



MD 1987 F1 2002.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1987 (13) F1
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/14;
C 12 R 1/645

(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 2000 0158 (22) Data depozit: 2000.09.22	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2002.08.31, BOPI nr. 8/2002
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: DESEATNIC Alexandra, MD; TIURIN Jana, MD; LABLIUC Svetlana, MD; RUDIC Valeriu, MD; CEAPURINA Ludmila, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D* (variante)

(57) Rezumat:

1 Invenția se referă la biotehnologie, în particular, la mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D* - producător de enzime hidrolitice și poate fi utilizată în industriile microbiologică, alimentară, eterooleaginoasă și farmaceutică.

Esența invenției constă în aceea că se propun 3 variante ale mediilor nutritive de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, care conțin coarde de viță de vie, borhot de sfeclă,

5 melasă, MgSO₄, NaNO₃, FeSO₄ · 7H₂O și apă de robinet.

10 Noutatea invenției constă în aceea că în calitate de stimulatori de creștere mediile suplimentar conțin compușii coordinați: Zn(D-Ser)₂, Zn(D-Ala)₂, Zn(L-Ala)₂.

Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei β-glucozidazelor și xilanazelor.

Revendicări: 3

MD 1987 F1 2002.08.31

3

Descriere:

5 Invenția se referă la biotehnologii microbiologice, în particular, la mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D – producător de enzime lipolitice folosite la dezintegrarea țesuturilor vegetale, și poate fi utilizată în industriile microbiologică, alimentară, eterooleaginoasă, farmaceutică.

10 Pentru obținerea enzimelor hidrolitice este cunoscut mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D cu următoarea compoziție (g): coarde de viță de vie – 10,0; MgSO₄ – 0,5; NaNO₃ – 3,0; KCl – 0,5; FeSO₄ · 7H₂O – 0,01; melasă – 10,0; apă de robinet până la 1,0 L; pH inițial – 4,5-5,0 [1].

10 Dezavantajul acestui mediu constă în randamentul scăzut al unor componente ale complexului enzimatic hidrolitic (β-glucozidaze – 0,31 U/ml și xilanaze – 3,37 U/ml), sintetizat de tulpina de funghi *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D, care nu asigură realizarea deplină a potențialului ei biosintetic.

15 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv de cultivare care să asigure sporirea capacității biosintetice a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D, în special sporirea biosintezei β-glucozidazelor și xilanazelor - componente importante ale complexului enzimatic hidrolitic în vederea dezintegrării profunde a materialelor vegetale.

20 Esența invenției constă în faptul că se propune un mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D, (variante), care conține coarde de viță de vie uscate și mărunțite, borhot de sfeclă uscat și mărunțit, melasă, sulfat de magneziu (MgSO₄), azotat de sodiu (NaNO₃), clorură de potasiu (KCl), sulfat de fier hidrat (FeSO₄ · 7H₂O), apă de robinet, în care suplimentar, în calitate de stimulatori ai biosintezei β-glucozidazelor și xilanazelor se adaugă unul din compușii coordinați ai Zn(II) cu aminoacizi, la concret:

Varianta 1: compusul coordinațiv Zn(D-Ser)₂ – în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde de viță de vie	– 10,0
Borhot de sfeclă	– 10,0
Melasă	– 10,0
MgSO ₄	– 0,5
NaNO ₃	– 3,0
KCl	– 0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	– 0,01
Zn(D-Ser) ₂	– 0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

25 Varianta 2: compusul coordinațiv Zn(L-Ala)₂ – în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde de viță de vie	– 10,0
Borhot de sfeclă	– 10,0
Melasă	– 10,0
MgSO ₄	– 0,5
NaNO ₃	– 3,0
KCl	– 0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	– 0,01
Zn(L-Ala) ₂	– 0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

Varianta 3: compusul coordinațiv Zn(D-Ala)₂ – în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde de viță de vie	– 10,0
Borhot de sfeclă	– 10,0
Melasă	– 10,0
MgSO ₄	– 0,5
NaNO ₃	– 3,0
KCl	– 0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	– 0,01
Zn(D-Ala) ₂	– 0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

Rezultatul invenției constă în sporirea productivității biosintezei β-glucozidazelor cu 49,67...65,91% și a xilanazelor cu 52,22...64,98% față de cea mai apropiată soluție.

MD 1987 F1 2002.08.31

4

Pe lângă aceasta invenția mai prezintă și următoarele avantaje: posibilitatea sintezei orientate a complexului enzimatic hidrolitic cu compoziție programată în concordanță cu componența materialului supus hidrolizei; posibilitatea utilizării a 3 variante de medii nutritive echivalente după efect pentru cultivarea tulpinii de fungi *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D.

- 5 Efectul biostimulator este condiționat de însușirea elementelor chimice indispensabile care intră în compoziția compușilor coordinativi: Zn(II), aminoacizii, de a regla metabolismul microorganismelor (Дедюхина Э.Г., Ерошин В.Л. Незаменимые химические элементы в регуляции метаболизма микроорганизмов. Успехи микробиологии. Наука, Москва, 1992, с. 126-142).

Exemple de realizare a invenției

- 10 1. Pentru cultivarea tulpinii de fungi *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D în 10 baloane Erlenmayer cu volumul de 750 ml s-au introdus câte 200 ml mediu de nutriție cu următoarea compoziție, g:

Varianta 1:

Coarde de viță de vie	– 10,0
Borhot de sfeclă	– 10,0
Melasă	– 10,0
MgSO ₄	– 0,5
NaNO ₃	– 3,0
KCl	– 0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	– 0,01
Zn(D-Ser) ₂	– 0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

- 15 Cultivarea s-a realizat în condiții de agitare continuă (200 rot./min) la temperatura de 28°C, timp de 96 h, valoarea inițială a pH – 4,5.

Activitatea β-glucozidazelor s-a determinat după acțiunea asupra substratului p-nitrofenil β-D-glucopiranozid, activitatea xilanazelor – după acțiunea asupra xilanului de ovăz prin dozarea substanțelor reducătoare acumulate în mediu de reacție (Исмаилова Д.Ю. Логинова Л.Т. Влияние некоторых веществ на биосинтез целлюлозы термотолерантного гриба *Aspergillus terreus*. Прикладная биохим. и микробиол., т. XI, вып. 5, 1975, с. 676-677).

- 20 După 96 h de cultivare în varianta celei mai apropiate soluții activitatea xilanazelor a constituit 3,37 U/ml, iar β-glucozidazelor – 0,36 U/ml.

În varianta mediului propus (var. 1), în care elementul nou introdus suplimentar este Zn(D-Ser)₂ activitatea xilanazelor și β-glucozidazelor a constituit respectiv 5,41 U/ml și 0,511 U/ml, sau cu 60,53% și 65,91% mai superioară mediului soluției celei mai apropiate.

- 25 Analogic exemplului 1 au fost efectuate experiențe cu componența mediului din variantele 2 și 3 în care elementele noi introduse au fost compusul coordinativ Zn(L-Ala)₂, (varianta 2) și Zn(D-Ala)₂ (varianta 3), condițiile de cultivare fiind identice.

Rezultatele experiențelor se prezintă în tabel.

Variantele mediilor	Numărul de probe	Concentrațiile comp. coord. (g/L)	Activitatea xilanazelor		Activitatea β-glucozidazelor	
			U/ml	% față de soluția cea mai apropiată	U/ml	% față de soluția cea mai apropiată
Mediul celei mai apropiate soluții	10	-	3,37±0,23	100,00	0,31±0,05	100,00
Mediile propuse:	10	0,001	5,41±0,12	160,53	0,51±0,06	165,91
Varianta 1	10	0,005	5,56±0,31	164,98	0,49±0,03	158,44
Zn(D-Ser) ₂	10	0,010	5,67±0,25	168,24	0,42±0,14	135,71
Varianta 2	10	0,001	5,13±0,18	152,22	0,47±0,05	152,92
Zn(L-Ala) ₂	10	0,005	5,25±0,27	155,78	0,44±0,09	144,16
	10	0,100	5,46±0,36	162,02	0,43±0,06	138,63
Varianta 3	10	0,001	5,56±0,21	164,98	0,46±0,07	149,67
Zn(D-Ala) ₂	10	0,005	5,46±0,13	162,02	0,42±0,09	135,38
	10	0,100	5,65±0,25	167,65	0,40±0,10	131,17

MD 1987 F1 2002.08.31

5

Datele din tabel indică faptul că în cazul utilizării mediului propus (variante) cu includerea compușilor coordinați ai Zn(II) în concentrație de 0,001, 0,005, 0,010 g/L activitatea xilanazelor și β -glucozidazelor este superioară activității respective pe mediul celei mai apropiate soluții.

- 5 Activitatea maximă a β -glucozidazelor a fost înregistrată la utilizarea concentrației biostimulatorului de 0,001 g/L și constituie 149,67...165,91%, cu 49,67...65,91% mai superioară față de soluția cea mai apropiată. Activitatea xilanazelor crește odată cu majorarea concentrației biostimulatorului de la 0,001 la 0,0010 g/L. Astfel cum la o mărire semnificativă a concentrației biostimulatorului de 5...10 ori (0,005-0,010 g/L) activitatea xilanazelor crește neînsemnat (în mediu 2...7%) din considerente economice se recomandă utilizarea concentrației de 0,001 g/L. Sporirea activității xilanazelor în mediul propus (variante) alcătuiește 52,22...64,98% față de soluția cea mai apropiată.
- 10
- 15

(57) Revendicări:

- 20 1. Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, care conține coarde de viță de vie și borhot de sfeclă uscate și mărunțite, melasă, MgSO₄, NaNO₃, FeSO₄ · 7H₂O și apă de robinet **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține compusul coordinațional Zn(D-Ser)₂, în următorul raport al ingredientelor, în g:

	coarde de viță de vie	
	uscate și mărunțite	10,0
25	borhot de sfeclă	
	uscate și mărunțite	10,0
	melasă	10,0
	MgSO ₄	0,5
	NaNO ₃	3,0
30	KCl	0,5
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
	Zn(D-Ser) ₂	0,001...0,010
	apă de robinet	până la 1 L.

- 35 2. Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, care conține coarde de viță de vie și borhot de sfeclă uscate și mărunțite, melasă, MgSO₄, NaNO₃, FeSO₄ · 7H₂O și apă de robinet **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține compusul coordinațional Zn(L-Ala)₂, în următorul raport al ingredientelor, în g:

	coarde de viță de vie	
	uscate și mărunțite	10,0
40	borhot de sfeclă	
	uscate și mărunțite	10,0
	melasă	10,0
	MgSO ₄	0,5
	NaNO ₃	3,0
45	KCl	0,5
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
	Zn(L-Ala) ₂	0,001...0,010
	apă de robinet	până la 1 L.

MD 1987 F1 2002.08.31

6

3. Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, care conține coarde de viță de vie, borhot de sfeclă, melasă, $MgSO_4$, $NaNO_3$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ și apă de robinet, caracterizat prin aceea că suplimentar conține compusul coordinativ $Zn(D-Ala)_2$, în următorul raport al ingredientelor, în g:
- | | | |
|----|-----------------------|---------------|
| 5 | coarde de viță de vie | |
| | uscate și mărunțite | 10,0 |
| | borhot de sfeclă | |
| 10 | uscate și mărunțite | 10,0 |
| | melasă | 10,0 |
| | $MgSO_4$ | 0,5 |
| | $NaNO_3$ | 3,0 |
| | KCl | 0,5 |
| 15 | $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,01 |
| | $Zn(D-Ala)_2$ | 0,001...0,010 |
| | apă de robinet | până la 1 L. |
- 20

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 356 G2

Șef Secție:

CRASNOVA Nadejda

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2000 0158		
(22) Data depozit: 2000.09.22		
(51) ⁷ : C 12 N 1/14; C 12 R 1/645		
Titlul : Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de fung <i>Aspergillus flavus</i> VKM F 3292 D (71) Solicitantul : Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD Termeni caracteristici : mediu de cultură, cultivarea fungilor, compozițiile mediilor de cultivare		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
Int. Cl. ⁷ C 12 N 1/14; C 12 R 1/645 (MD) 1993 - 2000 (EA) 1996 - 2000		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
<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:		P - document publicat înainte de data depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
A - document care definește statutul general al tehnicii		T - document publicat după data depozitului 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 data 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 când 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 efectuării de documentare	2002.04.08	
Examinatorul	Bazarenco Tatiana	

ANEXĂ

RAPORT DE DOCUMENTARE

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