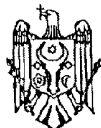




MD 3943 G2 2009.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3943** <sup>(13)</sup> **G2**  
(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)  
*C12R 1/685* (2006.01)  
*C07F 15/06* (2006.01)  
*C07C 251/70* (2006.01)  
*C12N 9/30* (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

|  |   |
|--|---|
| <p>(21) Nr. depozit: a 2008 0213<br/>(22) Data depozit: 2008.08.06</p>   | <p>(45) Data publicării hotărârii de<br/>acordare a brevetului:<br/>2009.07.31, BOPI nr. 7/2009</p> |
| <p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p> <p>(72) Inventatori: DESEATNIC Alexandra, MD; STRATAN Maria, MD; COROPCEANU Eduard, MD; BOLOGA Olga, MD; RIJA Andrei, MD; CLAPCO Steliana, MD; TIURIN Janeta, MD; LABLIUC Svetlana, MD; RUDIC Valeriu, MD; BULHAC Ion, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p> |   |

(54) **Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02**

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un mediu de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor amilolitice.

5  
10  
Mediul nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 conține, în g/L: amidon 3,0; făină de fasole 9,0, tărâțe de grau 18;

2  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0; KCl 0,5; MgSO<sub>4</sub> 0,5;  
[Co(DH)<sub>2</sub>(Anil)<sub>2</sub>][TiF<sub>6</sub>] 0,005...0,010 și apă  
potabilă până la 1 L.  
Revendicări: 1

MD 3943 G2 2009.07.31

# MD 3943 G2 2009.07.31

3

## Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la medii de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 – producător de enzime amilolitice și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea amilazelor cu spectru larg de aplicare în diverse procese tehnologice: fabricarea pâinii, producerea berii și alcoolului, producerea sucurilor și conservele din fructe și legume, industria de amidon și melase, obținerea glucozei cristaline, industria textilă, în farmaceutică și medicină, în cercetări științifice.

Pentru cultivarea tulpinilor producătoare de enzime amilolitice se utilizează medii, care conțin ca parte minerală diferite modificări ale mediului Czapek și inductori ai sintezei amilazelor (amidon sau ingrediente naturale cu conținut de amidon – făină de fasole, făină de porumb, tărâțe de grâu etc.) și, în funcție de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii, diferiți biostimulatori [1].

În calitate de cea mai apropiată soluție a servit mediul cu următoarea componență (g/L): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,0; KCl – 0,5;  $\text{MgSO}_4$  – 0,5, apă potabilă, pH inițial al mediului – 3,0 [2].

La cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 pe mediul menționat, timp de 144 ore (6 zile), la temperatura de 28...30°C, în condiții de agitare continuă, cultura manifestă activitate amilolitică maximă în ziua a 6-a de cultivare și constituie 413...425 u·mL de lichid cultural la hidroliza amidonului solubil în condiții standard (pH 4,7) și 346...351 u·mL în condiții acide (pH 2,5).

Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în faptul că mediul nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al tulpinii și biosinteza enzimelor amilolitice nu atinge valoarea maximă.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 care să asigure sporirea capacității și a stabilității biosintetice a producătorului.

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 conține amidon, făină de fasole, tărâțe de grâu,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl,  $\text{MgSO}_4$  și apă potabilă, având pH-ul inițial 3,0. Mediu suplimentar conține  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$ , componentele fiind luate în următorul raport, g/L:

|   |               |
|---|---------------|
| amidon  | 3,0           |
| făină de fasole   | 9,0           |
| tărâțe de grâu  | 18,0          |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                  | 2,0           |
| KCl   | 0,5           |
| $\text{MgSO}_4$   | 0,5           |
| $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$ | 0,005...0,010 |
| unde: DH – dimetilgloximă,                                |               |
| Anil – anilină;   |               |
| apă potabilă  | până la 1 L.  |

Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei enzimelor amilolitice: cu 27,8% activitatea amilazelor ordinare și cu 12,5...23,8% a amilazelor acid stabile față de cea mai apropiată soluție și reducerea duratei de cultivare a producătorului cu 24 ore.

Efectul biostimulator al compușilor coordinați este cauzat de însușirea microelementelor din componența compusului coordinați: Co(III), Ti(IV) de a se implica activ la coordonarea și desfășurarea reacțiilor metabolice extrem de fine și complexe.

*Exemple de realizare a invenției*

### Exemplul 1

Tulpina s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L, care conțineau 0,1 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție (g/L): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,0; KCl – 0,5;  $\text{MgSO}_4$  – 0,5;  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$  – 0,005; apă potabilă până la 1 L; pH 3,0. Cultivarea s-a efectuat timp de 144 ore, la temperatura de 30°C, în condiții de agitare continuă (180 rot. · min<sup>-1</sup>).

Activitatea amilolitică maximă a micromicetei pe mediul propus determinată în lichidul cultural s-a înregistrat în ziua a 5-a de cultivare constituind 506,4 u·mL pentru amilazele ordinare, și 335,1 u·mL pentru amilazele acid stabile, ceea ce depășește activitatea în varianta martor – cultivarea tulpinii pe mediul proxim respectiv cu 27,8 și 12,5% (ziua a 6-a de cultivare – ziua manifestării maximumului de biosinteză a tulpinii pe mediul conform celei mai apropiate soluții) (tab. 1 și 2).

### Exemplul 2

Tulpina *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L, care conțineau 0,1 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție (g/L): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,0; KCl – 0,5;  $\text{MgSO}_4$  – 0,5;  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$  – 0,010; apă potabilă până la 1 L; pH 3,0. Cultivarea s-a efectuat timp de 144 ore, la temperatura de 28°C, în condiții de agitare continuă (200 rot. · min<sup>-1</sup>).

Activitatea amilolitică maximă a micromicetei pe mediul propus determinată în lichidul cultural s-a înregistrat în ziua a 5-a de cultivare, constituind 506,4 u·mL<sup>-1</sup> pentru amilazele ordinare și 368,4 u·mL<sup>-1</sup>

## MD 3943 G2 2009.07.31

4

pentru amilazele acid stabile, ceea ce depășește activitatea în varianta martor – cultivarea tulpinii pe mediul proxim respectiv cu 27,8 și 23,7% (ziua a 6-a de cultivare – ziua manifestării maximumului de biosinteză a tulpinii pe mediul conform celei mai apropiate soluții) (tab. 1 și 2).

Sinteza  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$

- 5 La amestecul cald de 0,33 g (0,001 moli)  $\text{CoTiF}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  în 20 mL de apă și 0,23 g (0,002 moli) dimetilglioximă în 20 mL metanol se adaugă 0,23 mL (0,0025 moli) anilină. Soluția se încălzește în creuzet de grafit la aer ~8...10 min, apoi se filtrează și se lasă pentru evaporarea lentă la temperatura camerei. Din soluție se sedimentează cristale cafenii.

- 10 Randamentul: ~60%. Substanța este bine solubilă în alcooli, mai puțin în apă.  
Găsit, %: Co 10,23; C 42,93; H 4,26; N 15,02.

Pentru  $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{Co}_2\text{F}_6\text{N}_{12}\text{O}_8\text{Ti}$

Calculat, %: Co 10,59; C 43,18; H 4,35; N 15,11.

Tabelul 1

- 15 Modificarea activității amilazelor ordinare (pH 4,7, timp de 30 min) ale micromicetei *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 sub influența complexilor cobaltului (III) cu anioni fluorurați

| Compusul coordinativ,<br>mg/L                             |    | Activitatea amilolitică |               |            |               |            |               |
|---|----|-------------------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|
|   |    | Ziua a 4-a              |               | Ziua a 5-a |               | Ziua a 6-a |               |
|   |    | u/mL                    | % f/c*<br>z/6 | u/mL       | % f/c*<br>z/6 | u/mL       | % f/c*<br>z/6 |
| $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$ | 1  | 392,2                   | 99,0          | 458,9      | 115,8         | 382,3      | 96,5          |
|   | 5  | 392,2                   | 99,0          | 506,3      | 127,8         | 382,3      | 96,5          |
|   | 10 | 415,2                   | 104,8         | 506,3      | 127,8         | 450,0      | 113,6         |
| cea mai apropiată soluție                                 | -  | 299,6                   | -             | 385,6      | -             | 396,2      | 100           |

Tabelul 2

- 20 Modificarea activității amilazelor ordinare (pH 2,5, timp de 30 min) ale micromicetei *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 sub influența complexilor cobaltului (III) cu anioni fluorurați

| Compusul coordinativ,<br>mg/L                             |    | Activitatea amilolitică |               |            |               |            |               |
|---|----|-------------------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|
|   |    | Ziua a 4-a              |               | Ziua a 5-a |               | Ziua a 6-a |               |
|   |    | u/mL                    | % f/c*<br>z/6 | u/mL       | % f/c*<br>z/6 | u/mL       | % f/c*<br>z/6 |
| $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$ | 1  | 252,4                   | 84,7          | 310,1      | 104,1         | 220,4      | 84,2          |
|   | 5  | 276,6                   | 92,9          | 335,1      | 112,5         | 249,4      | 95,3          |
|   | 10 | 284,6                   | 95,6          | 368,4      | 123,7         | 292,9      | 111,9         |
| cea mai apropiată soluție                                 | -  | 215,6                   | -             | 261,7      | -             | 297,8      | 100           |

- 25 \* - față de cea mai apropiată soluție în ziua manifestării maximei de biosinteză.

## MD 3943 G2 2009.07.31

5

### (57) Revendicări:

5           Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de funghi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02, care conține amidon, făină de fasole, tărâțe de grâu,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl,  $\text{MgSO}_4$  și apă potabilă, având pH-ul inițial 3,0, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$ , componentele fiind luate în următorul raport, g/L:

|    |   |               |
|----|---|---------------|
| 10 | amidon  | 3,0           |
|    | făină de fasole   | 9,0           |
|    | tărâțe de grâu  | 18,0          |
|    | $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                  | 2,0           |
|    | KCl   | 0,5           |
|    | $\text{MgSO}_4$   | 0,5           |
| 15 | $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$ | 0,005...0,010 |
|    | unde: DH – dimetilglioximă,<br>Anil – anilină;            |               |
|    | apă potabilă  | până la 1 L.  |

20

### (56) Referințe bibliografice:

- 25           1. MD 2836 G2 2005.08.31  
              2. MD 2363 G2 2004.01.31

30

**Șef Secție:**

GROSU Petru

**Examinator:**

BAZARENCO Tatiana

**Redactor:**

CANȚER Svetlana

## RAPORT DE DOCUMENTARE

|  |  |   |
|--|--|---|
| (21) Nr. depozit: a 2008 0213  |  |   |
| (22) Data depozit: 2008.08.06  |  |   |
| (51) : <b>Int. Cl.: C12N 1/14</b> (2006.01)<br><b>C12R 1/685</b> (2006.01)<br><b>C07F 15/06</b> (2006.01)<br><b>C07C 251/70</b> (2006.01)<br><b>C12N 9/30</b> (2006.01)<br><br><b>Titlul:</b> Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi <i>Aspergillus niger</i> 33-19 CNMN FD<br>02              |  |   |
| (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD<br>Termeni caracteristici : tulpină de fungi <i>Aspergillus niger</i> , activitatea amilolitică, mediu nutritiv, compuși coordinațivi |  |   |
| I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.   |  |   |
| (MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nepublică”)MD 1993-2009; EA 1996-2009; SU-colecția BRTȘ   |  |   |
| II. Documente considerate ca relevante   |  |   |
| Categoria*   | Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente | Numărul revendicării vizate   |
| A  | MD 2836 G2 2005.08.31  | 1   |
| A  | MD 2363 G2 2004.01.31  | 1   |
| A  | Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. Тбилиси, 1984, 154 с.         |   |
| <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:  |  | <b>P</b> - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate  |
| <b>A</b> - document care definește stadiul anterior general  |  | <b>T</b> - 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 evidența principiul sau teoria care conține baza invenției   |
| <b>E</b> - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data  |  | <b>X</b> - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă  |
| <b>L</b> - 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)   |  | <b>Y</b> - 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 |
| <b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă   |  | <b>&amp;</b> - document care face parte din aceeași familie de documente  |
| Data finalizării documentării  |  | 2009.05.15  |
| Examinatorul   |  | Bazarenco Tatiana   |

736 / FC / 05.0 / A / 3 / I /

ANEXĂ

## RAPORT DE DOCUMENTARE

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