



MD 1987 G2 2002.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1987 (13) G2  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 12 N 1/14;  
C 12 R 1/645

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2000 0158  
(22) Data depozit: 2000.09.22

(45) Data publicării hotărârii de  
acordare a brevetului:  
2002.08.31, BOPI nr. 8/2002

(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII  
MOLDOVA, MD

(72) Inventatori: DESEATNIC Alexandra, MD; TIURIN Jana, MD; LABLIUC Svetlana, MD; RUDIC Valeriu,  
MD; CEAPURINA Ludmila, MD

(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII  
MOLDOVA, MD

(54) Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D* (variante)

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D* - producător de enzime hidrolitice extracelulare și poate fi utilizată în industriile microbiologică, alimentară, etero-oleaginoasă și farmaceutică.

Esența invenției constă în aceea că se propun 3 variante ale mediilor nutritive de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, care conțin coarde de viț de vie, borhot de sfeclă uscate

5 și mărunțițe, melasă, MgSO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O și apă de robinet.

Noutatea invenției constă în aceea că în calitate de stimulatori de creștere mediile suplimentar conțin compușii coordinați: Zn(D-Ser)<sub>2</sub>, Zn(D-Ala)<sub>2</sub>, Zn(L-Ala)<sub>2</sub>.

10 Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei β-glucozidazelor și xilanazelor.

Revendicări: 3

15

MD 1987 G2 2002.08.31

## MD 1987 G2 2002.08.31

### Descriere:

3

Invenția se referă la biotehnologii microbiologice, în particular la mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D* – producător de enzime lipolitice folosite la dezintegrarea țesuturilor vegetale, și poate fi utilizată în industriile microbiologică, alimentară, eterooleaginoasă, farmaceutică.

5 Pentru obținerea enzimelor hidrolitice este cunoscut mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D* cu următoarea compoziție (g): coarde de viță de vie – 10,0; MgSO<sub>4</sub> – 0,5; NaNO<sub>3</sub> – 3,0; KCl – 0,5; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,01; melasă – 10,0; apă de robinet până la 1,0 L; pH inițial – 4,5...5,0 [1].

10 Dezavantajul acestui mediu constă în randamentul scăzut al unor componente ale complexului enzimatic hidrolitic (β-glucozidaze – 0,31 U/mL și xilanaze – 3,37 U/mL), sintetizat de tulpina de fungi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, care nu asigură realizarea deplină a potențialului ei biosintetic.

15 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv de cultivare care să asigure sporirea capacității biosintetice a tulpinii de fungi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, în special sporirea biosintezei β-glucozidazelor și xilanazelor - componente importante ale complexului enzimatic hidrolitic în vederea dezintegrării profunde a materialelor vegetale.

20 Esența invenției constă în faptul că se propune un mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, (variante), care conține coarde de viță de vie uscate și mărunțite, borhot de sfeclă uscat și mărunțit, melasă, sulfat de magneziu (MgSO<sub>4</sub>), azotat de sodiu (NaNO<sub>3</sub>), clorură de potasiu (KCl), sulfat de fier hidrat (FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O), apă de robinet, în care suplimentar, în calitate de stimulatori ai biosintezei β-glucozidazelor și xilanazelor se adaugă unul din compușii coordinați ai Zn(II) cu aminoacizi, la concret:

Varianta 1: compusul coordinațiv Zn(D-Ser)<sub>2</sub> în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde de viță de vie	10,0
Borhot de sfeclă	10,0
Melasă	10,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	3,0
KCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,01
Zn(D-Ser) <sub>2</sub>	0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

25 Varianta 2: compusul coordinațiv Zn(L-Ala)<sub>2</sub> în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde de viță de vie	10,0
Borhot de sfeclă	10,0
Melasă	10,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	3,0
KCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,01
Zn(L-Ala) <sub>2</sub>	0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

Varianta 3: compusul coordinațiv Zn(D-Ala)<sub>2</sub> în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde de viță de vie	10,0
Borhot de sfeclă	10,0
Melasă	10,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	3,0
KCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,01
Zn(D-Ala) <sub>2</sub>	0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

Rezultatul invenției constă în sporirea productivității biosintezei β-glucozidazelor cu 49,67...65,91% și a xilanazelor cu 52,22...64,98% față de cea mai apropiată soluție.

30 Pe lângă aceasta invenția mai prezintă și următoarele avantaje: posibilitatea sintezei orientate a complexului enzimatic hidrolitic cu compoziție programată în concordanță cu componența materialului supus hidrolizei; posibilitatea utilizării a 3 variante de medii nutritive echivalente după efect pentru cultivarea tulpinii de fungi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*.

## MD 1987 G2 2002.08.31

4

Efectul biostimulator este condiționat de însușirea elementelor chimice indispensabile care intră în compoziția compușilor coordinați: Zn(II), aminoacizii, de a regla metabolismul microorganismelor (Дедюхина Э.Г., Ерошин В.Л. Незаменимые химические элементы в регуляции метаболизма микроорганизмов. Успехи микробиологии. Наука, Москва, 1992, с. 126-142).

5 *Exemple de realizare a invenției*

1. Pentru cultivarea tulpinii de fungi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D* în 10 baloane Erlenmayer cu volumul de 750 ml s-au introdus câte 200 ml mediu de nutriție cu următoarea compoziție, g:

Varianta 1:

Coarde de viță de vie	10,0
Borhot de sfeclă	10,0
Melasă	10,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	3,0
KCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,01
Zn(D-Ser) <sub>2</sub>	0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

10 Cultivarea s-a realizat în condiții de agitare continuă (200 rot./min) la temperatura de 28°C, timp de 96 h, valoarea inițială a pH – 4,5.

Activitatea β-glucozidazelor s-a determinat după acțiunea asupra substratului p-nitrofenil β-D-glucopiranozid, activitatea xilanazelor – după acțiunea asupra xilanului de ovăz prin dozarea substanțelor reducătoare acumulate în mediu de reacție (Исмаилова Д.Ю., Логинова Л.Т. Влияние некоторых веществ на биосинтез целлюлозы термотолерантного гриба *Aspergillus terreus*. Прикладная биохим. и микробиол., т. XI, вып. 5, 1975, с. 676-677).

15 După 96 h de cultivare în varianta celei mai apropiate soluții activitatea xilanazelor a constituit 3,37 U/mL, iar β-glucozidazelor 0,36 U/mL.

20 În varianta mediului propus (var. 1), în care elementul nou introdus suplimentar este Zn(D-Ser)<sub>2</sub> activitatea xilanazelor și β-glucozidazelor a constituit respectiv 5,41 U/mL și 0,511 U/mL, sau cu 60,53% și 65,91% mai superioară mediului celei mai apropiate soluții.

Analogic exemplului 1 au fost efectuate experiențe cu componența mediului din variantele 2 și 3 în care elementele noi introduse au fost compușii coordinați Zn(L-Ala)<sub>2</sub>, (varianta 2) și Zn(D-Ala)<sub>2</sub> (varianta 3), condițiile de cultivare fiind identice.

25 Rezultatele experiențelor se prezintă în tabel.

Variantele mediilor	Numărul de probe	Concentrațiile comp. coord. (g/L)	Activitatea xilanazelor		Activitatea β-glucozidazelor	
			U/mL	% față de soluția cea mai apropiată	U/mL	% față de soluția cea mai apropiată
Mediul celei mai apropiate soluții	10	-	3,37±0,23	100,00	0,31±0,05	100,00
Mediile propuse:	10	0,001	5,41±0,12	160,53	0,51±0,06	165,91
Varianta 1	10	0,005	5,56±0,31	164,98	0,49±0,03	158,44
Zn(D-Ser) <sub>2</sub>	10	0,010	5,67±0,25	168,24	0,42±0,14	135,71
Varianta 2	10	0,001	5,13±0,18	152,22	0,47±0,05	152,92
Zn(L-Ala) <sub>2</sub>	10	0,005	5,25±0,27	155,78	0,44±0,09	144,16
	10	0,010	5,46±0,36	162,02	0,43±0,06	138,63
Varianta 3	10	0,001	5,56±0,21	164,98	0,46±0,07	149,67
Zn(D-Ala) <sub>2</sub>	10	0,005	5,46±0,13	162,02	0,42±0,09	135,38
	10	0,010	5,65±0,25	167,65	0,40±0,10	131,17

Datele din tabel indică faptul că în cazul utilizării mediului propus (variante) cu includerea compușilor coordinați ai Zn(II) în concentrație de 0,001, 0,005, 0,010 g/L activitatea xilanazelor și β-glucozidazelor este superioară activității respective pe mediul celei mai apropiate soluții.

30 Activitatea maximă a β-glucozidazelor a fost înregistrată la utilizarea concentrației biostimulatorului de 0,001 g/L și constituie 149,67...165,91%, cu 49,67...65,91% mai superioară față de soluția cea mai apropiată. Activitatea xilanazelor crește odată cu majorarea concentrației biostimulatorului de la 0,001 la 0,010 g/L. Astfel cum la o mărire semnificativă a concentrației biostimulatorului de 5...10 ori

## MD 1987 G2 2002.08.31

5

(0,005...0,010 g/L) activitatea xilanazelor crește neînsemnat (în mediu 2...7%) din considerente economice se recomandă utilizarea concentrației de 0,001 g/L. Sporirea activității xilanazelor în mediul propus (variante) alcătuiește 52,22...64,98% față de soluția cea mai apropiată.

5

### 10 (57) Revendicări:

1. Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, care conține coarde de viță de vie și borhot de sfeclă uscate și mărunțite, melasă,  $MgSO_4$ ,  $NaNO_3$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  și apă de robinet **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține compusul coordinativ  $Zn(D-Ser)_2$ , în următorul raport al ingredientelor, în g:

15	coarde de viță de vie	
	uscate și mărunțite	10,0
	borhot de sfeclă	
	uscat și mărunțit	10,0
	melasă	10,0
20	$MgSO_4$	0,5
	$NaNO_3$	3,0
	KCl	0,5
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
	$Zn(D-Ser)_2$	0,001...0,010
25	apă de robinet	până la 1 L.

2. Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, care conține coarde de viță de vie și borhot de sfeclă uscate și mărunțite, melasă,  $MgSO_4$ ,  $NaNO_3$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  și apă de robinet **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține compusul coordinativ  $Zn(L-Ala)_2$ , în următorul raport al ingredientelor, în g:

30	coarde de viță de vie	
	uscate și mărunțite	10,0
	borhot de sfeclă	
	uscat și mărunțit	10,0
	melasă	10,0
35	$MgSO_4$	0,5
	$NaNO_3$	3,0
	KCl	0,5
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
	$Zn(L-Ala)_2$	0,001...0,010
40	apă de robinet	până la 1 L.

## MD 1987 G2 2002.08.31

6

3. Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D, care conține coarde de viță de vie, borhot de sfeclă, melasă,  $MgSO_4$ ,  $NaNO_3$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  și apă de robinet, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține compusul coordinativ  $Zn(D-Ala)_2$ , în următorul raport al ingredientelor, în g:
- |    |                       |               |
|----|-----------------------|---------------|
|    | coarde de viță de vie |               |
|    | uscate și mărunțite   | 10,0          |
|    | borhot de sfeclă      |               |
| 10 | uscate și mărunțite   | 10,0          |
|    | melasă                | 10,0          |
|    | $MgSO_4$              | 0,5           |
|    | $NaNO_3$              | 3,0           |
|    | KCl                   | 0,5           |
| 15 | $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  | 0,01          |
|    | $Zn(D-Ala)_2$         | 0,001...0,010 |
|    | apă de robinet        | până la 1 L.  |

20

**(56) Referințe bibliografice:**

1. MD 356 G2 1995.12.31

**Șef Secție:**

GUȘAN Ala

**Examinator:**

BAZARENCO Tatiana

**Redactor:**

LOZOVANU Maria

## RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2000 0158		
(22) Data depozit: 2000.09.22		
(51) <sup>7</sup> : C 12 N 1/14; C 12 R 1/645		
<b>Titlul</b> : Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de fung <i>Aspergillus flavus</i> VKM F 3292 D (71) Solicitantul : Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD Termeni caracteristici : mediu de cultură, cultivarea fungilor, compozițiile mediilor de cultivare		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
Int. Cl. <sup>7</sup> C 12 N 1/14; C 12 R 1/645 (MD) 1993 - 2000 (EA) 1996 - 2000		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
<b>* categoriile speciale ale documentelor consultate:</b>		<b>P</b> - document publicat înainte de data depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
<b>A</b> - document care definește statutul general al tehnicii		<b>T</b> - 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 care conține baza invenției
<b>E</b> - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		<b>X</b> - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
<b>L</b> - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la data publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres ( se va indica motivul)		<b>Y</b> - 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
<b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		<b>&amp;</b> - document care face parte din aceeași familie de documente
Data efectuării de documentare		2002.04.08
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

ANEXĂ

## RAPORT DE DOCUMENTARE

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