

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3943** ⁽¹³⁾ **F1**
(51) Int. Cl.: **C12N 1/14** (2008.01)
C12R 1/685 (2008.01)
C07F 15/06 (2006.01)
C07C 251/70 (2006.01)
C12N 9/30 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2008 0213 (22) Data depozit: 2008.08.06	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.07.31, BOPI nr. 7/2009
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: DESEATNIC Alexandra, MD; STRATAN Maria, MD; COROPCEANU Eduard, MD; BOLOGA Olga, MD; RIJA Andrei, MD; CLAPCO Steliana, MD; TIURIN Janeta, MD; LABLIUC Svetlana, MD; RUDIC Valeriu, MD; BULHAC Ion, MD (73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19
CNMN FD 02**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular
la un mediu de cultivare a tulpinii de fungi
Aspergillus niger 33-19 CNMN FD 02 și poate fi
utilizată în industria microbiologică pentru obți-
nerea enzimelor amilolitice.

Mediul nutritiv pentru cultivarea tulpinii de
fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02
conține, în g/L: amidon 3,0; făină de fasole 9,0,

2
tărâțe de grâu 18; KH₂PO₄ 2,0; KCl 0,5; MgSO₄
0,5; [Co(DH)₂(Anil)₂]₂[TiF₆] 0,005...0,010 și apă
potabilă până la 1 L.

Revendicări: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la medii de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 32-19 CNMN FD 02 – producător de enzime amilolitice și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea amilazelor cu spectru larg de aplicare în diverse procese tehnologice: fabricarea pâinii, producerea berii și alcoolului, producerea sucurilor și conservelor din fructe și legume, industria de amidon și melase, obținerea glucozei cristaline, industria textilă, în farmaceutică și medicină, în cercetări științifice.

Pentru cultivarea tulpinilor producătoare de enzime amilolitice se utilizează medii, care conțin ca parte minerală diferite modificări ale mediului Czapek și inductori ai sintezei amilazelor (amidon sau ingrediente naturale cu conținut de amidon – făină de fasole, făină de porumb, tărâțe de grâu etc.) și, în funcție de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii, diferiți biostimulatori [1].

În calitate de cea mai apropiată soluție a servit mediul cu următoarea componență ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH_2PO_4 – 2,0; KCl – 0,5; MgSO_4 – 0,5, apă potabilă, pH inițial al mediului – 3,0 [2].

La cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 pe mediul menționat, timp de 144 ore (6 zile), la temperatura de 28...30°C, în condiții de agitare continuă, cultura manifestă activitate amilolitică maximă în ziua a 6-a de cultivare și constituie 413...425 $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ de lichid cultural la hidroliza amidonului solubil în condiții standard (pH 4,7) și 346...351 $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ în condiții acide (pH 2,5).

Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în faptul că mediul nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al tulpinii și biosinteza enzimelor amilolitice nu atinge valoarea maximă.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 care să asigure sporirea capacității și a stabilității biosintetice a producătorului.

Esența invenției constă în aceea că pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 se propune o variantă nouă de mediu nutritiv care, suplimentar la componentele mediului proxim, conține compusul coordinativ al Co(III) cu dioxime și anionul fluorurat $[\text{TiF}_6]^{2-}$ în sfera externă: $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$ în următorul raport cantitativ al elementelor, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$: amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH_2PO_4 – 2,0; KCl – 0,5; MgSO_4 – 0,5; $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$ – 0,005...0,010, apă potabilă, pH inițial al mediului – 3,0.

Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei enzimelor amilolitice: cu 27,8% activitatea amilazelor ordinare și cu 12,5...23,8% a amilazelor acid stabile față de cea mai apropiată soluție și reducerea duratei de cultivare a producătorului cu 24 ore.

Efectul biostimulator al compușilor coordinativi este cauzat de însușirea microelementelor din componența compusului coordinativ: Co(III), Ti(IV) de a se implica activ la coordonarea și desfășurarea reacțiilor metabolice extrem de fine și complexe.

*Exemple de realizare a invenției**Exemplul 1*

Tulpina s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L, care conțineau 0,1 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH_2PO_4 – 2,0; KCl – 0,5; MgSO_4 – 0,5; $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$ – 0,005; apă potabilă până la 1 L; pH 3,0. Cultivarea s-a efectuat timp de 144 ore, la temperatura de 30°C, în condiții de agitare continuă (180 $\text{rot}\cdot\text{min}^{-1}$).

Activitatea amilolitică maximă a micromicetei pe mediul propus determinată în lichidul cultural s-a înregistrat în ziua a 5-a de cultivare constituind 506,4 $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ pentru amilazele ordinare, și 335,1 $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ pentru amilazele acid stabile, ceea ce depășește activitatea în varianta martor – cultivarea tulpinii pe mediul proxim respectiv cu 27,8 și 12,5% (ziua a 6-a de cultivare – ziua manifestării maximului de biosinteză a tulpinii pe mediul conform celei mai apropiate soluții) (tab. 1 și 2).

Exemplul 2

Tulpina *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L, care conțineau 0,1 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH_2PO_4 – 2,0; KCl – 0,5; MgSO_4 – 0,5; $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$ – 0,010; apă potabilă până la 1 L; pH 3,0. Cultivarea s-a efectuat timp de 144 ore, la temperatura de 28°C, în condiții de agitare continuă (180 $\text{rot}\cdot\text{min}^{-1}$).

Activitatea amilolitică maximă a micromicetei pe mediul propus determinată în lichidul cultural s-a înregistrat în ziua a 5-a de cultivare, constituind 506,4 $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ pentru amilazele ordinare și 368,4 $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ pentru amilazele acid stabile, ceea ce depășește activitatea în varianta martor – cultivarea tulpinii pe mediul proxim respectiv cu 27,8 și 23,7% (ziua a 6-a de cultivare – ziua manifestării maximului de biosinteză a tulpinii pe mediul conform celei mai apropiate soluții) (tab. 1 și 2).

Sinteza $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$

MD 3943 F1 2009.07.31

4

La amestecul cald de 0,33 g (0,001 moli) $\text{CoTiF}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ în 20 mL de apă și 0,23 g (0,002 moli) dimetilglioximă în 20 mL metanol se adaugă 0,23 mL (0,0025 moli) anilină. Soluția se încălzește în creuzet de grafit la aer ~8...10 min, apoi se filtrează și se lasă pentru evaporarea lentă la temperatura camerei. Din soluție se sedimentează cristale cafenii în formă de prisme cubice.

5 Randamentul: ~60%. Substanța este bine solubilă în alcooli, mai puțin în apă.

Găsit, %: Co 10,23; C 42,93; H 4,26; N 15,02.

Pentru $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{Co}_2\text{F}_6\text{N}_{12}\text{O}_8\text{Ti}$

Calculat, %: Co 10,59; C 43,18; H 4,35; N 15,11.

Tabelul 1

10

Modificarea activității amilazelor ordinare (pH 4,7, 30 min) ale micromicetei *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 sub influența complexilor cobaltului (III) cu anioni fluorurați

Compusul coordinativ, mg/L		Activitatea amilolitică					
		Ziua a 4-a		Ziua a 5-a		Ziua a 6-a	
		u/mL	% f/c* z/6	u/mL	% f/c* z/6	u/mL	% f/c* z/6
$[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$	1	392,2	99,0	458,9	115,8	382,3	96,5
	5	392,2	99,0	506,3	127,8	382,3	96,5
	10	415,2	104,8	506,3	127,8	450,0	113,6
cea mai apropiată soluție		-	-	385,6	-	396,2	100

15

Tabelul 2

Modificarea activității amilazelor ordinare (pH 2,5, 30 min) ale micromicetei *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 sub influența complexilor cobaltului (III) cu anioni fluorurați

Compusul coordinativ, mg/L		Activitatea amilolitică					
		Ziua a 4-a		Ziua a 5-a		Ziua a 6-a	
		u/mL	% f/c* z/6	u/mL	% f/c* z/6	u/mL	% f/c* z/6
$[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$	1	252,4	84,7	310,1	104,1	220,4	84,2
	5	276,6	92,9	335,1	112,5	249,4	95,3
	10	284,6	95,6	368,4	123,7	292,9	111,9
cea mai apropiată soluție		-	-	261,7	-	297,8	100

20

* - față de cea mai apropiată soluție în ziua manifestării maximei de biosinteză.

MD 3943 F1 2009.07.31

5

(57) Revendicări:

5 Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02, care conține amidon, făină de fasole, tărâțe de grâu, KH_2PO_4 , KCl, MgSO_4 și apă potabilă, având pH-ul inițial 3,0, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$, componentele fiind luate în următorul raport, g/L:

	amidon	3,0
	făină de fasole	9,0
10	tărâțe de grâu	18,0
	KH_2PO_4	2,0
	KCl	0,5
	MgSO_4	0,5
	$[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anil})_2]_2[\text{TiF}_6]$	0,005...0,010
15	unde: DH – dimetilglioximă,	
	Anil – anilină;	
	apă potabilă	până la 1 L.

20

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 2836 G2 2005.08.31
2. MD 2363 G2 2004.01.31