



MD 4654 B1 2019.10.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4654** (13) **B1**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)  
*C12R 1/885* (2006.01)  
*C12N 1/38* (2006.01)  
*C12N 9/58* (2006.01)  
*C07D 403/14* (2006.01)  
*C07F 13/00* (2006.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

<b>In 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</b>	
(21) Nr. depozit: a 2018 0083 (22) Data depozit: 2018.09.20	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.10.31, BOPI nr. 10/2019
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ, MD	
(72) Inventatori: CILOCI Alexandra, MD; BACA Svetlana, MD; TIURINA Janetta, MD; LABLIUC Svetlana, MD; DVORNINA Elena, MD; BIVOL Cezara, MD; CLAPCO Steliana, MD; DARII Mariana, MD; KRAVȚOV Victor, MD	
(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ, MD	

(54) Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 - producătoare de proteaze neutre

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un mediu de cultivare a tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 și poate fi utilizată pentru obținerea preparatelor proteolitice cu largi aplicări în medicină, industria farmaceutică.

Mediul nutritiv, conform invenției, conține, %: tărâțe de grâu 2,0; făină de soia 1,0; CaCO<sub>3</sub> 0,2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1, compusul

2

izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat sau diaqua-nitrato-(2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat 0,0005...0,0010 și apă potabilă restul.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea activității proteazelor neutre cu 40,9...84,9 %.

Revendicări: 1

MD 4654 B1 2019.10.31

**(54) Nutrient medium for cultivation of *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 fungi strain - producer of neutral proteases**

**(57) Abstract:**

1

The invention relates to biotechnology, in particular to a medium for cultivation of *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 fungi strain and can be used for producing proteolytic drugs with a wide range of applications in medicine, pharmaceutical industry.

The nutrient medium, according to the invention, comprises, %: wheat bran 2.0; soy flour 1.0; CaCO<sub>3</sub> 0.2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1; the

2

compound isobutyrate-chloro-methoxy-(2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine)-manganese(II) methanol solvate or diaqua-nitrato-(2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine)-manganese(II) nitrate 0.0005...0.0010 and drinking water the rest.

The technical result of the invention consists in increasing the activity of neutral proteases by 40.9...84.9%.

Claims: 1

**(54) Питательная среда для культивирования штамма грибов *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 - продуцента нейтральных протеаз**

**(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к среде для культивирования штамма гриба *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 и может быть использовано для получения протеолитических препаратов с широким спектром применения в медицине, фармацевтической промышленности.

Питательная среда, согласно изобретению, содержит, %: пшеничные отруби 2,0, соевую муку 1,0, CaCO<sub>3</sub> 0,2,

2

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1, соединение изобутирато-хлоро-метокси-(2,4,6-трис(2-пиридил)-s-триазин)-марганца(II) метанол сольват или диаква-нитрато-(2,4,6-(2-пиридил)-s-триазин)-марганца(II) нитрат 0,0005...0,0010 и питьевую воду остальное.

Технический результат изобретения состоит в усилении активности нейтральных протеаз на 40,9...84,9%.

П. формулы: 1

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologii microbiene, în particular, la un mediu de cultivare a tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 și poate fi utilizată pentru obținerea preparatelor proteolitice cu largi aplicări în medicină, industria farmaceutică, producerea detergenților.

În tehnologia cultivării tulpinilor fungice producătoare de enzime proteolitice, în scopul sporirii biosintezei metaboliților secundari se utilizează diverse tehnici, inclusiv: modificarea componenței minerale a mediului de cultivare, selectarea inductorilor specifici ai sintezei proteazelor (ingrediente naturale cu conținut înalt de proteine – făină de fasole, făină de porumb, tărâțe de grâu etc.), și, în dependență de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii, diferiți biostimulatori (Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. М., Агропромиздат, 1975, p. 325-327).

În calitate de cea mai apropiată soluție s-a utilizat mediul nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 cu următoarea compoziție, %: tărâțe de grâu 2,0, făină de soia 1,0, CaCO<sub>3</sub> 0,2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1, restul apă de robinet, pH-ul inițial al mediului 6,25 [1].

Dezavantajul mediului constă în faptul că acesta nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al tulpinii, asigurând obținerea unor valori ale activității proteazelor neutre de maximum 51,03 U/mL.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMNFD 15, care să asigure sporirea biosintezei proteazelor neutre.

Esența invenției constă în aceea că pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 se propune o variantă nouă de mediu nutritiv care suplimentar la componentele mediului cunoscut, în calitate de stimulator include unul dintre compușii coordinați ai Mn(II) izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat cu formula [Mn(is)(Cl)(tpt)(CH<sub>3</sub>OH)]·CH<sub>3</sub>OH (compusul I) sau diaqua-nitrato-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat cu formula [Mn(NO<sub>3</sub>)(tpt)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>) (compusul II), în următorul raport al componentelor, %: tărâțe de grau – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO<sub>3</sub> – 0,2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,1; compusul coordinațiv [Mn(is)(Cl)(tpt)(CH<sub>3</sub>OH)]·CH<sub>3</sub>OH sau [Mn(NO<sub>3</sub>)(tpt)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>) - 0,0005...0,0010, restul apă potabilă, pH-ul inițial al mediului - 6,25.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea activității proteazelor neutre cu 84,9% și 40,9%, în cazul compusului I și, respectiv, II.

Efectul biostimulator pronunțat al compușilor coordinați utilizați asupra proteazelor neutre poate fi determinat de specificul structurii și activității ligandului 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină (tpt) în componența compușilor I și II, care datorită conținutului sporit de atomi de azot manifestă activități antioxidante și catalitice.

Avantajele invenției:

- creșterea activității proteazelor neutre;
- diversificarea preparatelor proteolitice după ponderea componentelor compexului enzimatic (în special, obținerea preparatelor îmbogățite cu proteaze neutre), în funcție de cerințele specifice ale domeniului de aplicare.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Tulpina *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 L, care conțineau 0,2 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție, %: tărâțe de grâu – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO<sub>3</sub> – 0,2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,1; [Mn(is)(Cl)(tpt)(CH<sub>3</sub>OH)]·CH<sub>3</sub>OH (I) – 0,0005-0,0015; restul apă de robinet; pH-ul inițial al mediului 6,25. Mediul nutritiv se însămânțează cu suspensie de spori și miceliu în cantitate de 5% v/v, obținută prin spălare cu apă distilată sterilă a culturii de 12-14 zile, crescută pe suprafețe înclinate de malț-agar. Cultivarea s-a realizat în condiții de agitare continuă la 180 rot./min, timp de 240 ore, la temperatura de 28°C.

Activitatea maximă a proteazelor în variantele optimizate de mediu, determinată în lichidul cultural prin metoda Anson după acțiunea asupra cazeinatului de sodiu la pH-ul 7,4 s-a înregistrat în ziua a 9-a de cultivare, în varianta cu concentrația compusului I de 0,0005%,

# MD 4654 B1 2019.10.31

4

constituind 94,39 U/mL față de 51,03 U/mL în varianta control, ce depășește proba de referință cu 84,9%.

Tabel

5 Modificarea activității proteolitice a tulpinii de micromicete *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 sub influența compușilor I și II

Comp. coord.	Conc., mg/L	Proteaze neutre (pH 7,4)			
		a 9 zi		a 10 zi	
		U/mL	%	U/mL	%
I	5	94,39	184,9	61,38	440,9/120,3*
	10	79,41	155,6	61,38	440,9/120,3
	15	62,98	123,4	53,88	387,1/105,6
II	5	71,91	140,9	51,03	366,6/100,0
	10	55,49	108,7	49,43	355,1/96,9
	15	44,96	88,1	49,43	355,1/96,9
Martor	-	51,03	100,0	13,92	100,0

\*Calculule sunt efectuate în raport cu maxima de biosinteză a mediului martor - ziua a 9-a de cultivare.

10 Procedeu de preparare a izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat,  $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$  (I). S-a adăugat izobutiratul de Mn(II) (0,1 g, 0,43 mmoli), clorhidrat de 2-[bis(2-hidroxietyl)amino]acetonitril (0,11 g, 0,61 mmoli) și 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină (0,06 g, 0,19 mmoli) în 8 ml metanol. Soluția obținută a fost pusă la ultrasunet timp de 30 minute, filtrată și lăsată într-un flacon acoperit timp de 4 zile. Cristalele de culoare cafenie, aciforme au fost filtraee și spălate cu metanol și

15 uscate în aer. S-a determinat, %: C-51,84; H-5,02; N-15,39. Pentru  $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$  (I),  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{ClMnN}_6\text{O}_4$ , s-a calculat, %: C-52,04; H-4,91; N-15,17. Spectrul infraroșu: FT/IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) (I): 3352 br/m, 3068m, 2963 br/m, 2929 m, 2861 w, 2560 w, 1651 sh, 1596 v/s, 1572 s, 1544s, 1531 v/s, 1434 s, 1426 v/s, 1376 v/s, 1299 v/s, 1259 s, 1161 w, 1092 s, 1047 m, 1006 m, 924 w, 858 w, 850 w, 771 m, 676 w, 667 w.

20 Exemplu de obținere a diaqua-nitrato-(2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat,  $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$  (II). S-a adăugat pivalat de Mn(II,III),  $[\text{Mn}_6\text{O}_2((\text{CH}_3)_3\text{CCO}_2)_{10}((\text{CH}_3)_3\text{CCO}_2\text{H})_4]$ , (0,02 g, 0,01 mmoli), nitrat de disprosiu(III) (0,04 g, 0,09 mmoli) și 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină (0,007 g, 0,022 mmoli) în 8 ml etanol. În continuare, amestecul reactant se refluxează timp de 30 minute, utilizând un refrigerent

25 ascendent. Soluția obținută a fost filtrată și lăsată într-un flacon acoperit. La răcire și evaporare lentă în soluție se depun cristale de culoare cafenie, aciforme, care se filtrează, se spală cu etanol și se uscă în aer. S-a determinat, %: C-40,68; H-3,22; N-21,59. Pentru  $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$  (II),  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{MnN}_8\text{O}_8$ , s-a calculat, %: C-40,99; H-3,06; N-21,25. Spectrul infraroșu: FT/IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) (II): 3731 br/m, 3405 br/m, 3073 m, 2962 br/m, 2909 m,

30 2821 w, 1662 sh, 1572 v/s, 1545 s, 1532 v/s, 1474 s, 1428 v/s, 1388 v/s, 1377 v/s, 1294 s, 1260 m, 1159 w, 1103 s, 1035 m, 1021 m, 1005 m, 927 w, 859 w, 850 w, 778 m, 679 w, 667 w.

35 Activitatea proteazelor în variantele optimizate este superioară valorii maxime a martorului și în ziua a 10-a de cultivare, constituind 61,38 U/mL față de 51,03 U/mL în varianta martor, depășind proba de referință cu 20,3%.

Exemplul 2

Tulpina *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L care conțineau 0,1 L mediu, la temperatura de 30°C,  $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$  (II) - 0,0005...0,0015%, în restul condițiilor echivalente exemplului 1.

40 Activitatea maximă a proteazelor a fost determinată similar exemplului 1 și s-a înregistrat în lichidul cultural în ziua a 9-a de cultivare, în varianta cu concentrația compusului coordonativ de 0,0005%, constituind 71,91 U/mL în comparație cu 51,03 U/mL în varianta proxim, depășind varianta proxim cu 40,9%.

45 Adăugarea compușilor coordonativi izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat cu formula  $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$  (I) și diaqua-

nitrato-(2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat cu formula  $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$  (II) în mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi miceliali *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 în concentrații de 0,0005% sporește activitatea proteazelor neutre sintetizate de tulpină cu 40,9... 84,9%.

- 5 Maxima biosintezei proteazelor neutre (pH 7,4) la micromiceta *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 în variantele optimizate se manifestă în ziua a 9-a de cultivare și coincide cu maxima în varianta martor. Activitatea proteazelor neutre (pH 7,4) determinată similar, variază în limitele 94,39...62,98 U/mL pentru compusul I și 71,91...55,49 U/mL pentru compusul II în funcție de concentrația aplicată a compusului coordonativ cu manifestarea maximei (94,39 U/mL, 71,91 U/mL) la concentrația de 0,0005% față de 51,03 U/mL în varianta martor, sporul activității constituind 84,9...23,4% pentru compusul I și 40,9% pentru compusul II.

- 10 Compușii coordonativi izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat cu formula  $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$  și diaqua-nitrato-(2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat cu formula  $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ , datorită proprietăților pe care le manifestă prezintă interes în calitate de biostimulatori ai proceselor de enzimogeneză la cultivarea tulpinii de funghi miceliali *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15.

#### (56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 4285 B1 2014.05.31

#### (57) Revendicări:

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de funghi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15, care conține tărâțe de grâu, făină de soia,  $\text{CaCO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  și apă potabilă, având pH inițial al mediului 6,25, caracterizat prin aceea că conține suplimentar compusul izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat cu formula  $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$  sau diaqua-nitrato-(2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat cu formula  $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ , în următorul raport, %:

tărâțe de grâu	2,0
făină de soia	1,0
$\text{CaCO}_3$	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
$[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ sau	
$[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$	0,0005 - 0,0010
apă potabilă	restul.