



MD 2836 G2 2005.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **2836** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl. Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/685 (2006.01)
C12N 9/30 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2004 0226 (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; CONDRUC Viorica, MD; BOLOGA Olga, MD; TIURIN Jana, MD; GĂRBĂLĂU Nicolae, MD; LABLIUC Svetlana, MD; STRATAN Maria, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) **Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de funghi *Aspergillus niger* 33
CNMN FD 06a**

(57) **Rezumat:**

Invenția se referă la biotehnologie, în particular
la un mediu de cultivare a tulpinii de funghi *Asper-*
gillus niger 33 CNMN FD 06a și poate fi aplicată în
industria microbiologică pentru obținerea enzimelor
amilolitice.

Mediul nutritiv, conform invenției, conține, g/L
apă: amidon 3,0, făină de fasole 9,0, tărâțe de grâu

5 18,0, KH_2PO_4 2,0, KCl 0,5, MgSO_4 0,5 și
[Co(DH)₂tiO₂]BF₄·3H₂O 0,005...0,040, având pH-ul
inițial 5,0.

Rezultatul constă în sporirea activității amilo-
litice și în reducerea duratei de cultivare a tulpinii.

Revendicări: 1

MD 2836 G2 2005.08.31

MD 2836 G2 2005.08.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un mediu de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus niger* (33) CNMN FD 06a și poate fi aplicată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor amilolitice.

5 Pentru obținerea enzimelor amilolitice în calitate de producători sunt utilizați funghi din genul *Aspergillus*. Un interes deosebit prezintă tulpina *Aspergillus niger* (33) CNMN FD 06a, datorită însușirii de a sintetiza nu numai amilaze tipice, dar și acid stabile, capabile să activeze în mediile cu aciditate sporită (pH 2,5), fapt care sporește valoarea practică a tulpinii.

10 Pentru cultivarea tulpinilor fungice – producătoare de amilaze, sunt cunoscute mediile care conțin săruri minerale, amidon, făină de fasole sau porumb, KCl, K₂HPO₄, NaNO₃, MgSO₄ [1]. Dezavantajul acestor medii constă în activitatea amilolitică joasă a producătorilor la cultivarea lor pe aceste medii.

15 Cel mai apropiat după compoziție și rezultatul obținut pentru cultivarea tulpinii *Aspergillus niger* (33) este mediul nutritiv cu următorul raport al ingredientelor (g): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH₂PO₄ – 2,0, KCl – 0,5, MgSO₄ – 0,5, apă potabilă până la 1 L, pH-ul inițial – 5,0 [2]. Activitatea amilolitică la cultivarea tulpinii pe acest mediu constituie 96,4 U/mL în condiții standard de hidroliză (pH 4,7) și 91,2 U/mL în condiții extremale acide (pH 2,5).

Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că nu asigură realizarea deplină a capacității biosintetice a tulpinii, activitatea amilolitică rămânând relativ mică.

20 Problema pe care o soluționează invenția este crearea unui mediu nutritiv nou ce permite sporirea capacității biosintetice a producătorului.

Mediul nutritiv, conform invenției, conține, g/L de apă: amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH₂PO₄ – 2,0, KCl – 0,5, MgSO₄ – 0,5, [Co(DH)₂ thio₂] · BF₄ · 3H₂O – 0,005 ... 0,040, pH-ul inițial al mediului – 5,0.

25 Rezultatul constă în sporirea activității amilolitice a tulpinii *Aspergillus niger* 33 la cultivarea pe mediul elaborat aproximativ de 2 ori și reducerea duratei de cultivare cu 24 ore în comparație cu cea mai apropiată soluție.

30 Acțiunea stimulatorie este cauzată de însușirea compușilor coordinați ai metalelor de a regula metabolismul microorganismelor, cât și de prezența în componența lor a elementelor chimice indispensabile pentru creșterea și dezvoltarea microorganismelor. Un alt avantaj al invenției îl constituie faptul că utilizarea compusului coordinați [Co(DH)₂ thio₂] · BF₄ · 3H₂O (CC) face posibilă programarea compoziției complexului amilolitic privind raportul amilaze tipice: amilaze acid stabile.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

35 Se pregătește mediul nutritiv cu următoarea compoziție (g/L): amidon – 3,0, făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH₂PO₄ – 2,0, KCl – 0,5, MgSO₄ – 0,5, [Co(DH)₂thio₂] · BF₄ · 3H₂O – 0,040; apă potabilă până la 1 L; pH-ul inițial al mediului – 5,0. Mediul pregătit se repartizează câte 0,2 L în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 1,0 L și se sterilizează la temperatura de 120°C, presiunea de 1 atm., timp de 1 oră. După răcirea până la temperatura camerei (25...28°C) mediul nutritiv se

40 însămânțează în baloane cu suspensie de spori ai tulpinii *Aspergillus niger* 33 în doză de 10 mL cu densitatea de 10⁶ spori/mL.

Cultivarea se efectuează în condiții de agitare continuă (180 rot/min), la temperatura de 30°C, timp de 5 zile.

45 Activitatea amilolitică în lichidul cultural a constituit 224,22 U/mL, în condiții standard de hidroliză a substratului (pH 4,7) și 149,95 U/mL, în condiții acide de hidroliză (pH 2,5), ceea ce depășește de 2,2 ori activitatea amilazelor tipice (pH 4,7) și de 1,9 ori activitatea amilazelor acid stabile fixată la cultivarea tulpinii pe mediul din cea mai apropiată soluție (tab. 1).

MD 2836 G2 2005.08.31

4

Tabelul 1

5 Influența compusului coordinativ $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot \text{thio}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ * asupra duratei cultivării micromicetei *Aspergillus niger* (33) CNMN FD 06a (concentrația CC 40 mg/L)

Durata cultivării, zile	PH-ul mediului	Activitatea amilolitică (pH 4,7), U/mL		Activitatea amilolitică (pH 2,5), U/mL	
		martor	experiment	martor	experiment
1	4,80	3,65	5,99	5,61	6,63
2	3,85	3,91	5,78	5,10	6,12
3	5,45	40,33	54,60	20,33	51,70
4	5,90	52,08	120,69	26,60	96,69
5	7,00	80,79	224,22	68,02	149,95
6	7,20	101,42	138,69	79,63	114,83
7	7,5	54,90	10,20	60,15	4,08

10 * La soluția de 0,34 g (0,001 moli) $\text{Co}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ în 10 mL de apă se adaugă 0,23 g (0,002 moli) dimetilgloximă în 20 mL de metanol și 0,15 g (0,002 moli) tiocarbamidă în 10 mL apă. Amestecul se încălzește la aer timp de 5 min și se lasă pentru evaporare lentă la temperatura camerei.

Se sedimentează cristale de culoare cafenie închisă sub formă de prisme neregulate, care sunt filtrate și uscate la aer. Randamentul: ~ 55%. Substanța este solubilă în apă, metanol și etanol.

găsit, %: Co 9,86; C 20,24; H 4,80; N 19,17.

Pentru $\text{C}_{10}\text{H}_{28}\text{CoF}_4\text{N}_8\text{O}_7\text{S}_2\text{B}$.

15 calculat, %: Co 10,12; C 20,63; H 4,85; N 19,25.

Exemplul 2

20 Se pregătește mediul nutritiv cu următoarea compoziție (g/L): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH_2PO_4 – 2,0; KCl – 0,5; MgSO_4 – 0,5; $[\text{Co}(\text{DH})_2 \text{thio}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; apă potabilă până la 1 L; pH-ul inițial al mediului – 5,0. Mediul pregătit se repartizează câte 0,2 L în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 1,0 L și se sterilizează la temperatura de 120°C, presiunea de 1 atm, timp de 1 oră. După răcirea până la temperatura camerei (25...28°C) mediul nutritiv se însămânțează în baloane cu suspensie de spori ai tulpinii *Aspergillus niger* 33 în doză de 10 mL cu densitatea de 10^6 spori/mL.

25 Cultivarea se efectuează în condiții de agitare continuă (180 rot/min), la temperatura de 30°C, timp de 5 zile.

Activitatea amilolitică în lichidul cultural obținut a constituit 158,09 U/mL, în condiții standard de hidroliză a substratului (pH 4,7) și 72,78 U/mL, în condiții acide de hidroliză (pH 2,5), ceea ce depășește respectiv cu 58,07% activitatea amilazelor tipice obținută la cultivarea tulpinii pe mediul din cea mai apropiată soluție și reduce conținutul amilazelor acid stabile (tab. 2).

Tabelul 2

30 Influența compusului coordinativ $[\text{Co}(\text{DH})_2 \text{thio}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ asupra activității amilolitice a tulpinii fungice *Aspergillus niger* (33) CNMN FD 06a (durata cultivării 5 zile – 120 ore)

Concent. CC, mg/L	Activitatea amilolitică (pH 4,7)		Activitatea amilolitică (pH 2,5)	
	U/mL	% față de martor	U/mL	% față de martor
1	153,16	137,19	95,29	106,20
5	158,09	141,65	72,78	81,00
10	145,90	130,73	118,08	131,80
40	149,72	134,15	131,27	146,63
martor	111,61	100,00	89,73	100,00

35

MD 2836 G2 2005.08.31

5

(57) Revendicare:

5 Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de funghi *Aspergillus niger* 33 CNMN FD 06a, care conține amidon, făină de fasole, tărâțe de grâu, KH_2PO_4 , KCl, MgSO_4 și apă, având pH-ul inițial 5,0, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține $[\text{Co}(\text{DH})_2\text{thio}_2]\text{BF}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, componentele fiind luate în următorul raport, g/L de apă:

	amidon	3,0
	făină de fasole	9,0
	tărâțe de grâu	18,0
10	KH_2PO_4	2,0
	KCl	0,5
	MgSO_4	0,5
	$[\text{Co}(\text{DH})_2\text{thio}_2]\text{BF}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,005...0,040.

15

(56) Referințe bibliografice:

1. SU 1158579 A 1985.05.30
2. Fiziologia și biochimia plantelor la început de mileniu: realizări și perspective. Materialele Congresului II al Societății de Fiziologie și Biochimie Vegetală din Republica Moldova, Chișinău, 2002, p. 233

Director Departament: CRECETOV Veaceslav

Examinator: GUȘAN Ala

Redactor: LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2004 0226	(85) Data fazei naționale PCT:	
(22) Data depozit: 2004.09.16	(86) Cerere internațională PCT:	
<p>Prioritatea invocată :</p> <p>(31) nr.: 32) data : 33) țara :</p> <p>(51)⁷ : C 12 N 1/14 , (C 12 N 1/14, C 12 R 1:685)// C12 N 9/30</p> <p>Alți indici de clasificare:</p> <p>Titlul : Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi <i>Aspergillus niger</i> 33 CNMN FD 06a</p> <p>(71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD</p> <p>Termeni caracteristici :</p> <p>mediu nutritiv, tulpină de fungi <i>Aspergillus niger</i> 33 CNMN FD 06a, bis-dimetilglioximați</p>		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
MD 1994-2004, EA 1996-2004, SU1970-1994		
Int. Cl. ⁷ C 12 N 1/14 , (C 12 N 1/14, C 12 R 1:685)// C12 N 9/30		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	SU 1158579 A 1985.05.30	1
A	MD 2363 F1 2004.01.31	1
A	Fiziologia și biochimia plantelor la început de mileniu: realizări și perspective. Materialele Congresului II al Societății de Fiziologie și Biochimie Vegetală din Republica Moldova, Chișinău, 2001, p. 232...237	1
<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 de depozit dar după data priorității invocate
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 evidența 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	16.06.2005	
Examinatorul	Gușan Ala	