura de cultivare este de 20-27°C, pH inițial 5,0-5,5. Cantitatea maximală de biomasă acumulată în condițiile soluției proximale constituie 22,4 g/L [3].

Dezavantajul procedurii constă în durata lungă de cultivare - 10 zile, instabilitatea manifestării maxime de biosinteză la 8-10 zile, iar în condițiile nutritive simplificate de mediu potențialul de sinteză intensivă a biomasei miceliale a producătorului se realizează parțial.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în reducerea duratei de cultivare a bazidiomicetei *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01 cu asigurarea unui nivel înalt de sinteză a biomasei miceliale.

Problema este rezolvată prin procedeul de cultivare submersă a tulpinii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-F-01, care constă în obținerea materialului semincer, inocularea lui în cantitate de 10% v/v pe un mediu nutritiv, care conține, g/L: NH₄NO₃ 0,20, KH₂PO₄ 1,30, MgSO₄·7H₂O 0,35, tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di-μ-(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II) 0,005-0,015, malț de 5° Balling restul, pH inițial 5,0-5,5, și cultivarea la agitare continuă la 180-200 rot/min la temperatura de 25-28°C în decurs de 144 de ore.

Rezultatul tehnic al invenției constă în reducerea ciclului de cultivare a tulpinii de bazidiomicete *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01 cu 48 de ore: 144 ore în varianta experimentală față de 192 ore în varianta proximă (în lipsa compusului coordinațiiv) și sporirea producției de biomasă micelială cu 35,7-38, 2% față de varianta proximă.

Rezultatele obținute pot fi condiționate de îmbogățirea mediului nutritiv cu cationi bivalenți ai metalelor cu rol biologic semnificativ pentru dezvoltarea microorganismelor (Co²⁺, Ba²⁺).

Avantajele invenției:

- Biomasa se obține la etapa creșterii vegetale a miceliului ce permite în termen redus obținerea unui produs standard calitativ la nivelul produsului din corpi fructiferi.
- Obținerea unei cantități sporite de biomasă micelială valoroasă de *Lentinus edodes* cu spectru larg de activitate biologică.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Materialul semincer (miaua) se obține la cultivarea în profunzime pe mediul nutritiv de bază timp de 8-10 zile a miceliului tulpinii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01 de 20 de zile crescut pe suprafețe înclinate de malț-agar.

Se prepară mediul nutritiv cu compoziția, g: NH_4NO_3 - 0,20; KH_2PO_4 - 1,30; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,35, malț de 5° Balling până la 1L, pH-ul 5,0-5,5.

Mediul pregătit se repartizează a câte 200 ml în colbe Erlenmeyer cu volumul de 0,75 L. După sterilizare (1 oră, 1 atm.) și răcire până la temperatura de cameră, mediul se inoculează cu miaua obținută preventiv în raport de 10% v/v. Cultivarea se realizează în condiții de agitare continuă (200 rot. min^{-1}), timp de 8 zile, la temperatura de 28°C.

Soluția apoasă a compusului coordinativ tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di- μ -(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II) cu formula $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$, unde L reprezintă esterul dimetilic al acidului 2,6-piridindicarboxilic, cu concentrații de 0,0025, 0,005, 0,010 și 0,015 g/L, prealabil tratată în baie cu ultrasunet tipul DA-96 DADI timp de 1-2 minute până la dizolvare completă, se adăunează la mediul de cultivare steril simultan cu materialul de inoculare. Biomasa micelială sintetizată se separă din lichidul cultural prin filtrare mecanică. Masa uscată de miceliu sintetizat s-a determină prin cântărire. Monitorizarea biomasei s-a efectuat în dinamică pe parcursul zilelor a 6-a, a7-a și a 8-a de cultivare, perioadă în care cultura la cultivare clasică manifestă maxima de biosinteză (Tabel).

Tabel

Influența compusului coordinativ tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di- μ -(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II) asupra acumulării biomasei

Variante	Concen., g/L	Ziua a 6-a		Ziua a 8-a	
		g/L	%/martor**	g/L	%/martor
Procedeul revendicat	0,0025	24,27	118,8	23,67	115,7
	0,005	28,15	137,6	25,23	123,3
	0,010	27,76	135,7	24,98	122,1
	0,015	27,13	132,6	24,70	120,7
Soluția proximă*		17,32	100	20,46	100

*Mediul nutritiv, g/L: must de bere 270-320; melasă 50-70; ulei de floarea soarelui 0,5-1,5; apă restul, pH inițial 4,5-5,0.

**Calculule sunt efectuate față de maxima soluției proximale (ziua a 8-a).

Procedeul de obținere a compusului tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di- μ -(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II):

Tiocianatul de bariu dihidrat cu masa de 0,08 g (0,025 mmoli) și tiocianatul de cobalt trihidrat cu masa de 0,06 g (0,025 mmoli) s-au dizolvat în 7 mL de metanol (soluția 1). 2,6-piridindicarbonildiclorura cu masa de 0,16 g (0,075 mmoli) s-a dizolvat în 15 mL de metanol (soluția 2) (raportul molar $\text{Ba}^{2+}:\text{Co}^{2+}:2,6\text{-piridindicarbonildiclorur}$ este 1:1:3). La agitare permanentă soluția 1 se adaugă la soluția 2, după care soluția obținută de culoare albastră a fost refluxată timp de 3 ore. După refluxare, soluția a fost filtrată și lăsată la temperatura camerei pentru cristalizare. În două zile, în soluția filtrată s-au format cristale albastre sub forma unor prisme. Randamentul constituie 43% (0,11 g).

Găsit, %: C 36,75; H 2,76; Ba 13,51; Co 5,84; N 9,74.

Pentru $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{BaCoN}_7\text{O}_{12}\text{S}_4$ calculat, %: C 36,71; H 2,68; Ba 13,54; Co 5,81; N 9,67.

Nivelul maximal de biomasă micelială în varianta experimentală s-a marcat în ziua a 6-a de cultivare și a constituit 28,15 g/L la concentrația complexului $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$ de 0,005g/L și 27,76 g/L la concentrația de 0,010 g/L, depășind maxima soluției proximale (20,46 g/L în ziua a 8-a de cultivare) cu 37,6% și, respectiv, 35,7%.

Exemplul 2

Tulpina *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01 se cultivă în colbe Erlenmeyer cu capacitate de 0,5 L cu 100 mL de mediu nutritiv în restul condițiilor egale exemplului 1.

5 Nivelul maximal de biomasă micelială în varianta experimentală s-a marcat în ziua a 6-a de cultivare a producătorului și a constituit 29,30 g/L la concentrația complexului $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$ de 0,005 g/L și 28,70 g/L la concentrația de 0,010 g/L, depășind maxima soluției proxime (21,2 g/L în ziua a 8-a de cultivare) cu 38,2% și, respectiv, 35,4%.

10 Cercetările au fost efectuate în cadrul proiectului 20.80009.5007.28 din Programul de Stat 2020-2023 al Rep. Moldova cu finanțarea de către ANCD.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Коробан Л.П., Дворнина А.А. Получение жидкого инокулюма гриба шиитаке *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. методом глубинного культивирования. Депонированные научные работы ВИНТИ РАН, Москва, 1998, № 12, p. 48
2. Соломко С. Ф., Митропольская Н.Ю. Получение посевного материала *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. глубинным методом. Микология и фитопатология, 1944, nr. 3, p. 34-39
3. MD 2171 F1 2003.05.31

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare submersă a tulpinii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-F-01, care constă în obținerea materialului semincer la cultivarea în profunzime pe mediu nutritiv de bază timp de 8-10 zile a miceliului de *L. edodes* de 20 de zile crescut pe suprafețe înclinate de malț-agar, inocularea materialului semincer în cantitate de 10% v/v pe un mediu nutritiv, care conține, g/L: azotat de amoniu (NH_4NO_3) 0,20, monofosfat de potasiu (KH_2PO_4) 1,30, sulfat de magneziu ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,35, tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di- μ -(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II) 0,005-0,015, malț de 5° Balling restul, pH inițial 5,0-5,5, și cultivarea la agitare continuă la 180-200 rot/min la temperatura de 28-30°C în decurs de 144 de ore.