



MD 2340 G2 2003.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2340** (13) **G2**
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/14

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2002 0258 (22) Data depozit: 2002.10.24	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.12.31, BOPI nr. 12/2003
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: DESEATNIC-CILOCI Alexandra, MD; PAȘA Lilia, MD; GULEA Aurelian, MD; RUDIC Valeriu, MD; TIURIN Jana, MD; LABLIUC Svetlana, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fung *Aspergillus flavus* VKM F
3292 D, producătoare de celulaze și xilanază

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la microbiologie, în particular
la un mediu de cultivare a fungului microscopic
Aspergillus flavus VKM F 3292 D, producător de
celulaze și xilanază și poate fi utilizată în industria
microbiologică, alimentară, eterooleaginoasă și
farmaceutică.

Mediul, conform invenției, conține, în g/L:
coardă de viță de vie - 10,0; borhot de sfeclă - 10,0;
melasă - 10,0; MgSO₄ - 0,50; NaNO₃ - 3,00; KCl -
0,50; FeSO₄·7H₂O - urme; α-picolinat de cobalt(III)
(Co(PC)₃·H₂O) - 0,0048...0,0050; apă - restul.

2
5 Rezultatul invenției constă în sporirea biosin-
tezei xilanazei, endoglucanazei, celobiohidrolazei și
β-glucozidazei.
Revendicări: 1

10

15

MD 2340 G2 2003.12.31

MD 2340 G2 2003.12.31

3

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie, în particular la un mediu de cultivare a fungului microscopic *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D, producător de celulaze și xilanază și poate fi aplicată în industria microbiologică, alimentară, eterooleaginoasă, farmaceutică.

5 Pentru cultivarea fungului *Aspergillus flavus* VKM F 3239 D, producător de celulaze și xilanaze, este cunoscut mediul care conține borhot de sfeclă și coarde de viță de vie, săruri minerale și un biostimulator de origine chimică [1].

Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că facilitează biosinteza numai a două componente (xilanazei și β -glucozidazei) ale complexului enzimatic produs de tulpina indicată, lăsând la nivel 10 insuficient biosinteza endoglucanazelor și celobiohidrolazelor – componente importante pentru hidroliza materialelor vegetale bogate în celuloză.

În calitate de cea mai apropiată soluție s-a utilizat mediul de cultivare a tulpinii *Aspergillus flavus* VKM F3239D cu următoarea compoziție (g): coardă de viță de vie – 10,0; borhot de sfeclă – 10,0; 15 $MgSO_4$ – 0,5; $NaNO_3$ – 3,0; KCl – 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – urme, melasă – 10,0; apă până la 11; pH-ul inițial 4,5...5,0 [2].

Dezavantajele celei mai apropiate soluții constau în faptul că mediul nu asigură realizarea pe deplin a potențialului tulpinii de a biosintetiza celulaze și xilanaze și randamentul componentelor complexului enzimatic nu atinge cota maximă.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv de cultivare 20 a tulpinii *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D, care să asigure sporirea biosintezei a celor patru componente ale complexului enzimatic: endoglucanaza, celobiohidrolaza, β -glucozidaza și xilanaza.

Esența invenției constă în aceea că mediul nutritiv propus de cultivare a tulpinii de fung *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D, producător de celulaze și xilanaze, conține coardă de viță de vie și borhot de sfeclă, uscate și mărunțite, melasă, sulfat de magneziu ($MgSO_4$), azotat de sodiu ($NaNO_3$), 25 clorură de potasiu (KCl), sulfat de fier hidrat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), apă și suplimentar compusul coordinativ α -picolinat de cobalt(III) ($Co(PC)_3 \cdot H_2O$) în următorul raport cantitativ, g:

coardă de viță de vie	10,0
borhot de sfeclă	10,0
melasă	10,0
$MgSO_4$	0,5
$NaNO_3$	3,0
KCl	0,5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	urme
$Co(PC)_3 \cdot H_2O$	0,0048...0,0050
apă	până la un litru.

Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei xilanazelor cu 23,14%, endoglucanazelor cu 13,33%, celobiohidrolazelor cu 41,30% , β -glucozidazelor cu 21,45% (rezultatele obținute sunt 30 prezentate în tabel).

Rezultatul obținut este condiționat de faptul că adăugarea în mediul nutritiv a compusului coordinativ $Co(PC)_3 \cdot H_2O$ în calitate de biostimulator activează procesele metabolice, care decurg în microorganismul dat.

35

Denumirea enzimelor	Numărul de probe	Concentrația biostimulatorului (g/L)	Activitatea (u/mL)		% față de soluția cea mai apropiată
			Control	Experiență	
Xilanaze	10	0,005	3,37 $\pm$ 0,23	4,15 $\pm$ 0,16	123,14
Endoglucanaze	10	0,005	0,36 $\pm$ 0,18	0,41 $\pm$ 0,14	113,33
Celobiohidrolaze	10	0,005	0,26 $\pm$ 0,13	0,37 $\pm$ 0,09	141,30
β -glucozidaze	10	0,005	0,31 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,07	121,45

Exemplu de realizare a invenției

1. Tulpina *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D se cultivă în baloane Erlenmayer de 0,75 L în care se introduc 0,2 L mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (200 rot./min) la temperatura de 40 28...30°C, timp de 120 ore.

MD 2340 G2 2003.12.31

4

Compoziția mediului (g):

coardă de viță de vie	10,0
borhot de sfeclă	10,0
melasă	10,0
MgSO ₄	0,5
NaNO ₃	3,0
KCl	0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	urme
Co(PC) ₃ · H ₂ O	0,005
apă	până la un litru
pH-ul inițial al mediului	4,5.

- 5 Activitatea enzimelor în lichidul cultural s-a determinat prin dozarea zaharurilor reductoare în urma acțiunii acestuia asupra substraturilor specifice. În calitate de astfel de substratuti au servit: xilanul de ovăz pentru xilanaze, Na – carboximetilceluloza pentru endoglucanaze, hârtia de filtru pentru celobiohidrolaze, p-nitrofenil-β-D-glicopiranozidul pentru β-glucozidaze.

- 10 După 120 ore de cultivare în varianta în care lipsea buostimulatorul Co(PC)₃ · H₂O activitatea xilanazelor a constituit 3,910 u/mL, endoglucanazelor – 0, 351 u/mL, celobiohidrolazelor – 0,267 u/mL, iar a β-glucozidazelor – 0,302 u/mL.

În varianta mediului propus cu adăugarea Co(PC)₃ · H₂O în concentrație de 0,005 g/L activitatea xilanazică a constituit 4,210 u/mL, endoglucanazică – 0,410 u/mL, celobiohidrolazică – 0,372 u/mL, β-glucozidazică – 0,380 u/mL.

- 15 2. Tulpina *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D se cultivă în baloane Erlenmayer de 0,75 L în care se introduce 0,2 L mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (200 rot./min) la temperatura 28°C, timp de 120 ore.

Compoziția mediului (g):

coardă de viță de vie	10,0
borhot de sfeclă	10,0
melasă	10,0
MgSO ₄	0,5
NaNO ₃	3,0
KCl	0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	urme
Co(PC) ₃ · H ₂ O	0,0048
apă	până la un litru
pH-ul inițial al mediului	5.

- 20 În varianta celei mai apropiate soluții în care lipsea biostimulatorul Co(PC)₃ · H₂O activitatea xilanazică a constituit 3,390 u/mL, endoglucanazică – 0,362 u/mL, celobiohidrolazică – 0, 259 u/mL, β-glucozidazică – 0, 306 u/mL.

În varianta optimizată cu adaos de Co(PC)₃ · H₂O în concentrație de 0,0048 g/L activitatea xilanazică a constituit 4,190 u/mL, endoglucanazică – 0,412 u/mL, celobiohidrolazică – 0, 368 u/mL, β-glucozidazică – 0,379 u/mL.

- 25

MD 2340 G2 2003.12.31

5

(57) Revendicare:

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fung *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D, producătoare de celulaze și xilanază care conține coardă de viță de vie și borhot de sfeclă uscate și mărunțite, melasă, MgSO₄, NaNO₃, KCl, FeSO₄·7H₂O și apă, având pH-ul inițial al mediului 4,5...5,0, caracterizat prin aceea că conține suplimentar α-picolinat de cobalt(III) (Co(PC)₃·H₂O), ingredientele fiind luate în următorul raport, g/L:

	coardă de viță de vie	10,0
	borhot de sfeclă	10,0
10	melasă	10,0
	MgSO ₄	0,50
	NaNO ₃	3,00
	KCl	0,50
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	urme
15	Co(PC) ₃ ·H ₂ O	0,0048...0,0050
	apă	restul.

20

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 1987 G2 2003.04.30
2. MD 356 G2 1996.09.30

Director-adjunct
Departament:

JOVMIR Tudor

Examinator:

GUȘAN Ala

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2002 0258	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2002.10.24	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.: 32) data : 33) țara : (51) ⁷ : C 12 N 1/14 Alți indici de clasificare: Titlul : Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fung <i>Aspergillus flavus</i> VKM F 3292 D - producătoare de celuloze și xilanaze (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : mediu de cultură, tulpină de fung <i>Aspergillus flavus</i> VKM F 3292 D	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7)	
MD 1993-2002, EA1996-2002, SU 1970-1991)	
Int. Cl. ⁷ C 12 N 1/14	
II. Documente considerate ca relevante	
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente
A A	MD 1987 G2 2003.04.30 MD 356 G2 1996.09.30
	Numărul revendicării vizate
	1 1
☐ 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 când 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	04.08.2003
Examinatorul	Gușan Ala

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4