



MD 4645 C1 2020.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4645** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C07F 15/02 (2006.01)
C07F 15/03 (2006.01)
C07D 213/88 (2006.01)
C12R 1/77 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2018 0019 (22) Data depozit: 2018.03.21</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.08.31, BOPI nr. 8/2019</p>
<p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE, MD</p> <p>(72) Inventatori: CILOCI Alexandra, MD; TIURINA Janetta, MD; BULHAC Ion, MD; CLAPCO Steliana, MD; DANILESCU Olga, MD; LABLIUC Svetlana, MD; DVORNINA Elena, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE, MD</p>	

(54) Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de funghi *Fusarium gibbosum*
CNMN-FD-12

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 producător de proteaze, xilanaze și β -glucozidaze și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea preparatelor enzimactice hidrolitice complexe.

Mediul nutritiv, conform invenției, conține în % mas.: făină de porumb 2,0, făină de soia 1,0, CaCO₃ 0,2, (NH₄)₂SO₄ 0,1, în calitate de

2
biostimulator compuși coordinați ai fierului (III) [Fe(H₂L¹)(H₂O)₂](NO₃)₃·1,5H₂O] sau [Fe(H₂L²)(H₂O)₂](NO₃)₃·5H₂O 0,0010...0,0015 și restul apă.

Revendicări: 1

MD 4645 C1 2020.03.31

(54) Nutrient medium for cultivation of *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 fungus strain

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, in particular to a nutrient medium for cultivation of *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 fungus strain producer of proteases, xylanases and β -glucosidases and can be used in the microbiological industry for producing complex hydrolytic enzymatic drugs.

The nutrient medium, according to the invention, comprises, in wt. %: corn flour 2.0,

2
soy flour 1.0, CaCO_3 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, as a biostimulant coordinative compounds of iron (III) $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ or $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0010...0.0015% and the rest water.

Claims: 1

(54) Питательная среда для культивирования штамма гриба *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к питательной среде для культивирования штамма гриба *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 продуцента протеаз, ксиланаз и β -глюкозидаз и может быть использовано в микробиологической промышленности для получения комплексных гидролитических ферментных препаратов.

Питательная среда, согласно изобретению, содержит, в масс. %:

кукурузную муку 2,0, соевую муку 1,0, CaCO_3 0,2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1, в качестве биостимулятора координационные

2
соединения железа (III) $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ или $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0010...0,0015% и остальное воду.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un mediu de cultivare a tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 producătoare de proteaze, xilanaze și β -glucozidaze și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea preparatelor enzimactice hidrolitice complexe, în medicină, industria farmaceutică, în producerea detergenților, precum și în cercetări științifice.

Pentru cultivarea tulpinilor fungice producătoare de enzime proteolitice se utilizează medii care conțin ca parte minerală diferite modificări ale mediului Czapek și inductori ai sintezei proteazelor (ingredientele naturale cu conținut înalt de proteine – făină de fasole, făină de porumb, tărațe de grâu etc.) și, în dependență de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii, diferiți biostimulatori [1].

Sunt cunoscute două variante de medii de cultivare a tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12, care conțin, (%): făină de porumb 2,0, făină de soia 1,0, CaCO_3 0,2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1, unul dintre compușii coordinați $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sau $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, restul apă, pH-ul inițial al mediului fiind de 6,25 [2].

Mediul asigură sporirea biosintezei proteazelor acide și neutre.

În calitate de mediu proximal s-a utilizat mediul nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 cu următoarea componență, (%): făină de porumb 2,0, făină de soia 1,0, CaCO_3 – 0,2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1, restul apă, pH-ul inițial al mediului fiind de 6,25 [3].

Dezavantajul mediilor menționate constă în faptul că la cultivarea tulpinii-producătoare pe aceste medii nu se asigură realizarea potențialului posibil de sinteză a proteazelor neutre – componenta principală a complexului proteolitic sintetizat de tulpină și biosinteza enzimei nu atinge valori maxime.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12, utilizarea căruia intensifică biosinteza proteazelor neutre, fapt ce permite extinderea sferei de aplicare a complexului enzimatic.

Invenția soluționează problema prin aceea că se propune un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12, care conține făină de porumb, făină de soia, carbonat de calciu, sulfat de amoniu, compuși coordinați ai fierului (III) și apă potabilă în următorul raport al componentelor, % mas.: făină de porumb 2,0, făină de soia 1,0, carbonat de calciu 0,2, sulfat de amoniu 0,1, azotat de (2,6-diacetilpiridină-bis-izonicotinoilhidrazonă)-bis-aqua fier(III) – apă (1/1.5) (I) sau azotat de (2,6-diacetilpiridină-bis-nicotinoilhidrazonă)-bis-aqua fier(III) – apă (1/5) (II) 0,0010...0,0015, apă restul, având un pH inițial de 6,25.

Rezultatul tehnic al invenției constă în stimularea biosintezei proteazelor neutre, componenta principală a complexului proteolitic sintetizat de tulpină, cu sporirea activității acesteia și în posibilitatea reducerii, în funcție de scop, a duratei de cultivare a tulpinii cu 24 ore.

Activitatea componentelor neproteolitice a complexului enzimatic (xilanaze, β -glucozidaze) sintetizate de tulpina-producătoare *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 se păstrează la nivelul variantei martor.

Efectul biostimulator mai pronunțat asupra proteazelor neutre al compușilor coordinați propuși poate fi determinat de specificul structurii și activității ligandului heterociclic (2,6-diacetilpiridina) în componența complexilor I și II față de ligandul alifatic (2,3-butandiona) în componența complexilor $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^*)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^{**})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ din mediile cunoscute.

Procedeele de sinteză a compușilor coordinați ai fierului(III) - azotat de (2,6-diacetilpiridină-bis-izonicotinoilhidrazonă)-bis-aqua fier(III) – apă (1/1.5) (I), $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ și azotat de (2,6-diacetilpiridină-bis-nicotinoilhidrazonă)-bis-aqua fier(III) – apă (1/5) (II), $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}^*$

Soluția obținută prin dizolvarea $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g, 0,5 mmol) în 10 mL apă a fost adăugată la suspensia de bază Schiff - 2,6-diacetilpiridină bis(izonicotinoilhidrazonă) (0,2 g,

0,5 mmol) în 20 mL metanol. Amestecul a fost agitat continuu până la dizolvarea completă a agentului de coordinație (bazei Schiff). Soluția a fost filtrată și refluxată timp de 2 ore, după care aceasta a fost lăsată la evaporare la temperatura camerei. În 4 zile s-au format cristale cubice de culoare neagră. S-a obținut 0,18 g de produs cristalin. Randamentul (η) calculat după sarea metalului constituie 50,8%.

Analiza elementală pentru $C_{21}H_{25}FeN_{10}O_{14.50}$.

Calculat, %: C 35.36; H 3.53; N 19.64; Fe 7.83.

Găsit, %: C 35.28; H 3.51; N 19.55; Fe 7.80.

Spectrul IR (ν , cm^{-1}): 3522 m*, 3151 s, 3117 s*, 3080 m, 2990 m, 2894 m, 2793 m, 2762 m, 2652 m, 2581 m, 2452 m, 2342 s, 1744 s, 1637 i*, 1612 m, 1584 s, 1567 m, 1548 m, 1535 s, 1498 m, 1409 i, 1379 s, 1365i, 1345 i, 1306 f.i*, 1291 f.i, 1273 i, 1207 m, 1186 m, 1170 m, 1161 i, 1094 m, 1080 m, 1059 m, 1050 m, 1043 m, 1034 m, 1019 s, 1004 s, 996 m, 913 m, 843 i, 827 i, 754 i, 722 s, 713 s, 691 m, 684 i, 651 s, 569 s, 556 s, 534 s, 500 s, 487 s, 442 m.

15 **$[Fe(H_2L^2)(H_2O)_2](NO_3)_3 \cdot 5H_2O^{**}$**

Soluția de $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (0,2 g, 0,5 mmol) dizolvat în 10 mL apă a fost adăugată la suspensia de bază Schiff (2,6-diacetilpiridină *bis*(nicotinoilhidrazonă)) (0,2 g, 0,5 mmol) în 20 mL metanol. Amestecul a fost agitat continuu până la dizolvarea completă a agentului de coordinație (bazei Schiff), după ce soluția a fost filtrată, refluxată 2 ore și lăsată pentru evaporare la temperatura camerei. În 4 zile s-au format cristale negre în formă de prisme alungite cu masa de 0,23 g. Randamentul (η) calculat după sarea metalului constituie 61%.

Analiza elementală pentru $C_{21}H_{33}FeN_{10}O_{18}$.

Calculat, %: C 32.78; H 4.32; N 18.20; Fe 7.26.

Găsit, %: C 32.66; H 4.76; N 18.15; Fe 7.14.

25 Spectrul IR (ν , cm^{-1}): 3381 m*, 3193 m, 3124 m, 3085 m, 3063 m, 2988 m, 2750 m, 2650 m, 2420 s*, 2350 s, 2106 s, 2006 s, 1752 s, 1737 s, 1630 m, 1617s, 1595 s, 1566 m, 1533 i*, 1507 m, 1395 f.i*, 1380 f.i, 1357 f.i, 1313 f.i, 1272 s, 1212 s, 1165 i, 1148 m, 1108 m, 1075 s, 1056 i, 1039 i, 1020 m, 997 m, 978 s, 958 s, 920 m, 885 s, 874 s, 820 s, 773 s, 752 s, 731 i, 702 m, 689 s, 678 m, 664 s, 621 m, 565 m, 554 s, 533 i, 495 s, 445 i.

30 *- intensitatea apreciată calitativ: f.i – foarte intensivă; i – intensivă; m – medie; s – slabă.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

35 Tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 L, care conțineau 0,2 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție, %: făină de porumb 2,0; făină de soia 1,0; $CaCO_3$ 0,2; $(NH_4)_2SO_4$ 0,1; $[Fe(H_2L^1)(H_2O)_2](NO_3)_3 \cdot 1,5H_2O$ (I) 0,0005...0,0015; restul apă de robinet; pH-ul inițial al mediului fiind de 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 (180 rot. \cdot min $^{-1}$), timp de 144 ore, la temperatura de 28°C.

45 Activitatea maximă a proteazelor în variantele optimizate de mediu, determinată în lichidul cultural prin metoda Anson după acțiunea asupra cazeinului de sodiu la pH-ul 7, s-a înregistrat în ziua a 6-a de cultivare a tulpinii-producătoare, în varianta cu concentrația compusului coordinativ al Fe(III) de 0,0010%, constituind 109,4 U \cdot ml $^{-1}$ față de 33,6 U \cdot ml $^{-1}$ în varianta proximă, ceea ce depășește proba de referință cu 225,6%.

50 La aceeași concentrație a compusului $[Fe(H_2L^1)_2(H_2O)_2](NO_3)_3 \cdot 1,5H_2O$ activitatea proteazelor în varianta experiment constituie 58,5 U \cdot ml $^{-1}$ după 120 ore de cultivare (ziua a 5-a) comparativ cu 33,6 U \cdot ml $^{-1}$ în varianta proximă în ziua de biosinteză maximă (ziua a 6-a), depășind proba de referință cu 74,1%, ceea ce face posibil, la preferință, reducerea ciclului de cultivare cu 24 ore.

Exemplul 2

55 Tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L care conțineau 0,1 L mediu, la temperatura de 30°C, $[Fe(H_2L^2)(H_2O)_2](NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ (II), cu restul condițiilor echivalente exemplului 1.

Activitatea maximă a proteazelor înregistrată în lichidul cultural al tulpinii-producătoare, în ziua a 6-a de cultivare, determinată la pH-ul 7,4, în varianta cu concentrația compusului

coordinativ de 0,0010%, a constituit 95,9 U·ml⁻¹ în comparație cu 33,6 U·ml⁻¹ în varianta proxim (ziua a 6-a de cultivare), depășind proba de referință cu 185,4%.

La reducerea duratei de cultivare cu 24 ore (a 5-a zi de cultivare), activitatea proteazelor în varianta optimizată constituie 94,6 U·ml⁻¹ (concentrația 0,0015%), depășind nivelul mediului proxim (33,6 U·ml⁻¹) în ziua a 6-a, cu 181,5% (vezi Tabelul).

Tabel

Mediul conform invenției, compusul coordinativ (CC)	Concen- trația CC %	Activitatea proteolitică (pH 7,4)			
		Ziua a 5-a		Ziua a 6-a	
		U/ml	%	U/ml	%
[Fe(H ₂ L ¹)(H ₂ O) ₂](NO ₃) ₃ ·1.5H ₂ O (I)	0,0005	43,5	172,6	92,9	276,5
	0,0010	58,5	232,1	109,4	325,6
	0,0015	46,4	184,1	52,5	156,3
[Fe(H ₂ L ²)(H ₂ O) ₂](NO ₃) ₃ ·5H ₂ O (II)	0,0005	52,5	208,3	79,4	263,3
	0,0010	58,5	232,1	95,9	285,4
	0,0015	94,6	375,4	55,5	165,2
Mediul proxim	-	25,2	100	33,60	100

(Calcululele sunt efectuate în raport cu maximul de biosinteză a mediului proxim - ziua a VI-a de cultivare)

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. Москва, Агропромиздат, 1975, p. 325-327
2. MD 4509 B1 2017.08.31
3. MD 4186 B1 2012.11.30

(57) Revendicări:

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12, care conține făină de porumb, făină de soia, carbonat de calciu, sulfat de amoniu, compuși coordinativi ai fierului (III) și apă potabilă în următorul raport al componentelor, % mas.:

făină de porumb 2,0

făină de soia 1,0

carbonat de calciu 0,2

sulfat de amoniu 0,1

azotat de (2,6-diacetilpiridină-*bis*-izonicotinoilhidrazonă)-*bis*-aqua)fier(III) – apă(1/1.5) sau

azotat de (2,6-diacetilpiridină-*bis*-nicotinoilhidrazonă)-*bis*-aqua)fier(III) – apă (1/5)

0,0010...0,0015

apă restul, având un pH inițial de 6,25.