



MD 2837 G2 2005.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **2837** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/80 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2004 0229 (22) Data depozit: 2004.09.16	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2005.08.31, BOPI nr. 8/2005
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: DESEATNIC Alexandra, MD; CLAPCO Steliana, MD; DRUȚĂ Vadim, MD; TIURIN Jana, MD; LABLIUC Svetlana, MD; GRĂDINARU Julieta, MD; GĂRBĂLĂU Nicolae, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN
FD 04 P (variante)

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la medii nutritive pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P și poate fi aplicată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor pectolitice.

Se propun două variante de medii care conțin, g/L apă: borhot de sfeclă 25,0, făină de porumb 15,0, glucoză 1,0, sulfat de amoniu 1,0, sulfat de magneziu 0,7, sulfat de zinc 0,25 și compus coordinativ 0,01, având pH-ul 6,0, totodată în calitate de compus

2
coordinativ se utilizează conform unei variante [10-amino-3,8-dimetil-1-fenil-6-tiometil-4,5,7-triazaundeca-1,3,5,7,9-pentaen-1-onato(2-)]Ni(II) și conform
5 altei variante [9-(o-aminofenil)-4-metil-7-tiometil-5,6,8-triazanona-2,4,6,8-tetraen-2-onato(2-)]Cu(II).

Rezultatul constă în sporirea biosintezei enzimelor pectolitice și în reducerea duratei de cultivare a tulpinii.

10 Revendicări: 2

MD 2837 G2 2005.08.31

MD 2837 G2 2005.08.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologii microbiologice, în particular la medii de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P – producătoare de enzime pectolitice și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea pectinazelor, care pot fi utilizate în procesele tehnologice de prelucrare a materiei prime vegetale – la producerea sucurilor și conservelor din fructe și legume, în industria eterooleaginoasă, alimentară, farmaceutică, textilă, în cercetări științifice pentru obținerea protoplastelor stabile și viabile.

Pentru cultivarea tulpinilor fungice producătoare de enzime pectolitice de obicei se utilizează diferite modificări ale mediului Czapek, care conțin inductori ai sintezei pectinazelor (pectina sau diferite ingrediente naturale pectinocomponente – borhot de sfeclă, tescovină de mere, tărâțe de grâu etc.) și, în funcție de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii, diferiți biostimulatori [1].

În calitate de cea mai apropiată soluție s-a utilizat mediul cu următoarea componență (g·L⁻¹): borhot de sfeclă 25,0; făină de porumb 15,0; glucoză 1,0; (NH₄)₂SO₄ 1,0; ZnSO₄ 0,25; MgSO₄ 0,7; apă potabilă până la 1 L [2].

La cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P pe mediul menționat, timp de 96 ore, la temperatura de 28...30°C, în condiții de agitare continuă, lichidul cultural manifestă activitate pectolică de 860,0 U·mL⁻¹.

Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în faptul că pe acest mediu nu se realizează pe deplin potențialul biosintetic al tulpinii și biosinteza enzimelor pectolitice nu atinge valoarea maximă.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P, care să asigure sporirea capacității biosintetice a producătorului.

Esența invenției constă în aceea că se propun două variante de medii nutritive pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P, care suplimentar la componentele mediului proxim conțin unul din compuși coordinați din clasa tiosemicarbazonelor: compusul 1 – [10-amino-3,8-dimetil-1-fenil-6-tiometil-4,5,7-triazaundeca-1,3,5,7,9-pentaen-1-onato-(2)] Ni(II) sau compusul 2 – [9-(o-aminofenil)-4-metil-7-tiometil-5,6,8-triaznona-2,4,6,8-tetraen-2-onato (2-)]Cu(II), în următorul raport cantitativ al elementelor, g·L⁻¹: borhot de sfeclă 25,0; făină de porumb 15,0; glucoză 1,0; (NH₄)₂SO₄ 1,0; ZnSO₄ 0,25; MgSO₄ 0,7; compusul 1 sau compusul 2 0,010; apă potabilă până la 1 L, pH 6,0.

Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei enzimelor pectolitice cu 58,07...74,0% față de cea mai apropiată soluție și în posibilitatea reducerii duratei de cultivare a tulpinii.

Efectul biostimulator al compușilor coordinați este cauzat de proprietatea microelementelor de a se implica activ la coordonarea și desfășurarea reacțiilor metabolice extrem de fine și complicate.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Tulpina *Penicillium viride* CNMN FD 04 P s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 L, care conțineau 0,1 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție (g·L⁻¹): (NH₄)₂SO₄ 1,0; ZnSO₄ 0,25; MgSO₄ 0,7; glucoză 1,0; făină de porumb 15,0; borhot de sfeclă 25,0; compusul 1 0,010; apă potabilă până la 1 L; pH 6,0. Cultivarea s-a efectuat timp de 72 ore, la temperatura de 30°C, în condiții de agitare continuă (180 rot. · min⁻¹).

Activitatea pectolică în lichidul cultural s-a determinat prin metoda interferometrică și peste 72 ore de cultivare (cu 24 ore mai devreme decât pe mediul proxim) a constituit 1359,4 U·mL⁻¹, ceea ce depășea cu 58,07% activitatea fixată la cultivarea tulpinii pe mediul proxim.

Metoda de obținere a compusului 1: Soluția de Ni(OAc)₂ · 4H₂O (0,25 g, 1,0 mmol) în metanol (10 cm³) și 0,35 cm³ (2,5 mmol) trietilamină au fost adăugate consecutiv la soluția obținută prin dizolvarea în metanol (10 cm³) a mono-S-metilzotiosemicarbazonei 1-fenil-butan-1,3-dionei (0,25 g, 1,0 mmol) și 4-amino-3-penten-2-onei (0,10 g, 1,0 mmol). Soluția astfel obținută a fost încălzită în reflux timp de 1 oră, apoi lăsată să se răcească până la temperatura camerei. Precipitatul format a fost filtrat, spălat cu metanol și eter dietilic, uscat la aer.

Exemplul 2

Tulpina *Penicillium viride* CNMN FD 04 P s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 L, care conțineau 0,1 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție (g·L⁻¹): (NH₄)₂SO₄ 1,0; ZnSO₄ 0,25; MgSO₄ 0,7; glucoză 1,0; făină de porumb 15,0; borhot de sfeclă 25,0; compusul 2 0,010; apă potabilă până la 1 L; pH 6,0. Cultivarea s-a efectuat timp de 96 ore, la temperatura de 28°C, în condiții de agitare continuă (180 rot. · min⁻¹).

Activitatea pectolică determinată în lichidul cultural a constituit 1496,35 U·mL⁻¹, ceea ce depășea cu 74,0% activitatea fixată la cultivarea tulpinii pe mediul proxim.

MD 2837 G2 2005.08.31

4

5 Metoda de obținere a compusului 2: Trietilamina ($1,0 \text{ cm}^3$) și soluția de $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($0,20 \text{ g}$, $1,0 \text{ mmol}$) în metanol (40 cm^3) au fost adăugate la soluția hidroidurii mono-S-metilizotiosemicarbazonei pentan-2,4-dionei ($0,317 \text{ g}$, $1,0 \text{ mmol}$) și 2-aminobenzaldehidei ($0,12 \text{ g}$, $1,0 \text{ mmol}$) în metanol (20 cm^3). Soluția obținută a fost încălzită în reflux timp de 1 oră, apoi lăsată să se răcească până la temperatura camerei. Cristalele de culoare roșie-închisă au fost filtrate, spălate cu metanol și eter dietilic, uscate la aer.

10

(57) Revendicări:

1. Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P, care conține borhot de sfeclă, făină de porumb, glucoză, sulfat de amoniu, sulfat de magneziu, sulfat de zinc și apă, având pH-ul 6,0, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține compusul coordinativ [10-amino-3,8-dimetil-1-fenil-6-tiometil-4,5,7-triazaundeca-1,3,5,7,9-pentaen-1-onato(2-)]Ni(II), componentele fiind luate în următorul raport, g/L de apă:

15	borhot de sfeclă	25,0
	făină de porumb	15,0
	glucoză	1,0
20	sulfat de amoniu	1,0
	sulfat de magneziu	0,7
	sulfat de zinc	0,25
	compus coordinativ	0,01.

2. Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P, care conține borhot de sfeclă, făină de porumb, glucoză, sulfat de amoniu, sulfat de magneziu, sulfat de zinc și apă, având pH-ul 6,0, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține compusul coordinativ [9-(o-aminofenil)-4-metil-7-tiometil-5,6,8-triazanona-2,4,6,8-tetraen-2-onato(2-)]Cu(II), componentele fiind luate în următorul raport, g/L de apă:

30	borhot de sfeclă	25,0
	făină de porumb	15,0
	glucoză	1,0
	sulfat de amoniu	1,0
	sulfat de magneziu	0,7
	sulfat de zinc	0,25
35	compus coordinativ	0,01.

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 1748 F1 30.09.2001
2. MD 2613 F1 30.11.2004

Director Departament:

CRECETOV Veaceslav

Examinator:

GUȘAN Ala

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2004 0229	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2004.09.16	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.: 32) data : 33) țara : (51) ⁷ : C 12 N 1/14, (C 12 N 1/14, C 12 R 1:80), 1/38 // C 12 N 9/24 Alți indici de clasificare: Titlul : Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi <i>Penicillium viride</i> CNMN FD 04 P (variante) (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : mediu nutritiv, tulpina de fungi <i>Penicillium viride</i> , compus coordinativ, semicarbazone	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))	
MD 1994-2004, EA 1996-2004, SU 1970-1992 Int. Cl. ⁷ C 12 N 1/14, (C 12 N 1/14, C 12 R 1:80), 1/38 // C 12 N 9/24	
II. Documente considerate ca relevante	
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente
A A	MD 1748 F1 30.09.2001 MD 2613 F1 30.11.2004
Numărul revendicării vizate	
1,2 1,2	
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II	
☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează	
* categoriile speciale ale documentelor consultate:	
A - document care definește stadiul anterior general	T - 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 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 determinarea datei 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 cand 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 finalizării documentării	21.06.2005
Examinatorul	Gușan Ala