



MD 4827 B1 2022.10.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4827** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07D 213/86* (2006.01)
C07D 213/50 (2006.01)
C07F 15/02 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)
C12R 1/845 (2006.01)

(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 0014 (22) Data depozit: 2021.03.29 (41) Data publicării cererii: 2022.09.30, BOPI nr. 9/2022	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2022.10.31, BOPI nr. 10/2022
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL MEC, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: DANILESCU Olga, MD; BULHAC Ion, MD; COCU Maria, MD; BOUROȘ Pavlina, MD; CILOCI Alexandra, MD; CLAPCO Steliana, MD; LABLIUC Svetlana, MD; MATROI Alexandra, MD (73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL MEC, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor	

(54) Nitrat de 2,6-diacetilpiridin-bis(picolinoilhidrazon)-bis(aqua)fier(III) –hidrat(1/2,5) cu proprietăți de stimulator al sintezei lipazelor la tulpina de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 și mediu nutritiv pentru cultivare

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimia coordinativă și biotehnologie, în special la un compus coordinativ nou al fierului(III) cu bis(picolinoilhidrazona) 2,6-diacetilpiridinei, care manifestă proprietăți de biostimulator al sintezei lipazelor exocelulare la tulpina de fungi miceliali *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 și poate fi utilizată în elaborarea biotehnologiilor pentru obținerea enzimelor lipolitice.

Conform invenției, se revendică un compus coordinativ nou nitrat de 2,6-diacetilpiridin-bis(picolinoilhidrazon)-bis(aqua)fier(III)–hidrat(1/2,5) cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, în care H_2L reprezintă bis(picolinoilhidrazona) 2,6-

2
diacetilpiridinei. Compusul revendicat este bine solubil în apă, ceea ce asigură o utilizare practică în calitate de component al mediilor nutritive.

De asemenea, se revendică un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, care conține, g: făină de soia – 35,0; KH_2PO_4 – 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ – 0,005...0,015; apă potabilă – până la 1 L. Biostimulatorul asigură atingerea maximului de activitate lipolitică în prima zi de cultivare.

Revendicări: 2

Figuri: 2

MD 4827 B1 2022.10.31

(54) 2,6-Diacetylpyridine-bis(picolinoylhydrazone)-bis(aqua)iron(III)-hydrate(1/2.5) nitrate with stimulatory properties of the synthesis of lipases in the *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 fungi strain and nutrient medium for cultivation

(57) Abstract:

1
The invention relates to coordination chemistry and biotechnology, in particular to a new coordination compound of iron(III) with 2,6-diacetylpyridine bis(picolinoylhydrazone), which exhibits the properties of a biostimulant for the synthesis of extracellular lipases in the strain of *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 mycelial fungi and can be used for creating biotechnologies for the production of lipolytic enzymes.

According to the invention, a new coordination compound 2,6-diacetylpyridine-bis(picolinoylhydrazone)-bis(aqua)iron(III)-hydrate(1/2.5) nitrate with the formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, wherein H_2L is 2,6-diacetylpyridine

2
bis(picolinoylhydrazone). The claimed compound is highly soluble in water, thereby providing practical use as a component of nutrient media.

Also, a nutrient medium for cultivation of *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 fungi strain is claimed, which comprises, g: soy flour - 35.0; KH_2PO_4 - 5.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1.0; $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ - 0.005...0.015; drinking water - up to 1 L.

The biostimulant provides for the achievement of the maximum lipolytic activity on the first day of cultivation.

Claims: 2

Fig.: 2

(54) Нитрат 2,6-диацетилпиридин-бис(пиколиноилгидразон)-бис(аква)железо(III)-гидрат(1/2,5) с свойствами стимулятора синтеза липаз штаммом грибов *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 и питательная среда для культивирования

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к координационной химии и биотехнологии, в частности к новому координационному соединению железа(III) с бис(пиколиноилгидразоном) 2,6-диацетилпиридина, проявляющему свойства биостимулятора синтеза внеклеточных липаз штаммом мицелиальных грибов *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 и может быть использовано для создания биотехнологий для получения липолитических ферментов.

Согласно изобретению, заявляется новое координационное соединение нитрат 2,6-диацетилпиридин-бис(пиколиноилгидразон)-бис(аква)железо(III)-гидрат(1/2,5) с формулой $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, в которой H_2L представляет собой

2
бис(пиколиноилгидразон) 2,6-диацетилпиридина. Заявляемое соединение хорошо растворимо в воде, тем самым обеспечивая практическое использование в качестве компонента питательных сред.

Также, заявляется питательная среда для культивирования штамма грибов *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, которая содержит, г: соевую муку – 35,0; KH_2PO_4 – 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ – 0,005...0,015; питьевую воду – до 1 л. Биостимулятор обеспечивает достижение максимума липолитической активности в первый день культивирования.

П. формулы: 2

Фиг.: 2

Descriere:

Invenția se referă la chimia coordinativă și biotehnologie, în mod special la sinteza unui compus coordinativ nou al fierului(III) cu bis(picolinoilhidrazona) 2,6-diacetilpiridinei, care manifestă proprietăți de biostimulator al sintezei lipazelor exocelulare la tulpina de fungi miceliali *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 și poate fi utilizată în elaborarea biotehnologiilor pentru obținerea enzimelor lipolitice.

Rhizopus arrhizus CNMN FD 03 reprezintă o tulpină de fungi miceliali (micromicetă), care este producătoare de lipaze exocelulare cu semnificație biotehnologică și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor lipolitice exocelulare cu spectru larg de aplicare. Pentru cultivarea tulpinilor de micromicete producătoare de lipaze se utilizează medii nutritive, care includ săruri minerale (diferite modificări ale mediului Czapek) și inductori ai sintezei lipazelor – ingrediente naturale cu conținut de componente lipidice – făină de soia, făină de porumb, extract de porumb, extract de drojdii, tărâțe de grâu etc.

Este cunoscut mediul de cultivare în condiții clasice a tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 cu următoarea compoziție, g: făină de soia – 35,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; KH_2PO_4 – 5,0; apă potabilă – până la 1 L; pH-ul inițial – 8,0 [1]. Dezavantajul mediului de cultivare în condiții clasice constă în nivelul redus al biosintezei lipazelor exocelulare.

Componentele lipidice prezente în cantități mici în ingredientele din compoziția mediului stimulează efectiv biosinteza lipazelor (Fogarty W.M. Микробные ферменты и биотехнология. Москва: Агропромиздат, 1986, p. 317). La multe microorganisme o parte considerabilă de lipaze exocelulare sunt legate de peretele celular, ce poate afecta secreția lipazelor în mediul de cultură și inhibarea biosintezei acestora. Includerea în mediul nutritiv a substanțelor cu abilități de stimulare a eliberării lipazelor legate de peretele celular, spre exemplu, surplusul de ioni ai unor metale, accelerează secreția lipazelor în mediul de cultură ce favorizează procesul de biosinteză a lipazelor exocelulare.

Este cunoscută utilizarea în mediul nutritiv a nanoparticulelor de Fe_3O_4 , în calitate de biostimulator, care asigură o creștere sporită a capacității biosintetice a micromicetelor producătoare de lipaze exocelulare [2]. Dezavantajul mediului nutritiv ce conține ca biostimulator nanoparticule de Fe_3O_4 , constă în faptul că este necesară dispersarea riguroasă prealabilă cu ultrasunet a nanoparticulelor de Fe_3O_4 , totodată utilizarea nanoparticulelor prezintă riscuri de sănătate prin inhalare sau contact cu pielea. Alt dezavantaj constă în faptul că deși activitatea lipolitică este destul de înaltă, maximul de activitate al tulpinii de fungi miceliali *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 se atinge în a doua zi de cultivare.

Un efect de stimulare al biosintezei lipazelor exocelulare poate asigura și includerea în mediul nutritiv a compușilor coordinativi ai unor metale. Aplicarea unor compuși coordinativi cu liganzi polidentati, care conțin atomi donori de oxigen și azot, în domeniul biotehnologiilor de cultivare a microorganismelor, pot uneori să contribuie la sporirea sintezei enzimelor în biotehnologiile de procesare a substraturilor vegetale (MD 4645 B1 2019.08.31).

Este necesar de menționat că unii compuși ai metalelor nu posedă proprietăți de biostimulatori ai sintezei enzimelor, ci din contra, se manifestă ca inhibitori ai biosintezei acestor lipaze (Bulhac I. et al. Structure and some biological properties of Fe(III) complexes with nitrogen-containing ligands. Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry, 2016, vol. 11(1), pp. 39-49).

În calitate de analogul proxim (cea mai apropiată soluție) poate fi considerat mediul nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, care conține în calitate de biostimulator de sinteză a lipazelor extracelulare un compus coordinativ de cupru – bis(glicinat) de cupru monohidrat, $\text{CuGly}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Mediul nutritiv pentru cultivare conține, g: făină de soia – 35,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; KH_2PO_4 – 5,0; $\text{CuGly}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,005...0,020; apă potabilă – până la 1 L [3]. Dezavantajul analogului proxim constă în sporirea moderată a biosintezei lipazelor exocelulare (31,2 – 49,9%), iar activitatea maximă de biosinteză a lipazelor exocelulare se observă în a doua zi de cultivare a tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în:

- extinderea gamei de compuși coordinativi cu proprietăți de biostimulatori prin obținerea unui compus coordinativ nou al fierului(III) cu bis(picolinoilhidrazona) 2,6-diacetilpiridinei cu proprietăți de stimulator al sintezei lipazelor exocelulare pentru tulpina de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, la un ciclu mai redus de cultivare a acestei tulpini;

- elaborarea unui mediu pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, utilizarea căruia intensifică biosinteza lipazelor exocelulare și reduce ciclul de cultivare a tulpinii-productoare prin atingerea mai rapidă a maximumului de activitate lipolitică.

Esența invenției constă în faptul că:

1) se propune în calitate de biostimulator al sintezei lipazelor exocelulare pentru tulpina de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 un compus coordinativ nou: nitrat de 2,6-diacetilpiridin-bis(picolinoilhidrazon)-bis(aqua)fier(III)-hidrat(1/2,5) cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, în care H_2L reprezintă bis(picolinoilhidrazona) 2,6-diacetilpiridinei;

2) se propune un mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 în componența căruia se include suplimentar în calitate de stimulator al biosintezei lipazelor exocelulare compusul coordinativ sus-menționat, în următorul raport cantitativ al componentelor, g: făină de soia – 35,0; KH_2PO_4 – 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ – 0,005...0,015, apă potabilă – până la 1 L.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea biosintezei lipazelor la tulpina de fungi miceliali *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 cu 16 % față de analogul proxim și 17...83 % față de martor (fără biostimulator) în ziua a 2-a de cultivare, totodată ciclul de cultivare a tulpinii-productoare se reduce cu 24 ore.

Avantajele invenției revendicate constau în:

- obținerea compusului coordinativ revendicat este simplu în executare, iar substanțele inițiale sunt accesibile comercial;
- complexul revendicat manifestă o solubilitate foarte bună în apă, ceea ce asigură o utilizare practică în calitate de component al mediului nutritiv;
- atingerea maximumului de activitate lipolitică a micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 în prima zi de cultivare.

Compusul coordinativ revendicat $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, atât și procedul de sinteză a lui, datele structurale cât și proprietățile sale biologice nu sunt descrise în Stadiul tehnicii.

Efectul biologic al complexului nitrat de 2,6-diacetilpiridin-bis-(picolinoilhidrazon)-bis-(aqua)fier(III)-hidrat(1/2,5) revendicat a fost evaluat după gradul de influență asupra activității lipolitice a tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus*. Rezultatele studiului efectului biologic au demonstrat că includerea compusului coordinativ $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ în mediul de cultivare a micromicetei *Rhizopus arrhizus* exercită influență benefică asupra procesului de biosinteză a lipazelor. Astfel, în prima zi de cultivare activitatea enzimatică a constituit 67246 U/mL (la concentrația de 5 mg/L), 49178 U/mL (10 mg/L) și 43216 U/mL (15 mg/L), depășind cu 181%, 106% și, respectiv, 81% martorul zilei și cu 83%, 34% și 17% – superioară martorului din ziua a 2-a – ziua în care micromiceta manifestă maximumul biosintezei enzimelor lipolitice la cultivare în condiții clasice.

Invenția se explică prin figurile ce urmează și reprezintă:

fig. 1 – structura cationului complex $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ cu notarea parțială a atomilor;

fig. 2 – formarea dimerului centrosimetric din cationi complecși.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1. Sinteza compusului coordinativ nitrat de 2,6-diacetilpiridin-bis(picolinoilhidrazon)-bis(aqua)fier(III)-hidrat(1/2,5) ($[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$)

Procedul de sinteză a acestui complex constă în dizolvarea $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g, 0,25 mmol) în 5 mL apă și adăugarea la suspensia de bază Schiff - bis(picolinoilhidrazona) 2,6-diacetilpiridinei (0,1 g, 0,25 mmol) în 10 mL metanol. Amestecul reactant este refluxat timp de 4 ore, până la dizolvarea completă a agentului de coordonare. Soluția de culoare brun-neagră este filtrată și lăsată pentru evaporare lentă la temperatura camerei. În patru zile se formează cristale sub formă de prisme de culoare neagră. Cristalele se separă și se usucă în aer liber (0,036 g), randamentul constituind 83 %.

Rezultatele analizei elementale (%) pentru $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{FeN}_{10}\text{O}_{15,5}$

Calculat, %: C - 34,82; H - 3,90; N - 19,34.

Găsit, %: C - 34,65; H - 3,96; N - 19,41.

Substanța este solubilă în apă, alcooli, dimetilformamidă, dimetilsulfoxid.

Spectrul IR (ν , cm^{-1}): 3541 m*, 3332 m, 2727 m, 2444 m, 1755 s*, 1624 m, 1611 m, 1595 m, 1568 m, 1552 m, 1517 m, 1462 f.i*, 1411 i*, 1377 f. i, 1327 i, 1303 i, 1229 m, 1212 m, 1179 m, 1153 m, 1093 m, 1080 m, 1063 m, 1041 m, 1020 s, 1006 s, 984 m, 935 s, 918 m, 824 m, 814 m, 805 m, 761 m, 746 m, 722 m, 702 m, 690 m, 682 m, 654 m, 620 m, 565 s, 552 s, 529 m, 493 s, 445 m, 409 s.

(*intensitatea benzii de absorbție: f. i - foarte intensivă, i - intensivă, m - medie, s - slabă).

Metoda de sinteză a agentului de coordonare bis(picolinoilhidrazona) 2,6-diacetilpiridinei constă în condensarea 2,6-diacetilpiridinei cu hidrazida acidului picolinic în raport molar de 1:2, descrisă în literatură (Pelizzi C. and Pelizzi G. Crystal and molecular structure of 2,6-diacetylpyridine bis(picolinoylhydrazon) hemihydrate. Acta Crystallographica. 1979, vol. B35, pp. 126-128).

Exemplul 2. Studiul cristalografic

Structura moleculară și cristalină a complexului a fost stabilită, utilizând metoda difracției razelor X pe monocristal (tab. 1).

Ca rezultat al determinării structurii complexului $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ a fost stabilit, că acesta este de natură ionică, format dintr-un cation complex $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ (fig. 2), anioni NO_3^- și molecule de apă de cristalizare în sfera externă. Analiza compusului coordinativ indică că numărul de coordinare al ionului $\text{Fe}(\text{III})$ este șapte, în care ligandul de tip bază Schiff coordinează pentadentat prin setul de atomi donori de electroni N_3O_2 completat de două molecule de apă coordinate în poziții apicale până la o geometrie în formă de bipiramidă pentagonală (fig. 1).

Tabelul 1

Date cristalografice și parametri de structură pentru $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$	
Formula empirică	$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{FeN}_{10}\text{O}_{15,5}$
Mr	724,38
Singonia	Triclinică
Grupul spațial	$P-1$
Z	2
$a(\text{\AA})$	10,2159(6)
$b(\text{\AA})$	11,9887(4)
$c(\text{\AA})$	12,2929(5)
$\alpha(\text{grad})$	86,478(3)
$\beta(\text{grad})$	89,905(4)
$\gamma(\text{grad})$	83,462(4)
$V(\text{\AA}^3)$	1492,92(12)
$D_c(\text{g/cm}^{-3})$	1,611
$\mu(\text{mm}^{-1})$	0,596
F(000)	748
Dimensiunile cristalului (mm^3)	0,5x0,25x0,18
Reflexele colectate/unice	9737/5553 [R(int) = 0,0220]
Parametri fitați	456
GOF on F^2	1,008
$R_1, wR_2 [I > 2\sigma(I)]$	0,0473; 0,1290
R_1, wR_2 (pentru toate reflexele)	0,0596; 0,1399

Distanțele interatomice din planul ecuatorial al poliedrului de coordinare al $\text{Fe}(\text{III})$ sunt următoarele, $\text{\AA}$: $\text{Fe}(1)-\text{O}(1) = 2,0717(19)$; $\text{Fe}(1)-\text{O}(2) = 2,0842(19)$; $\text{Fe}(1)-\text{N}(3) = 2,186(2)$; $\text{Fe}(1)-\text{N}(4) = 2,196(2)$; $\text{Fe}(1)-\text{N}(5) = 2,185(2)$, iar apical: $\text{Fe}(1)-\text{O}(1w) = 1,9979(19)$ și $\text{Fe}(1)-\text{O}(2w) = 2,0393(19)$. Datele structurale referitor la poziționarea atomilor de hidrogen din H_2L au evidențiat transferul de protoni de la atomii de azot $\text{N}(2)$ și $\text{N}(6)$ la atomii de azot heterociclici terminali ($\text{N}(1)$ și $\text{N}(7)$). Acest fapt este confirmat de unghiurile CNC din inelele piridinice de origine hidrazidică. Valoarea unghiului CNC al atomului $\text{N}(1)$ este $122,27^\circ$ și al $\text{N}(7)$ - $122,73^\circ$.

În cristal, pe lângă forțele electrostatice ce acționează între cationi și anioni, componentele sunt legate între ele printr-un sistem de legături de hidrogen intermoleculare (tab. 2).

Ca urmare se poate menționa formarea în cristal din cationii complecși a dimerilor centrosimetrice prin legăturile de hidrogen $\text{O}(w)-\text{H}\cdots\text{O}$, ca donor de proton fiind moleculele de apă coordinate $\text{O}(2w)$, iar acceptor – atomii de oxigen $\text{O}(2)$ ai liganzilor organici. Concomitent în cristal au fost stabilite un șir de legături de hidrogen de tipul $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ și $\text{O}(w)-\text{H}\cdots\text{O}$, care unesc cationii cu anionii și molecule de apă de cristalizare respectiv, iar ultimele sunt antrenate în legături de hidrogen atât între ele, cât și cu anionii NO_3^- . Structura cristalină este stabilizată suplimentar de un șir de legături intermoleculare fine de tipul $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}$.

Tabelul 2

Parametrii legăturilor de hidrogen din cristal					
D-H...A	Distanța interatomică, $\text{\AA}$			Unghiul DHA, grad	Transformarea simetrică pentru A
	D-H	H...A	D...A		
$\text{N}(1)-\text{H}(16)\cdots\text{O}(8)$	0,86	2,00	2,828(4)	162	x, y, z
$\text{N}(7)-\text{H}(11)\cdots\text{O}(9)$	0,86	1,98	2,801(4)	159	-x+1,-y+2,-z+2
$\text{O}(1w)-\text{H}(1w1)\cdots\text{O}(2)$	0,85	2,06	2,884(3)	161	-x+1,-y+2,-z+1
$\text{O}(1w)-\text{H}(2w1)\cdots\text{O}(3)$	0,85	2,11	2,710(4)	127	-x+1,-y+1,-z+1
$\text{O}(1w)-\text{H}(2w1)\cdots\text{O}(5)$	0,85	2,41	3,259(4)	174	-x+1,-y+1,-z+1

O(2w)-H(1w2)...O(7)	0,85	1,87	2,715(3)	169	-x+1,-y+1,-z+1
O(3w)-H(1w3)...O(4)	0,85	1,96	2,783(4)	164	x+1,y,z
O(3w)-H(2w3)...O(10)	0,85	1,99	2,822(4)	166	-x+1,-y+1,-z+1
O(3w)-H(2w3)...O(11)	0,85	2,52	2,945(4)	112	-x+1,-y+1,-z+1
O(4w)-H(1w4)...O(6)	0,98	1,81	2,754(5)	169	x,y,z+1
O(4w)-H(2w4)...O(3w)	0,98	1,98	2,865(4)	154	-x+1,-y+1,-z+1
O(5w)-H(1w5)...O(4w)	0,88	1,99	2,804(7)	155	x, y, z
O(5w)-H(1w5)...O(5w)	0,88	2,57	2,987(12)	112	-x,-y+1,-z+2
O(5w)-H(2w5)...O(4w)	0,87	2,31	3,132(8)	160	-x,-y+1,-z+2
O(5w)-H(1w5)...O(5w)	0,88	2,57	2,987(12)	112	-x,-y+1,-z+2

Exemplul 3. Evaluarea efectului complexului $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ în calitate de component al mediului nutritiv asupra activității lipolitice a tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 în cultura submersă.

- 5 Tulpina de fungi miceliali *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 se cultivă în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 0,75 L, care conține 0,2 L mediu nutritiv cu compoziția, g: făină de soia – 35,0; KH_2PO_4 – 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ – 0,005-0,015; apă potabilă până la 1,0 L, pH-ul inițial al mediului – 8,0. Mediul nutritiv se inoculează cu suspensie de spori și miceliu în cantitate de 5% v/v, obținută prin spălare cu apă distilată sterilă a culturii de 30 zile, crescută pe suprafețe înclinate de 10 malt-agar. Cultivarea se realizează în condiții de agitare continuă (200 rot. min^{-1}), timp de 48 ore, la temperatura de 28°C.

- Activitatea lipolitică maximală, determinată după gradul de hidroliză a suspensiei de ulei de măsline în alcool polivinilic până la acid oleic după metoda titrimetrică Otto-Iamada (Грачёва И.М. и др. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М., Лёгкая и пищ. пром., 1982, p.75-76), în variantele experimentale cu aplicarea compusului coordinativ $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ s-a marcat în prima zi de cultivare și a constituit 67246 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ la concentrația 0,005 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 49178 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, la concentrația 0,010 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, și 43216 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ la concentrația 0,015 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Maximul biosintezei se manifestă în varianta cu concentrația 0,005 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ și constituie 67246 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ față de 36800 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ maxima variantei martor în ziua a doua de cultivare și față de 58068 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ în varianta conform analogului proxim, depășind cu 83% proba martor și respectiv cu 16% nivelul analogului proxim. Spre deosebire de mediul variantei martor și cel proxim, aplicarea compusului coordinativ revendicat reduce ciclul de cultivare a 20 producătorului cu 24 ore (tab. 3).

Tabelul 3

Influența compusului coordinativ $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ asupra activității lipolitice a micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03

Mediul nutritiv studiat	Concentrația, mg/L	1-a zi		a 2-a zi		a 3-a zi	
		Activitatea, U/mL	%, de referință*	Activitatea, U/mL	%, față de martor	Activitatea, U/mL	%, față de martor
Cu biostimulator $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$	5	67246	281/183/116*	47368	129	5625	100,0
	10	49178	206/134	46632	127	5000	89
	15	43216	181/117	33440	91	5625	100,0
Martor (fără biostimulator)	-	23930	100,0	36800	100,0	5625	100,0
Mediul, conform analogului proxim	-	-	-	58068			

*281/183/116 - față de martorul zilei (1-a zi)/ față de valoarea maximă a martorului (ziua a 2-a)/ față de analogul proxim

Mulțumiri: Rezultatele incluse în brevetul de invenție au fost realizate în cadrul a două proiecte din „Programul de stat (2020-2023)”, finanțate de ANCD: 20.80009.5007.28 și 20.80009.5007.15.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 2458 F1 2004.05.31
2. MD 4532 B1 2017.11.30
3. MD 2709 F1 2005.02.28

(57) Revendicări:

1. Nitrat de 2,6-diacetilpiridin-bis(picolinoilhidrazon)-bis(aqua)fier(III)-hidrat(1/2,5) cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, în care H_2L reprezintă bis(picolinoilhidrazona) 2,6-diacetilpiridinei, care manifestă proprietăți de biostimulator al sintezei lipazelor la tulpina de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03.

2. Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, care conține făină de soia, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 și un biostimulator al sintezei lipazelor, **caracterizat prin aceea că** în calitate de biostimulator se utilizează compusul definit în revendicarea 1, în următorul raport cantitativ al ingredientelor, g:

făină de soia – 35,0;

KH_2PO_4 – 5,0;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0;

$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ – 0,005...0,015;

apă potabilă – până la 1 L.

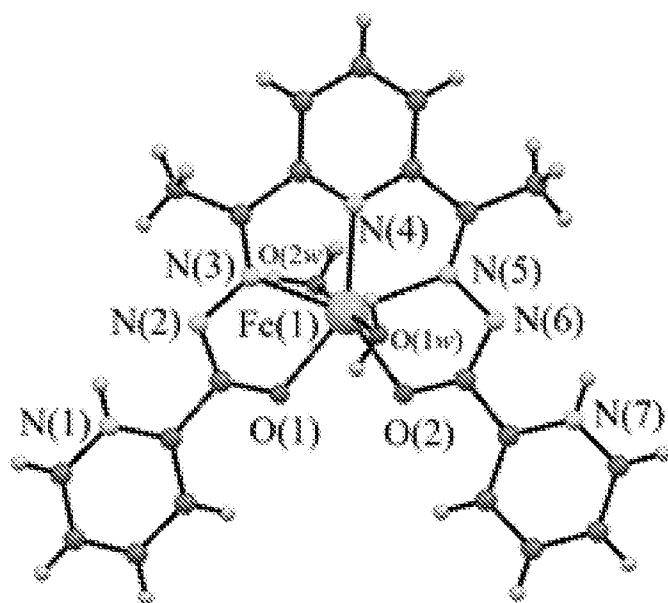


Fig. 1

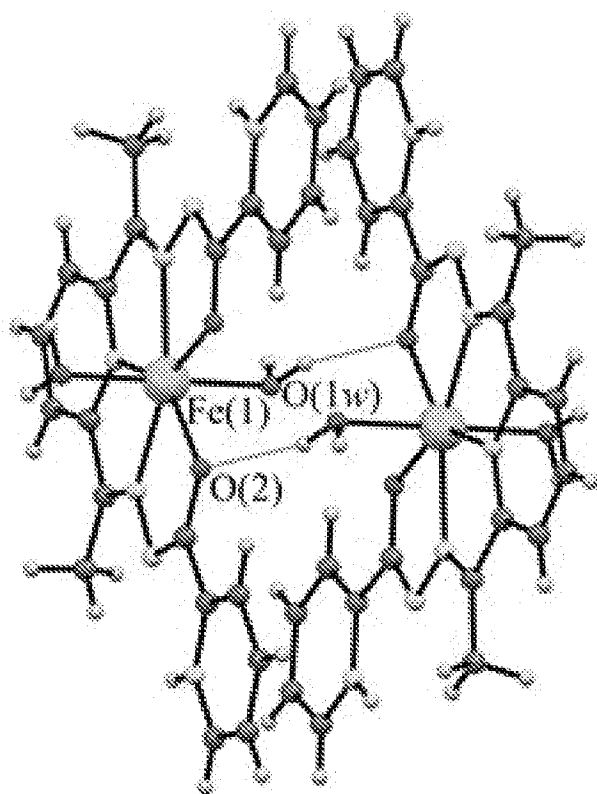


Fig. 2

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2021 0014 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2021.03.29 Raport de documentare internațională: ☐ da
 (71) Solicitant: **INSTITUTUL DE CHIMIE AL MEC, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD**
 (54) **Titlu: Nitrat de 2,6-diacetilpiridin-bis(picolinoilhidrazon)-bis(aqua)fier(III)–hidrat(1/2,5) cu proprietăți de stimulator al sintezei lipazelor la tulpina de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 și mediu nutritiv pentru cultivare**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C07D 213/86* (2006.01) *C12N 1/38* (2006.01)
C07D 213/50 (2006.01) *C12N 9/20* (2006.01)
C07F 15/02 (2006.01) *C12R 1/845* (2006.01)
C12N 1/14 (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 stânga/dreapta):

C07D 213/86 C07D 213/50 C07F 15/02 C12N 1/14 C12N 1/38 C12N 9/20 C12R 1/845

coordinativ, fier, bis(picolinoilhidrazona) 2,6-diacetilpiridinei, biostimulator, lipaze, *Rhizopus arrhizus*, mediu nutritiv

"Worldwide" (Espacenet):

C07D 213/86 C07D 213/50 C07F 15/02 C12N 1/14 C12N 1/38 C12N 9/20 C12R 1/845

Iron complex, 2,6-diacetylpyridine bis(picolinoylhydrazone), nitrate of 2,6-diacetylpyridine-bis(picolinoylhydrazone)-bis(aqua)iron(III)–hydrate(1/2,5), lipolytic enzymes, nutrient medium, *Rhizopus arrhizus*

EA, CIS (Eapatis):

C07D 213/86 C07D 213/50 C07F 15/02 C12N 1/14 C12N 1/38 C12N 9/20 C12R 1/845

Координационное соединение железа, бис(пиколиноилгидразон) 2,6-диацетилпиридина, биостимулятор, липазы, питательная среда, *Rhizopus arrhizus*

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

<https://scholar.google.com/>
<https://ardi.research4life.org/>

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	MD 2458 F1 2004.05.31	1, 2
A, D	MD 4532 B1 2017.11.30	1, 2
A, D, C	MD 2709 F1 2005.02.28	1, 2
A	MD 4645 B1 2019.08.31	1, 2
A	MD 2833 F1 2005.08.31	1, 2
A	MD 1748 F1 2001.09.30	1, 2

A	MD a 2019 0007 A2 2020.08.31	1, 2
A	MD a 2020 0002 A2 2020.08.31	1, 2
A	Alex Bonardi, Curzio Merlo, Corrado Pelizzi, Giancarlo Pelizzi, Pieralberto Tarasconi and Fabrizio Cavatorta. Synthesis, spectroscopic and structural characterization of mono- and bi-nuclear iron(III) complexes with 2,6-diacetylpyridine bis(acylhydrazones). Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, 1991, 4, p. 1063-1069, găsit în Internet la data 2022.04.27, URL: < https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1991/dt/dt9910001063 >.	1
A	Десятник А.А., Тюрина Ж.П., Клапко С.Ф., Стратан М.В., Лаблюк С.В., Болога О.А., Коропчану Э.Б., Рижка А.П., Булхак И.И. Некоторые аспекты биосинтеза внеклеточных гидролаз микромицетов из родов Rhizopus и Aspergillus в присутствии комплексных соединений кобальта(III) с фторсодержащими анионами. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științele vieții, nr. 1 (310), 2010, pag. 121-128, găsit în Internet la data 2022.06.20 URL: < https://ibn.idsi.md/ru/vizualizare_articol/238/gscholar >	1, 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, 2022.06.24

Examinator, LEVITCHI Svetlana