



MD 1987 G2 2002.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1987⁽¹³⁾ G2
(51) Int. Cl.⁷: 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 fungi *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 fungi *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 fungi *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D, care conțin coarde de viță de vie, borhot de sfeclă uscate

2
5 și mărunțite, melasă, MgSO_4 , NaNO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și apă de robinet.

Noutatea invenției constă în aceea că în calitate de stimulatori de creștere mediile suplimentar conțin compuși coordinativi: $\text{Zn}(\text{D-Ser})_2$, $\text{Zn}(\text{D-Ala})_2$, $\text{Zn}(\text{L-Ala})_2$.

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

Revendicări: 3

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_4 – 0,5; NaNO_3 – 3,0; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 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.

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 3292D, în special sporirea biosintezei β -glucozidazelor și xilanazelor - componente importante ale complexului enzimatic hidrolitic în vederea dezintegrării profunde a materialelor vegetale.

15

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_4), azotat de sodiu (NaNO_3), clorură de potasiu (KCl), sulfat de fier hidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 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:

20

Varianta 1: compusul coordinațional Zn(D-Ser)₂ în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde 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
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
Zn(D-Ser) ₂	0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

25

Varianta 2: compusul coordinațional Zn(L-Ala)₂ în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde 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
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
Zn(L-Ala) ₂	0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

Varianta 3: compusul coordinațional Zn(D-Ala)₂ în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde 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
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
Zn(D-Ala) ₂	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 coordinativi: 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 ₄	0,5
NaNO ₃	3,0
KCl	0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
Zn(D-Ser) ₂	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 reduscătoare 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)₂ 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 coordinativi Zn(L-Ala)₂, (varianta 2) și Zn(D-Ala)₂ (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) ₂	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) ₂	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) ₂	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 coordinativi 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 (varianțe) alcătuiește 52,22...64,98% față de soluția cea mai apropiată.

5

10 (57) Revendicări:

1. Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi *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 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și apă de robinet **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține compusul coordinativ $\text{Zn}(\text{D-Ser})_2$, 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
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
	$\text{Zn}(\text{D-Ser})_2$	0,001...0,010
25	apă de robinet	până la 1 L.

2. Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi *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 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și apă de robinet **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține compusul coordinativ $\text{Zn}(\text{L-Ala})_2$, 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
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
	$\text{Zn}(\text{L-Ala})_2$	0,001...0,010
40	apă de robinet	până la 1 L.

MD 1987 G2 2002.08.31

6

- 5 3. Mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D, care conține coarde de viță de vie, borhot de sfeclă, melasă, MgSO_4 , NaNO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și apă de robinet, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține compusul coordinativ $\text{Zn}(\text{D-Ala})_2$, în următorul raport al ingredientelor, în g:

	coarde de viță de vie	
	uscate și mărunțite	10,0
	borhot de sfeclă	
10	uscat și mărunțit	10,0
	melasă	10,0
	MgSO_4	0,5
	NaNO_3	3,0
	KCl	0,5
15	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
	$\text{Zn}(\text{D-Ala})_2$	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