



MD 4465 C1 2017.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4465** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *G01N 21/78* (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2014 0089 (22) Data depozit: 2014.08.22 (41) Data publicării cererii: 2016.02.29, BOPI nr. 2/2016	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.01.31, BOPI nr. 1/2017
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: COVALIOV Victor, MD; SENICOVSCAIA Irina, MD; UNGUREANU Dumitru, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de determinare a activității dehidrogenazei în biomasă la fermentare

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de determinare a activității dehidrogenazei în biomasă la fermentare.

Procedeu, conform invenției, prevede introducerea în proba analizată a soluției de glucoză și de clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu (TTC), incubarea amestecului, extragerea ulterioară cu alcool, determinarea colorimetrică a densității optice a soluției colorate de trifenilformazan formate în

2
rezultatul reacției de dehidrogenare a TTC cu calcularea ulterioară a activității dehidrogenazei, totodată, în componența amestecului supus analizei se introduce scuolenă și soluție tampon de fosfat cu pH-ul 7,2, procesul de incubare având loc în condiții mezofile timp de 25...30 min cu agitare ulterioară, iar calcularea activității dehidrogenazei se efectuează după formulă.

Revendicări: 2

MD 4465 C1 2017.08.31

(54) Process for determining the dehydrogenase activity in fermentation biomass**(57) Abstract:**

1
The invention relates to biotechnology, particularly to a process for determining the dehydrogenase activity in fermentation biomass.

The process, according to the invention, provides for the introduction into the analyzed sample of the glucose and 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) solution, incubation of the mixture followed by extraction with alcohol, colorimetric determination of the optical density of the colored triphenyl-formazan solution obtained

2
as a result of TTC dehydrogenation reaction followed by calculation of dehydrogenase activity, at the same time into the composition of the analyzed mixture is introduced squalene and phosphate buffer solution with pH 7.2, the incubation process is carried out in mesophilic conditions for 25...30 min with subsequent mixing, and the calculation of dehydrogenase activity is carried out according to the formula.

Claims: 2

(54) Способ определения дегидрогеназной активности в сбраживаемой биомассе**(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу определения активности дегидрогеназы в сбраживаемой биомассе.

Способ, согласно изобретению, предусматривает введение в анализируемую пробу раствора глюкозы и хлористого 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТХ), инкубацию смеси, последующее экстрагирование спиртом, колориметрическое определение оптической плотности окрашенного раствора трифенилформазана, полученного в

2
результате реакции дегидрирования ТТХ с последующим расчетом активности дегидрогеназы, при этом в состав анализируемой смеси вводят сквален и фосфатный буферный раствор с рН 7,2, процесс инкубации проводят в мезофильных условиях в течение 25...30 мин с последующим перемешиванием, а расчет активности дегидрогеназы осуществляется по формуле.

П. формулы: 2

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de determinare a activității dehidrogenazei în biomasă la fermentare.

5 Invenția poate fi aplicată pentru controlul expres al procesului de fermentare anaerobă a materiei prime organice în tehnologia de biogaz și pentru dirijarea acestui proces. Activitatea sumară a fermenților dehidrogenazici reprezintă un indicator al activității biologice generale în procesul de fermentare anaerobă, care caracterizează activitatea microorganismelor însuși, determină viteza și profunzimea proceselor biochimice din bioreactor.

10 Este cunoscut procedeu de control al procesului de fermentare anaerobă a materiei prime organice, care constă în determinarea analitică a materiei prime organice, care include determinarea analitică a indicatorilor de consum chimic al oxigenului (CCO) și consum biochimic (CBO) al oxigenului în biomasa supusă fermentării, pH-ului și a temperaturii în bioreactor. Însă acest procedeu este indirect, nu permite evaluarea cantitativă a activității procesului de metanogeneză și, respectiv, controlul operativ al formării biogazului pe parcursul proceselor anaerobe de fermentare a biomasei [1].

15 Cel mai apropiat conform esenței tehnice și rezultatului scontat este procedeu de determinare a activității dehidrogenazei, care include introducerea în proba analizată de biomasă supusă fermentării a soluțiilor de glucoză și 2,3,5-trifenil-tetrazoliu clorurat (TTC), incubarea amestecului în condiții de vid cu extragerea ulterioară cu alcool și determinarea colorimetrică a densității optice a soluției colorate de trifenil-formazan (TFF) în calitate de produs al reacției de dehidrogenare a TTC [2].

25 Dezavantajele acestui procedeu constau în durata mare a reacției, volumul mare de muncă și capacitatea înaltă de absorbție a energiei, lipsa factorilor de stabilizare a activității dehidrogenazei (extractele colorate se decolorează repede) și inconveniența determinării și măsurării activității dehidrogenazei în cazul unui număr mare de probe analizate, ceea ce îl face nerentabil din punct de vedere economic. Totodată, procesul de incubare, având loc timp de 60 min, este îndelungat.

30 Problema soluționată prin prezenta invenție constă în accelerarea, reducerea volumului de muncă a procesului de analiză și ieftinirea procedurii de efectuare a analizei.

35 Procedeu de determinare a activității dehidrogenazei în biomasă la fermentare prevede introducerea în proba analizată a soluției de glucoză și de clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu (TTC), incubarea amestecului în condiții de vid, extragerea ulterioară cu alcool, determinarea colorimetrică a densității optice a soluției colorate de trifenilformazan (TFF) formate în rezultatul reacției de dehidrogenare a TTC cu calcularea ulterioară a activității dehidrogenazei, totodată în componența amestecului supus analizei se introduce scuolenă, în cantitate de $(5,0...5,5)10^{-4}$ % în raport cu volumul amestecului analizat, și soluție tampon de fosfat cu pH-ul 7,2, totodată se utilizează soluții de 0,2 M de glucoză și 2% TTC, procesul de incubare având loc în condiții mezofile la temperatura de $33\pm 1^\circ\text{C}$ timp de 25...30 min, cu agitarea ulterioară prin scuturare timp de 5 min, iar calcularea activității dehidrogenazei se efectuează conform formulei:

45
$$AD = \frac{(D_{\text{probă}} - D_{\text{probă sterilă}} - D_{\text{control}})}{t} * K * 1,5,$$

unde

AD – activitatea dehidrogenazei, mg TFF/ml·h;

$D_{\text{probă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei analizate, media a 3 măsurări;

50 $D_{\text{probă sterilă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei sterile;

D_{control} – valoarea absolută a densității optice a reactivilor fără probă;

t – timpul incubării, h;

K – coeficient de corecție a densității optice conform curbei de calibrare, mg TFF/ml;

1,5 – raportul dintre volumul amestecului pentru extragere în probă și volumul probei pentru calibrare.

5 Soluția tampon, utilizată la realizarea procedurii, conține fosfat de sodiu monosubstituit (NaH_2PO_4) – 68,4 g/L și disubstituit (Na_2HPO_4) – 31,6 g/L.

10 Rezultatul tehnic obținut în urma realizării invenției propuse constă în accelerarea procesului de incubare datorită prezenței în componența amestecului a microadaosului de scuolenă (2,6,10,15,19,23 – hexametiltetracoza – 2,6,10,14,18,22 – hexaen), care reduce durata de adaptare a microorganismelor la noile substraturi și asigură o efectuare mai rapidă a reacției de dehidrogenare a TTC și de formare a TFF. Utilizarea unor concentrații mai mari de glucoză și TTC duce la accelerarea suplimentară a reacției țintă de dehidrogenare. Agitarea prin scuturare a amestecului după incubare îl omogenizează și îmbunătățește solubilitatea și extragerea TFF pentru determinarea colorimetrică a densității optice a probei. După intensitatea colorării se apreciază cantitatea de formazan, care este proporțională cu activitatea dehidrogenazei.

15 Rezultatul obținut este condiționat de reducerea duratei de incubare a probelor datorită utilizării adaosului activant de scuolenă și majorării concentrației de TTC și glucoză de 2 ori, stabilizării activității dehidrogenazei prin utilizarea amestecului tampon, îmbunătățirii extragerii TFF prin agitare și economia energiei electrice la incubarea probelor.

Exemplu de realizarea a invenției

25 Determinarea activității dehidrogenazei a fost efectuată în modul următor. Au fost preluate mostre din bioreactorul metanogen al gospodăriei agricole „GARMA-GRUP, SRL”, c. Fârlădeni, Hâncești. Componența biomasei fermentate – 60% de borhot de la distilarea alcoolului + 40% bălegar.

30 Proba biomasei fermentate, cu volumul de 1 ml, a fost plasată într-o eprubetă, s-au adăugat 2 ml de soluție tampon fosfat cu $\text{pH}=7,2$, 1 ml de soluție 2% TTC, 1 ml 0,2 M de soluție de glucoză și scuolenă $(5,0\dots5,5)10^{-4}\%$ în raport cu volumul total de amestec (5 ml) incubat, care este scuturat atent.

Apoi amestecul a fost vacuumat la un vid de 10...12 mm Hg și incubat la temperatura de $33\pm 1^\circ\text{C}$ timp de o oră în termostat. Drept control au servit materia primă (biomasa) fermentată sterilizată și reactivii.

35 După finalizarea incubării în eprubetă s-au adăugat porționat câte 10 ml de alcool etilic 96%, apoi a fost supusă agitării prin scuturare timp de 5 min. Conținutul eprubetelor a fost apoi filtrat, iar soluția de TFF a fost analizată la fotocolorimetru, folosind chiuvete cu lățimea de 5 mm și un filtru de lumină cu lungimea de undă de 540 nm. Cantitatea de trifenilformazan (în mg) a fost determinată cu ajutorul curbei standard. Pentru alcătuirea curbei de calibrare a fost preparată soluția standard de formazan în alcool etilic (0,1 mg la 1 ml). Calculele s-au efectuat conform formulei.

Exemplu de calcul conform procedurii propus:

$$AD = \frac{(D_{\text{probă}} - D_{\text{probă sterilă}} - D_{\text{control}})}{t} * K * 1,5 * 10,$$

unde AD – activitatea dehidrogenazei, mg TFF/10 ml/1 oră;

45 $D_{\text{probă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei analizate, media a 3 măsurări;

$D_{\text{probă sterilă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei sterile;

D_{control} – valoarea absolută a densității optice a reactivilor fără probă;

t – timpul incubării, ore;

50 **K** – coeficientul de corecție a densității optice conform curbei de calibrare, mg TFF/ml;

1,5 – raportul dintre amestecul pentru extragere în probă (15 ml) și în proba pentru calibrare (10 ml);

10 – recalcularea/corecția pentru 10 ml de biomasă analizată.

55

$$D_{\text{probă}} = 0,26; 0,27; 0,29$$

$$D_{\text{probă sterilă}} = 0$$

$$D_{\text{control}} = 0$$

$$t = 0,5$$

$$K = 0,641152899$$

$$5 \quad AD_1 = \frac{(0,26 - 0 - 0)}{0,5} * 0,641152899 * 1,5 * 10 \approx 5,00 \text{ mg TFF/10 ml/1 oră}$$

$$AD_2 = \frac{(0,27 - 0 - 0)}{0,5} * 0,641152899 * 1,5 * 10 \approx 5,19 \text{ mg TFF/10 ml/1 oră}$$

$$AD_3 = \frac{(0,29 - 0 - 0)}{0,5} * 0,641152899 * 1,5 * 10 \approx 5,58 \text{ mg TFF/10 ml/1oră}$$

$$AD \text{ medie} = (AD_1 + AD_2 + AD_3)/3 = (5,00+5,19+5,58)/3 = 5,26 \text{ mg TFF/10ml/1ore}$$

10

Exemplu de calcul conform celei mai apropiate soluții

Calcululele s-au efectuat conform formulei:

$$AD = \frac{(D_{\text{probă}} - D_{\text{probă sterilă}} - D_{\text{control}})}{t} * K * 1,3 * 10,$$

unde: AD – activitatea dehidrogenazei, mg TFF/10 ml/1oră;

15 $D_{\text{probă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei analizate, media a 3 măsurări;

$D_{\text{probă sterilă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei sterile;

D_{control} – valoarea absolută a densității optice a reactivilor fără probă;

t – timpul incubării, ore;

20 K – coeficient de corecție a densității optice conform curbei de calibrare, mg TFF/ml;

1,3 – raportul dintre amestecul pentru extragere în probă (13 ml) și în proba pentru calibrare (10 ml);

10 – recalcularea/corecția pentru 10 ml de biomasă analizată.

25 $D_{\text{probă}} = 0,59; 0,56; 0,59$

$$D_{\text{probă sterilă}} = 0$$

$$D_{\text{control}} = 0$$

$$t = 1,0$$

$$K = 0,641152899$$

$$30 \quad AD_1 = \frac{(0,59 - 0 - 0)}{1,0} * 0,641152899 * 1,3 * 10 \approx 4,92 \text{ mg TFF/10 ml/1oră}$$

$$AD_2 = \frac{(0,56 - 0 - 0)}{1,0} * 0,641152899 * 1,3 * 10 \approx 4,67 \text{ mg TFF/10 ml/1oră}$$

$$AD_3 = \frac{(0,59 - 0 - 0)}{1,0} * 0,641152899 * 1,3 * 10 \approx 4,92 \text{ mg TFF/10 ml/1oră}$$

$$AD \text{ medie} = (AD_1 + AD_2 + AD_3)/3 = (4,92+4,67+4,92)/3 = 4,84 \text{ mg TFF/10 ml/1oră}$$

35

40

45

MD 4465 C1 2017.08.31

6

Rezultatele analizelor activității dehidrogenazei din biomasa fermentată sunt prezentate în tabel.

Tabel

Condiții	Date cantitative	
	Procedeeul conform invenției	Conform celei mai apropiate soluții
Biomasa fermentată (60% borhot de la distilarea alcoolului + 40% bălegar)	1 ml	1 ml
Clorură de 2,3,5- trifeniltetrazoliu (TTC), 1%	1 ml	1 ml
Concentrația de glucoză	0,1 M	-
	0,2 M	1 ml
CaCO ₃	-	10 mg
Soluție tampon de fosfat, pH=7,2	2 ml	-
Alcool etilic, 96%	10 ml	10 ml
Scualenă (2,6,10,15,19,23-hexametil-tetracoza -2,6,10,14,18,22-hexaen)	0,025 mg	-
Timpul de incubare, min	30	55
Activitatea dehidrogenazei, mg TFF(10 ml)	5,26	4,84

- 5 Rezultatele obținute demonstrează că durata incubării probelor analizate s-a redus de 2 ori în comparație cu condițiile analizei activității dehidrogenazei conform procedurii cunoscut, ceea ce este condiționat de utilizarea adaosului biologic activ de scuolenă, de majorarea concentrațiilor de TTC și glucoză, precum și de utilizarea soluției tampon, ceea ce stabilizează activitatea dehidrogenazei, iar agitarea suplimentară a amestecului după incubare majorează precizia analizei datorită îmbunătățirii solubilității și a extracției TFF în soluția hidroalcoolică a amestecului analizat. De rând cu aceasta, accelerarea esențială a procesului de efectuare a analizei asigură reducerea volumului de muncă, iar concomitent se reduce consumul de energie datorită reducerii duratei de incubare a probelor în termostat.
- 10 Nu este mai puțin importantă operativitatea tehnologică a rezultatelor analizei care este mai înaltă în comparație cu condițiile de efectuare a lor în conformitate cu cea mai apropiată soluție – procedeeul cunoscut, ceea ce permite o dirijare operativă a procesului de obținere a biogazului, de exemplu, prin introducerea adaosurilor stimulante pentru intensificarea producției de biogaz din biomasa și majorarea maxim posibilă a conținutului de biometan.
- 15
- 20

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биологии. Москва, МГУ, 1991, p. 245-246, <http://padaread.com/?book=51406&pg=251>
2. Инструкция по лабораторному контролю очистных сооружений на животноводческих комплексах. Часть 3. Определение биогенных веществ. Методические рекомендации по определению дегидрогеназной активности ила при технологическом контроле работы аэротенков. Москва, Колос, 1984, p. 22-24

(57) Revendicări:

1. Procedeu de determinare a activității dehidrogenazei în biomasă la fermentare, care prevede introducerea în proba analizată a soluției de glucoză și de clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu (TTC), incubarea amestecului în condiții de vid, extragerea ulterioară cu alcool, determinarea colorimetrică a densității optice a soluției colorate de trifenilformazan (TFF) formate în rezultatul reacției de dehidrogenare a TTC cu calcularea ulterioară a activității dehidrogenazei, **caracterizat prin aceea că** în componența amestecului supus analizei se introduce scuolenă, în cantitate de $(5,0...5,5)10^{-4}$ % în raport cu volumul amestecului analizat, și soluție tampon de fosfat cu pH-ul 7,2, totodată se utilizează soluții de 0,2 M de glucoză și 2% TTC, procesul de incubare având loc în condiții mezofile la temperatura de $33\pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 25...30 min, cu agitarea ulterioară prin scuturare timp de 5 min, iar calcularea activității dehidrogenazei se efectuează conform formulei:

$$AD = \frac{(D_{\text{probă}} - D_{\text{probă sterilă}} - D_{\text{control}})}{t} * K * 1,5,$$

unde

AD – activitatea dehidrogenazei, mg TFF/ml·h;

$D_{\text{probă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei analizate, media a 3 măsurări;

$D_{\text{probă sterilă}}$ – valoarea absolută a densității optice a probei sterile;

D_{control} – valoarea absolută a densității optice a reactivilor fără probă;

t – timpul incubării, h;

K – coeficient de corecție a densității optice conform curbei de calibrare, mg TFF/ml;

1,5 – raportul dintre volumul amestecului pentru extragere în probă și volumul probei pentru calibrare.

2. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** soluția tampon conține fosfat de sodiu monosubstituit (NaH_2PO_4) – 68,4 g/L și disubstituit (Na_2HPO_4) – 31,6 g/L.

Șef adjunct Direcție Brevete:

GUȘAN Ala

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

DUBĂSARU Nina

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2014 0089 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2014.08.22 Raport de documentare internațională: da
 (67) Numărul cererii transformate și data transformării:
 (71) Solicitant: **UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD**
 (54) **Titlul: Procedeu de analiză expres a activității dehidrogenazei în biomasa fermentată**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl: G01N 21/78** (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta):

G01N 21/78
 C12N 9/04
 C12P 5/02
 activitate
 dehidrogenaza
 squalenă

"Worldwide" (Espacenet):

G01N 21/78
 C12N 9/04
 C12P 5/02
 dehydrogenase
 activity
 squalene

EA, CIS (Eapatis):

G01N 21/78
 C12N 9/04
 C12P 5/02
 дегидрогеназа
 активность
 сквален

SU (nonpublic):

Alte BD –

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

http://newchemistry.ru/letter.php?n_id=4383
<http://docs.cntd.ru/document/1200043588>
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0001-37141999000200009&script=sci_arttext
<http://www.complexdoc.ru/ntdtext/481548/17>
<http://lesnoizhurnal.narfu.ru/upload/iblock/fcb/fcb5937c47a1ccbd79bf26b6f69baa42.pdf>
http://www.energo-resurs.ru/eg_tezis_2003_13.htm
http://edu.sernam.ru/book_b_chem1.php?id=43

<http://chem21.info/info/567397/>
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/38458

V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биологии. Москва, МГУ, 1991, p. 245-246 http://padaread.com/?book=51406&pg=251	2
A, D, C	Инструкция по лабораторному контролю очистных сооружений на животноводческих комплексах. Часть 3. Определение биогенных веществ. Методические рекомендации по определению дегидрогеназной активности ила при технологическом контроле работы аэротенков. Москва. Колос, 1984, p. 22-24	2
A	RU 2476598 C2 2013.02.27	2
A	CN103525896 A 2014.01.22	2
A	US 4622296 A 1986.11.11	2
A	FR 2053897 A5 1971.04.16	2
A	SU 1043568 A1 1983.09.23	2
A	RU 2387996 C1 2010.04.27	2

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	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 pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării 2016.08.03

Examinator DUBĂSARU Nina