



MD 4388 C1 2016.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4388** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2014 0079 (22) Data depozit: 2014.08.01	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.12.31, BOPI nr. 12/2015
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: DESEATNIC-CILOCI Alexandra, MD; TIURINA Janetta, MD; CLAPCO Steliana, MD; LABLIUC Svetlana, MD; BIVOL Cezara, MD; GRUMEZA Maria, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Procedeu de obținere a unui preparat enzimatic cu activitate β -glucozidazică

(57) Rezumat:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de obținere a unui preparat enzimatic cu activitate β -glucozidazică.

Procedeu, conform invenției, prevede însămânțarea suspensiei de spori ai tulpinii *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 în cantitate de 5,0% vol. pe un mediu de cultură cu următorul raport al componentelor, g/L: borhot de sfeclă – 25,0, tărâțe de grâu – 20,0, NaNO₃ – 3,0, KH₂PO₄ – 1,0, KCl – 0,1, CaCl₂ · 2H₂O – 0,1,

MgSO₄ · 7H₂O – 0,3 și apă până la 1,0 L, la un pH 5,5...6,0 și cultivarea submersă la temperatura de 28...30 °C cu agitare continuă, în decurs de 7 zile, apoi lichidul de cultură se separă de biomasă, se acidulează până la valoarea pH 3,0, se tratează cu alcool etilic rectificat răcit până la temperatura de -10...-12°C, în raport de respectiv 1:2, după care se separă preparatul enzimatic prin centrifugare.

Revendicări: 1

MD 4388 C1 2016.07.31

(54) Process for producing an enzymatic preparation with β -glucosidase activity**(57) Abstract:**

1
The invention relates to biotechnology, namely to a process for producing an enzymatic preparation with β -glucosidase activity.

The process, according to the invention, provides seeding of the *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 strain spore suspension in an amount of 5.0 vol. % on a culture medium with the following component ratio, g/L: beet pulp 25.0, wheat bran 20.0, NaNO_3 – 3.0, KH_2PO_4 – 1.0, KCl – 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.1,

2
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.3 and water up to 1.0 L, at a pH 5.5...6.0 and submerged cultivation at a temperature of 28...30°C with continuous stirring, for 7 days, then the culture liquid is separated from the biomass, acidified to pH value 3.0, treated with rectified ethyl alcohol cooled to a temperature of -10...-12°C, in a ratio of respectively 1:2, then the enzymatic preparation is separated by centrifugation.

Claims: 1

(54) Способ получения ферментного препарата с β -глюкозидазной активностью**(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу получения ферментного препарата с β -глюкозидазной активностью.

Способ, согласно изобретению, предусматривает посев суспензии штамма *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 в количестве 5,0% об. на питательную среду со следующим соотношением компонентов, г/л: свековичный жом – 25,0, пшеничные отруби – 20,0, NaNO_3 – 3,0, KH_2PO_4 – 1,0, KCl – 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 и вода до 1,0 л, при pH 5,5...6,0 и

2
глубинное культивирование при температуре 28...30°C с непрерывным перемешиванием, в течение 7 дней, затем культуральная жидкость отделяется от биомассы, подкисляется до pH 3,0, обрабатывается этиловым ректификованным спиртом охлажденным до температуры -10...-12°C, в соотношении 1:2, соответственно, после чего ферментный препарат отделяется центрифугированием.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de obținere a unui preparat enzimatic cu activitate β -glucozidazică.

Preparatul enzimatic hidrolitic obținut din tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 conține în calitate de componentă de bază enzima β -glucozidază cu activitate înaltă de scindare a legăturii β -glucozidice din aril β -D-glucozide și din dizaharide, în principal din celobioză, și poate fi utilizat în oenologie, pentru amplificarea aromei de soi a vinurilor de calitate, de asemenea în industriile eterooleaginoasă, farmaceutică, cosmetică, de fabricare a sucurilor, alte ramuri industriale, pentru eliberarea substanțelor aromatice care se găsesc în materia primă vegetală (struguri, pomușoare, biomasă de plante eterooleaginoase, sucuri etc.) în stare legată în formă de glucozide.

Conținutul redus al componentelor enzimatică satelite (celobiohidrolaze, endoglucanaze, xilanaze) nu diminuează valoarea practică a preparatului, astfel asigură hidroliza polizaharidelor structurale ale peretelui celular al materiei vegetale, contribuind la creșterea randamentului produsului final, favorizând activitatea β -glucozidazelor.

Se știe că tulpinile de micromicete din genurile *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* sunt principalii producători de hidrolaze exocelulare, inclusiv celuleze și xilanaze, la nivel industrial.

De asemenea este bine cunoscut că nu toate microorganismele producătoare de enzime celulozolitice au capacitatea de a produce și β -glucozidaze – componentă a complexului celulazic, spre exemplu unele tulpini din genul *Trichoderma* – cunoscute ca producătoare de celuleze, fapt ce diminuează valoarea lor industrială [1].

La numărul producătorilor activi de β -glucozidaze pot fi raportate speciile genului *Aspergillus*, în particular tulpina *Aspergillus niger* CNMN-FD-10, procedeul care prevede cultivarea submersă pe un mediu cu următoarea compoziție (g/L): borhot de sfeclă – 20, tărâțe de grâu – 20, NaNO_3 – 2,5, KH_2PO_4 – 1,0, KCl – 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3, apă până la 1L, pH-ul inițial 6,0, durata cultivării de 8 zile, și sedimentarea complexului enzimatic în condiții clasice (pH-ul nativ al lichidului cultural 7,5...8,0 și raportul V/V al lichidului cultural : alcool etilic (LC:AE) 1:4), asigură obținerea preparatului enzimatic ce conține 4 componente: celobiohidrolaze – 12...15 u/g, endoglucanaze – 450...480 u/g, xilanaze – 2800...3200 u/g, β -glucozidaze – 240...270 u/g [2].

Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în faptul că în condițiile menționate tulpina nu realizează la maximum capacitatea de biosinteză a β -glucozidazelor.

Problema pe care o soluționează invenția propusă constă în crearea condițiilor pentru intensificarea bioseintzei β -glucozidazelor de tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 10 prin elaborarea a noi regimuri de cultivare dirijată și selectarea condițiilor favorabile de sedimentare a complexului enzimatic din lichidul cultural, orientate spre păstrarea nivelului înalt al activității β -glucozidazelor.

Procedeul de obținere a unui preparat enzimatic cu activitate β -glucozidazică prevede însămânțarea suspensiei de spori de $(2,5...3,0) \times (10^6...10^7)$ spori/mL ai tulpinii *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 în cantitate de 5,0% vol. pe un mediu de cultură cu următorul raport al componentelor, g/L: borhot de sfeclă – 25,0, tărâțe de grâu – 20,0, NaNO_3 – 3,0, KH_2PO_4 – 1,0, KCl – 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 și apă până la 1,0 L, la un pH 5,5...6,0 și cultivarea submersă la temperatura de 28...30 °C cu agitare continuă, în decurs de 7 zile, apoi lichidul de cultură se separă de biomasă, se acidulează până la valoarea pH 3,0, se tratează cu alcool etilic rectificat răcit până la temperatura de -10...-12°C, în raport de respectiv 1:2, după care se separă preparatul enzimatic prin centrifugare.

Rezultatul constă în obținerea preparatului enzimatic parțial purificat, cu nivel înalt al activității β -glucozidazelor, de cel puțin 1525 u/g, ce depășește de 5,6...6,3 ori nivelul din cea mai apropiată soluție și în cantități reduse a restului componentelor complexului enzimatic: celobiohidrolaze – 4,1 u/g, endoglucanaze – 64,0 u/g, xilanaze – 1022 u/g, destinat utilizării în oenologie, pentru amplificarea aromei de soi a vinurilor de calitate, în industriile eterooleaginoasă, farmaceutică, cosmetică, de fabricare a sucurilor.

Rezultatul se datorează faptului că procedeul se efectuează în două etape.

I. Cultivarea submersă în sistem discontinuu a tulpinii de micromicete *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 timp de 7 zile, în condiții de agitare continuă la temperatura de 28...30°C, pe mediul selectat cu următoarea compoziție (g/L): borhot de sfeclă – 25,0, tărâțe de grâu – 20, NaNO₃ – 3,0, și restul sărurilor minerale în raport nemodificat – KH₂PO₄ – 1,0, KCl – 0,1, CaCl₂ · 2H₂O – 0,1, MgSO₄ · 7H₂O – 0,3, apă până la 1L, cu pH-ul inițial de 5,5...6,0.

II. Separarea preparatului enzimatic de lichidul cultural prin sedimentare cu alcool etilic care include acțiunile:

- filtrarea mecanică și centrifugarea lichidului cultural de biomasă;
- acidifierea filtratului de lichid cultural până la pH-ul 3,0;
- sedimentarea complexului enzimatic din lichidul cultural cu alcool etilic de 96°, preventiv răcit (-10... -12° C), respectând raportul LC:AE 1:2.

Avantajele procedurii:

- activitatea β-glucozidazelor înaltă datorită condițiilor special selectate de cultivare și de sedimentare din lichidul cultural, ce depășește cea mai apropiată soluție de 5,6...6,3 ori;
- reducerea duratei de cultivare cu 24 ore;
- reducerea volumului de etanol de 2 ori la recuperarea complexului enzimatic din filtratul de cultură.

Exemplul 1

I. Tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 se cultivă pe mediul optimizat, cu următoarea compoziție (g/L): borhot de sfeclă – 25,0, tărâțe de grâu – 20,0, NaNO₃ – 3,0, KH₂PO₄ – 1,0, KCl – 0,1, CaCl₂ · 2H₂O – 0,1, MgSO₄ · 7H₂O – 0,3 și apă până la 1L cu pH inițial 5,5. Mediul se repartizează câte 0,2 L în vase Erlenmayer cu capacitatea de 1L și după sterilizare prin autoclavare la 120°C, timp de 1 oră, și răcire până la 30°C se inoculează cu 5 % v/v de suspensie de spori (2,5...3,0 x 10⁶...10⁷ spori/mL) a culturii de 10...12 zile, crescută pe suprafețe înclinate de maț-agar. Retortele se montează pe un agitator cu viteza de rotație de 200 rot/min. Cultivarea se realizează în încăpere cu termostatare la temperatura de 30°C, timp de 168 ore.

II. După cultivare lichidul cultural se separă de biomasă prin filtrare mecanică sau centrifugare. Complexul enzimatic se separă din filtratul de cultură prealabil acidulat până la pH-ul 3,0 prin sedimentare cu alcool etilic rectificat, luat în raportul LC:AE de 1:2, și centrifugare la 6000 rot/min, timp de 10 min. Ulterior în preparatul obținut se determină activitățile enzimatică: β-glucozidazică, celobiohidrolazică, endoglucanazică și xilanazică, după acțiunea asupra substraturilor specifice, respectiv – *n*-nitrofenil-β-D-glucopiranozid, hartie de filtru, Na-carboximetilceluloză, și dozarea zaharurilor reducătoare, prin metoda Somogy-Nelson. În condițiile menționate aceste activități constituie (u/g): β-glucozidazică – 1545, celobiohidrolazică – 4,05, endoglucanazică – 63,8 și xilanazică – 1020.

Exemplul 2

Se repetă procedura ca în exemplul 1. Mediul nutritiv și temperatura cultivării se modifică.

I. Tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 se cultivă pe mediul cu următoarea compoziție (g/L): borhot de sfeclă – 25,0, tărâțe de grâu – 20,0, NaNO₃ – 3,0, KH₂PO₄ – 1,0, KCl – 0,1, CaCl₂ · 2H₂O – 0,1, MgSO₄ · 7H₂O – 0,3 și apă până la 1L, la un pH inițial de 6,0.

Cultivarea se efectuează în vase Erlenmayer cu capacitatea de 1 L câte 0,2 L mediu, pe un agitator cu viteza de rotație de 200 rot/min, în termostate la temperatura de 28°C, timp de 168 ore, în rest condițiile sunt identice ca în ex.1.

II. Condițiile de recuperare a complexului enzimatic din filtratul de cultură sunt identice celor din ex.1: ajustarea prealabilă a pH-ului la valoarea 3,0; raportul LC:AE 1:2.

Preparatul enzimatic obținut prezintă următoarele activități (u/g): β-glucozidazică – 1528, celobiohidrolazică – 4,07, endoglucanazică – 62,7, xilanazică – 1018.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Микробные ферменты и биотехнология. Москва, Агропромиздат, 1986, p. 154-155
2. MD 4072 B1 2010.10.31

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a unui preparat enzimatic cu activitate β -glucozidazică, care prevede însămânțarea suspensiei de spori de $(2,5...3,0) \times (10^6...10^7)$ spori/mL ai tulpinii *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 în cantitate de 5,0% vol. pe un mediu de cultură cu următorul raport al componentelor, g/L: borhot de sfeclă – 25,0, tărâțe de grâu – 20,0, NaNO₃ – 3,0, KH₂PO₄ – 1,0, KCl – 0,1, CaCl₂ · 2H₂O – 0,1, MgSO₄ · 7H₂O – 0,3 și apă până la 1,0 L, la un pH 5,5...6,0 și cultivarea submersă la temperatura de 28...30 °C cu agitare continuă, în decurs de 7 zile, apoi lichidul de cultură se separă de biomasă, se acidulează până la valoarea pH 3,0, se tratează cu alcool etilic rectificat răcit până la temperatura de -10...-12°C, în raport de respectiv 1:2, după care se separă preparatul enzimatic prin centrifugare.

Șef Direcție Brevete:

GUȘAN Ala

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

DUBĂSARU Nina

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2014 0079 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2014.08.01 Raport de documentare internațională: da
 (67)* Nr. și data transformării cererii: ,
 (71) Solicitant: **INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL
 ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**
 (54) Titlul: **Procedeu de obținere a unui preparat enzimatic hidrolitic cu activitate de profil β-
 glucozidazică cu utilizarea tulpinii de micromicete *aspergillus niger* CNMN FD 10**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): C12N 1/14
 C12N 9/24
 C12N 9/26
 C12N 9/42
 C12P 7/22
Aspergillus niger
 β-glucozidazică

"Worldwide" (Espacenet):

C12N 1/14
 C12N 9/24
 C12N 9/26
 C12N 9/42
 C12P 7/22
Aspergillus niger
 Glucosidaze

EA, CIS (Eapatis):

C12N 1/14
 C12N 9/24
 C12N 9/26
 C12N 9/42
 C12P 7/22
Aspergillus niger
 глюкозидаз

SU (nonpublic):

Alte BD –

www.google.com

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

<http://www.utilvinificatie.ro/enzime-vinificatie/enozym-arome-100g.html>

https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/Proprietatile%20fizico_chimice%20ale%20preparatu_lui%20enzimatic%20pectolitic.pdf

<http://www.scriub.com/biologie/EXTRACTIA-ENZIMELOR32652.php>

https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/016_%20Procedee%20noi%20de%20obtinere%20a%20unor%20hidrolaze%20exocelulare%20de%20origine%20fungica.pdf

<http://www.biotehnologii.usamv.ro/fisiere/file/MICROBIOLOGIE%20APLICAT%C4%82.pdf>

<http://www.dbioro.eu/agral/rezultate-763-777-ro.html>

<http://www.biotehnologii.usamv.ro/fisiere/file/Biotehnologie%20generală.pdf>

<http://www.enorom.ro/library/files/fisa%20tehnica%20Enzima%20Oeno%20Blanc%20Arom.pdf>

http://www.uaiasi.ro/ro/files/doctorat/2009_dec_Ioia_Claudia_Adriana_ro.pdf

http://www.utm.md/meridian/2012/MI_1_2012/9.%20Art.%20Sandulachi.pdf

<http://www.scrigroup.com/tehnologie/merceologie/PREPARATE-ENZIMATICE-SI-ENZIME24927.php>

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	Микробные ферменты и биотехнология. Москва, Агропромиздат, 1986, p. 154-155	1
A, D, C	MD 4072 B1 2010.10.31	1
A	MD 4121 C1 2011.07.31	1
A	MD 4186 C1 2012.11.30	1
A	CN 102154249 A 2011.08.17	1
A	CN 101649310 A 2010.02.17	1
A	CZ 9601597 A3 1997.10.15	1
A	DD 219504 A1 1985 03.06	1
A	RO 100892 A 1991.03.23	1
A	BG 29659 A1 1981.01.15	1

* categoriile speciale ale documentelor citate:

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție & – document, care face parte din aceeași familie de

	brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării 2015.09.23	
Examinator DUBĂSARU Nina	