

(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
București

ROMANIA



(11) Nr. brevet: **107684 B1**
(51) Int.Cl.⁵ C 12 N 9/26;
C 12 N 9/30

(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. cerere: **146641**

(22) Data de depozit: **03.01.91**

(30) Prioritate:

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.12.93 BOPI nr. 12/93

(45) Data publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(87) Publicare internațională:
Nr.

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 99861

(71) Solicitant: **Universitatea, Galați, RO**

(73) Titular: (72)

(72) Inventatori: **Dan Valentina, Teodorescu Lucia, Galați, RO**

(54) Procedeu de obținere a invertazei fungice

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la un procedeu de obținere a invertazei extraceluare, cu ajutorul unei tulpini selecționate, de *Aspergillus niger*, prin cultivare pe mediu cu săruri minerale și 3% amidon, în culturi statice, 6 zile, la 28°C. Invertaza fungică este activă la pH = 4,6° și 45°C;

prezintă o bună termostabilitate, fiind inactivată în proporție de 22%, prin păstrare la 35°C, timp de 120 h, proprietăți care o recomandă pentru utilizare în industria alimentară, în scopul obținerii zahărului invert și în biotehnologia imobilizării enzimelor.

Revendicări: 1

RO 107684 B1



Prezenta invenție se referă la un procedeu microbiologic, de obținere a invertazei fungice, cu ajutorul mucegaiurilor selecționate în acest scop.

Este cunoscut că invertaza (β -fructofuranozidaza E.C.3.2. 1.26), enzimă frecvent sintetizată, de plante și microorganisme, se întâlnește sub forme multiple, diferențiate prin caractere biochimice. În timp ce plantele superioare sintetizează invertaze alcaline și acide, cu temperaturi optime de activitate, la 35 ... 40°C, microorganismele produc invertaze active, în domeniul acid al pH-ului, termostabile, proprietăți care fac din microorganisme sursa principală de obținere industrială, a invertazei. În acest scop, se folosește drojdia comprimată (*Saccharomyces cerevisiae*), drojdia de bere (*Saccharomyces uvarum*), drojdia furajeră (*Candida utilis*), pentru obținere de invertază cu multiple utilizări în industria alimentară, pentru obținerea zahărului invertit, a mierii artificiale, a produselor zaharoase, în apicultură, terapeutică, chimia analitică (Jerebțov N.A - Prikladnaia biochimia i microbiologhia nr.2, 1977, p 289 ... 292; Dobrolinskaia G.M. - Prikladnaia biochimia i microbiologhia nr.3, 1966, p 372 ... 375; Woodward J. - Immobilised cells and Enzymes IRL Press, 1988).

Este cunoscut că drojdiile conțin invertaze intracelulare, diferențiate între ele, prin specificitate față de substrat și alte proprietăți dependente de specie și condițiile de purificare a enzimei. În același timp, tehnologia de prelucrare a biomasei de celule, în scopul eliberării invertazei intracelulare, probabil reținută în plasa peptido-glicanică a peretelui celular și purificarea enzimei din drojdii, este mai dificilă decât în cazul purificării invertazelor extracelulare, produse de către mucegaiuri.

Este cunoscut că invertazele din drojdii au pH optim de activitate la pH = 3,6, în timp ce mucegaiurile produc invertaze active, la un pH mai mare de 4,5, la valori care se pretează mai bine, pentru utilizări în industria alimentară. De asemenea, în timp ce invertazele din drojdii se inactivează, prin păstrare la 70°C, în 15 min, în proporție de 82% (pentru *Saccharomyces cerevisiae*), invertazele fungice sunt mult mai termostabile

(Dan Valentina - Studiu comparativ al proprietăților *p*-fructofuranozidazei din *Aspergillus niger* și *levuri*). În plus, drojdiile de importanță industrială, ce pot fi folosite ca sursă de invertaze, nu reprezintă produse excedentare și nu pot fi scoase din circuitul productiv, în scopul obținerii de invertază.

Procedeu conform prezentei invenții înlătură dezavantajele menționate, prin aceea că, prin metode de screening, din 63 tulpini de mucegaiuri ale genului *Aspergillus* din colecția Laboratorului de Microbiologie industrială a Universității din Galați (MIUG) s-a selecționat tulpina *Aspergillus niger* MIUG-15, care, prin cultivare în mediu Czapek cu 3% amidon, în condiții staționare la 28°C, timp de 6 zile, produce invertază activă (750 UA/100 cm³ mediu), extracelulară, cu un optim de activitate la pH = 4,6 și temperatura 45°C, cu o afinitate bună față de substrat, termostabilă.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- invertaza produsă de mucegaiul selecționat, *Aspergillus niger* MIUG-15, este extracelulară și deci, tehnologia de concentrare/purificare este simplificată față de cea a enzimelor intracelulare, din drojdii la care extracția poate denatura enzima;

- invertaza fungică se poate obține în cantități nelimitate, compoziția mediului fiind simplă și independentă de o anumită materie primă;

- prezintă un optim de activitate la un pH = 4,6 similar cu cel al alimentelor acide, fără să mai necesite adaos de substanțe pentru scăderea acidității, după hidroliza zaharozei în mediu acid, la valori acceptate senzorial;

- invertaza fungică are o afinitate bună, față de substrat, în sensul că în siropuri de zaharoză 70%, activitatea relativă a invertazei este egală cu 46%, față de activitatea maximă stabilită la concentrații de 10 ... 20% zaharoză, proprietate avantajoasă la obținerea zahărului invertit, când se poate lucra cu siropuri concentrate în zahăr;

- enzima obținută conform procedului are o termostabilitate superioară invertazei din drojdie, prin aceea că, prin menținere la 70°C, timp de 1h, reducerea relativă a activității enzimatică față de cea maximă este de 53% (constantă de inactivare $K = 0,742 \text{ h}^{-1}$), iar prin păstrarea filtratului enzimatic, la 35°C, timp de 120 h, reducerea în activitate inver-

tazică a fost de numai 22% ($K = 0,002 \text{ h}^{-1}$), proprietate importantă pentru invertirea continuă a siropului de zahăr, cu invertază imobilizată.

Obținerea invertazei fungice, conform 5 procedurii ce face obiectul prezentei invenții și utilizarea sa, în industria alimentară, înlătură dezavantajul consumului de drojdie comprimată, destinată industriei de panificație, ca sursă de invertază.

Se dă, mai jos, un exemplu de realizare a procesului de obținere a invertazei fungice.

Se prepară inoculul sporifer, prin cultivarea în cultura pură a tulpinii selecționate 15 de *Aspergillus niger* MIUG-15, pe mediul de must de malț-agar înclinat în eprubete, care se termostatează la 25°C, timp de 5 ... 7 zile, pentru formarea conidiosporilor. Se prepară mediul Czapek cu 3% amidon, cu următoarea 20 compoziție:

- Amidon de cartofi	30 g	
- NaNO_3 (azotat de sodiu)	2 g	
- Fosfat dipotasic (K_2HPO_4)	1 g	
- Clorură de potasiu KCl)	0,5 g	25
- Sulfat de magneziu ($\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$)	0,5 g	
- Sulfat feros (FeSO_4)	0,01 g	
- Apă până la	1000 ml	

După obținere, se face repartizarea în vase Roux sau vase Erlenmayer cu gât larg, în 30 volume care să asigure o înălțime a stratului de lichid nutritiv, de aproximativ 2 cm, se obtu-

rează cu dopuri de vată și se face sterilizarea la 121°C, timp de 15 min. După răcire, se inoculează cu inocul sporifer antrenat în ser fiziologic de pe suprafața mediului de must malț agar înclinat, în concentrație de aproximativ 10^5 spori/cm³ mediu de cultură. Vasele se termostatează, 6 zile, la 25 ... 28°C și în filtrat, se determină activitatea invertazică. In aceste condiții *Aspergillus niger* MIUG-15 produce 750 UA/100 cm³ mediu din care 93% din enzimă este extracelulară. (O unitate de activitate reprezintă cantitatea de enzimă care catalizează hidroliza unui umol de zaharoză, după 1 min, la $\text{pH} = 4,6$ și temperatura de 30°C, dintr-o soluție de zaharoză 10%, cu formarea de zahăr reducător determinat prin metoda Schaffer Shomogy). (Methods of Analysis AOAC, 1965, p. 499 - 500).

Revendicare

Procedeu de obținere a invertazei fungice, caracterizat prin aceea că tulpina de *Aspergillus niger* MIUG-15 se cultivă în mediu Czapek cu 3% amidon, la 28°C, în condiții staționare, timp de 6 zile, după care enzima este purificată, prin metode clasice, din mediul de cultură.

Președintele comisiei de examinare: farm. Pentelescu Elena
Examinator: biochim. Crețu Adina

