



MD 2458 G2 2004.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2458** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/14, 9/20;
(C 12 N 1/14,
C 12 R 1:845)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2003 0184 (22) Data depozit: 2003.07.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2004.05.31, BOPI nr. 5/2004
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: DESEATNIC Alexandra, MD; SÎRBU Tamara, MD; TIURIN Janetta, MD; LABLIUC Svetlana, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Tulpină de fungi *Rhizopus arrhizus* Fischer 67, producătoare de enzime
lipolitice

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la microbiologie, în particular
la o tulpină de fungi care poate fi utilizată în
industria microbiologică pentru obținerea enzimelor
lipolitice.

Tulpina de fungi *Rhizopus arrhizus* Fischer 67,
producătoare de enzime lipolitice, este depozitată în

5
2
Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene
la Institutul de Microbiologie al AȘRM cu numărul
de înregistrare CNMN FD 03.

Tulpina se caracterizează printr-o activitate lipo-
litică înaltă și durată scurtă de cultivare.

Revendicări: 1

10

MD 2458 G2 2004.05.31

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie, în particular la o tulpină de fungi, care poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor lipolitice.

Este cunoscută tulpina de fungi *Mucor miehei* – producătoare de enzime lipolitice. Dezavantajul
5 tulpinii este capacitatea joasă de biosinteză – 4500...5000 u/mL [1].

Mai este cunoscută tulpina de fungi *Penicillium solitum* WEST IM – producătoare de enzime lipolitice. Dezavantajele acestei tulpini constau în activitatea lipolitică joasă 10500...12000 u/mL și durata de cultivare relativ mare (5 zile). Tulpina prezintă un mutant obținut prin iradiere cu raze UV [2].

10 Este cunoscută de asemenea tulpina de fungi *Aspergillus niger* 412 – producătoare de enzime lipolitice. Dezavantajele tulpinii constau în activitatea lipolitică comparativ joasă – 20500...23250 u/mL și durata de cultivare relativ mare (4 zile) [3].

Esența invenției constă în obținerea unei tulpini noi de fungi *Rhizopus arrhizus* Fischer 67 CNMN FD 03, care poate fi utilizată ca producător de enzime lipolitice (lipaze).

15 Tulpina propusă se caracterizează prin activitate lipolitică înaltă și durată scurtă de cultivare (2 zile) grație particularităților fiziologo-biochimice și metabolismului adaptiv al tulpinii. Ea se cultivă pe medii nutritive simple și ieftine.

Pentru creșterea, dezvoltarea și activitatea biosintetică a tulpinii poate fi folosit mediul cu compoziția (g): făină de soia – 35,0; K_2HPO_4 – 5,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; apă potabilă – restul până la 1 litru, pH-ul inițial – 8,0. Activitatea lipolitică a tulpinii constituie 37500...40000 u/mL.

Caracteristica cultural-morfologică a tulpinii *Rhizopus arrhizus* Fischer 67

Pe mediul agarizat Czapek se formează numeroase colonii cu dimensiunile de 2,5...3 cm. Miceliul de substrat este compact, alb, aprofundat sau așternut pe suprafața substratului, în strat spongios, străveziu. Măciuliile conidiale sunt abundente, conglomerate, de culoare cafenie. Miceliul aerian este de culoare albă cu înălțimea de 0,8...1,5 cm și grosimea de 0,8...1,0 μm. Sterigmele sunt drepte, cu ramificație dublă. Conidiile sunt sferice, de culoare cafenie deschisă, cu vârsta devin negre. Sporii sunt sferici, ovali cu mărimea de 0,5...0,8 μm. Rezervum incolor. Exudatul lipsește. Mirosul tipic de mușgai.

30 Pe mediu de malț agarizat coloniile se dezvoltă mult mai repede și au dimensiuni mai mari (5...6 cm în diametru), sunt netede sau pufoase, abundent sporulente; conidioforii scurți; miceliul de substrat compact, aprofundat, străveziu; miceliul aerian bine dezvoltat, de culoare albă.

Sursele de carbon. Asimilează bine glucoza, zaharoza, amidonul și pectina; mai slab etanolul, nu asimilează arabinoza și lactoza. Sursele de azot. Asimilează bine azotul amoniacal, mai slab nitratul de azot. Crește bine pe mediul malț-agar, tăieței de morcov și cartof.

Caracteristica fiziologo-biochimică

35 Tulpina crește și se dezvoltă bine pe mediul având componența (g): făină de soia – 35,0; K_2HPO_4 – 5,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0, apă potabilă – restul, până la 1 litru, pH-ul inițial 8,0. Tulpina se caracterizează prin activitate lipolitică extracelulară înaltă. Activitatea lipolitică maximă se înregistrează în ziua a 2-a de cultivare. Chemoorganotrof. Crește în limitele de temperaturi +5...+42°C. Temperatura optimă de creștere și biosinteză constituie +28...+30°C. Creșterea la temperaturi mai înalte (+42°C) este urmată de pierderea esențială a activității lipolitice. Limitele valorilor pH-ului pentru dezvoltarea tulpinii 7,5...8,5; pH optimal pentru biosinteza enzimelor lipolitice – 8,0. Identificarea tulpinii s-a efectuat în conformitate cu Милько А.А. Определитель мукоральных грибов. Киев, Наукова Думка, 1974.

45 Tulpina acumulează biomasă până la 20 g/L de mediu, ce conține aminoacizii (%): valină – 5,55; leucină – 6,0, tirozină – 1,04, metionină – 0,42, glicină – 7,43, treonină – 3,5 ș.a. (% din suma aminoacizilor). Posedă capacitatea de a sintetiza enzime hidrolitice extracelulare: lipaze, amilaze, proteaze. Activitatea lipolitică pe mediul nutritiv cu făină de soia și sărurile K_2HPO_4 și $(NH_4)_2SO_4$ în a 2-a zi de cultivare constituie 37500...40000 u/mL lichid cultural.

Exemplul 1

50 Tulpina este cultivată pe mediul nutritiv având componența (g): făină de soia – 35,0; K_2HPO_4 – 5,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0, apă potabilă – restul până la 1 litru, pH-ul inițial – 8,0. Sterilizarea mediului se face în autoclave la presiunea de 1 atmosferă timp de 1 oră. Însămânțarea se înfăptuiește cu suspensie apoasă de spori în volum de 10 mL cu densitatea de 3×10^6 spori/mL. Cultivarea se realizează în baloane Erlenmayer de 0,5 L cu 100 mL mediu, în condiții de agitare continuă timp de 2 zile la temperatura de 28°C. Activitatea lipolitică constituie 37000 u/mL.

Exemplul 2

55 Tulpina este cultivată pe mediul nutritiv având componența (g): făină de soia – 35,0; K_2HPO_4 – 5,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0, apă potabilă – restul, până la 1 litru, pH-ul inițial – 8,0. Sterilizarea mediului se

MD 2458 G2 2004.05.31

4

face în autoclave la presiunea de 1 atmosferă timp de 1 oră. Însămânțarea se înfăptuiește cu suspensie apoasă de spori în volum de 10 mL cu densitatea de 3×10^6 spori/mL. Cultivarea se realizează în baloane Erlenmayer de 1,0 L cu 100 mL mediu, în condiții de agitare continuă timp de 2 zile la temperatura de 30°C. În ziua a 2-a de cultivare activitatea lipolitică constituie 40000 u/mL.

5

(57) Revendicare:

10

1. Tulpină de fungi *Rhizopus arrhizus* Fischer 67 CNMN FD 03 producătoare de enzime lipolitice.

(56) Referințe bibliografice:

1. Гулямова К.А. Липаза гриба *Mucor miehei* и ее свойства. Автореферат дис. канд. биол. наук. Ташкент, 1992, с. 9
2. SU 847680
3. MD 2362 F1 2004.01.31

Director Departament
Invenții:

CRECETOV Veaceslav

Examinator:

GUȘAN Ala

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2003 0184	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2003.07.23	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.: 32) data : 33) țara : (51) ⁷ : C 12 N 1/14, 9/20; (C 12 N 1/14, C 12 R 1:845) Alți indici de clasificare: Titlul : Tulpină de fungi Rhizopus arrhizus Fischer 67 CNMN FD-03 - sursă de enzime lipolitice (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : tulpină de fungi, enzime lipolitice	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))	
MD 1993-2003, EA 1996-2003, SU 1970-1991	
Int. Cl. ⁷ C 12 N 1/14, 9/20; (C 12 N 1/14, C 12 R 1:845)	
II. Documente considerate ca relevante	
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente
A	Гулямова К.А. Липаза гриба <i>Mucor miehei</i> и ее свойства. Автореферат дис. канд. биол. наук. Ташкент, 1992, с. 9
A	SU 847680
A	MD 2362 F1 2004.01.31
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II	
☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează	
* categoriile speciale ale documentelor consultate:	P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general	T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data	X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)	Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă	& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării 2004.03.03.	
Examinatorul Ala Gușan	

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4