



MD 2363 F1 2004.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2363** <sup>(13)</sup> **F1**  
(51) **Int. Cl.<sup>7</sup>**: C 12 N 1/14, 9/30

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<b>Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării</b>	
(21) Nr. depozit: a 2002 0257 (22) Data depozit: 2002.10.24	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2004.01.31, BOPI nr. 1/2004
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: DESEATNIC-CILOCI Alexandra, MD; TIURIN Jana, MD; LABLIUC Svetlana, MD; LĂZĂRESCU Ana, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) **Tulpină de fungi *Aspergillus niger* 33-19 - producătoare de enzime  
amilolitice**

(57) **Rezumat:**

1  
Invenția se referă la biotehnologie, în particular  
la o tulpină de fungi nouă, care poate fi utilizată în  
industria microbiologică pentru obținerea enzi-  
melor amilolitice, în industria alimentară la pro-  
ducerea amidonului, alcoolului, în panificație, în  
industria farmaceutică pentru obținerea prepara-  
telor medicinale.

2  
Se propune o tulpină nouă de fungi *Aspergillus*  
5 *niger* 33-19, depusă în Colecția Națională de  
Microorganisme a Institutului de Microbiologie al  
AȘ RM cu nr. CNM FD 02 – producătoare de  
enzime amilolitice. Tulpina se caracterizează prin  
nivel înalt de biosinteză a amilazelor.  
10 Revendicări: 1

MD 2363 F1 2004.01.31

## MD 2363 F1 2004.01.31

3

### Descriere:

- Invenția se referă la biotehnologie, în particular la o tulpină de fungi care poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor amilolitice, în industria alimentară la producerea amidonului, alcoolului, în panificație, în industria farmaceutică pentru obținerea preparatelor medicamentoase.
- Sunt cunoscute un șir de tulpini de fungi – producătoare de enzime amilolitice, printre care în primul rând pot fi menționați fungii din genul *Aspergillus*. La ei se raportează și tulpina *Aspergillus oryzae* HPB-169, considerată de noi drept cea mai apropiată soluție, care manifestă activitate amilolitică maximă 40...50 u/mL [1].
- Dezavantajul tulpinii menționate constă în nivelul scăzut de biosinteză a enzimelor amilolitice. Pe lângă aceasta ea nu realizează hidroliza amidonului în condiții acide de pH.
- Este cunoscut faptul că dintre tulpinile genului *Aspergillus* numai *Aspergillus niger* (unii reprezentanți ai speciei *niger* a genului respectiv) produc enzime amilolitice, care se caracterizează prin însușirea unică – stabilitate acidă sporită. Această proprietate a enzimelor amilolitice de a hidroliza substraturile bogate în amidon în mediul de pH acid ridică valoarea lor practică, oferind posibilități de realizare a proceselor tehnologice la valori scăzute de pH. În astfel de condiții are loc reducerea riscului de contaminare cu microorganisme patogene și mărirea rentabilității producerii [2].
- Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unei tulpini noi de fungi, ce ar asigura un nivel înalt de biosinteză a enzimelor amilolitice, realizând hidroliza atât în condiții standard, cât și în condiții optime acide de pH.
- Esența invenției constă în faptul că se propune o tulpină nouă de fungi *Aspergillus niger* 33-19, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme a Institutului de Microbiologie al A.Ș. R.M. cu nr. CNM FD 02 – sursă de enzime amilolitice.
- Rezultatul invenției constă în obținerea unei tulpini noi *Aspergillus niger* 33-19 cu nivel înalt de biosinteză a enzimelor amilolitice acidstabile cu capacitate de a realiza hidroliza efectivă a amidonului atât în condiții standard, cât și optime acide de pH. Rezultatul este condiționat de proprietățile fiziologo-biochimice (procesele anabolice și catabolice care decurg în acest organism) și metabolismul adaptiv al tulpinii.
- Tulpina *Aspergillus niger* 33-19 propusă a fost obținută în urma iradierii cu raze  $\gamma$  în doză de 1500 Gy a suspensiei de spori a tulpinii *Aspergillus niger* 33 pentru care preventiv au fost selectate condițiile optime de cultivare pentru atingerea potențialului maximal de biosinteză a enzimelor amilolitice.
- Nivelul de sinteză a enzimelor amilolitice al tulpinii *Aspergillus niger* 33-19 depășește de 4 ori nivelul tulpinii parentale.
- Stabilitatea biochimică a tulpinii propuse a fost verificată timp de 2 ani.
- Pentru creșterea și dezvoltarea tulpinii poate fi folosit mediul cu compoziția (g/L): făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0;  $MgSO_4$  - 0,5;  $KH_2PO_4$  - 2,0; KCl - 0,5; restul apă potabilă până la 1 L; pH-ul mediului - 5,0. Activitatea amilolitică constituie 413 u/mL în condiții standard de hidroliză și 346 u/mL în condiții acide de pH.
- Caracteristica morfologo-culturală** a tulpinii *Aspergillus niger* 33-19: miceliul de substrat compact, alb cu hife subțiri; capsulele conidiale abundente, conglomerate, de culoare neagră pal; conidioforii incolori, neseptați, cu o lărgire apicală sferică de 45...80  $\mu m$  în diametru. Lățimea conidioforilor de 15...20  $\mu m$ ; sterigmele cafenii stratificate: bazale de 20...40 x 5...7  $\mu m$ , uneori septate, stratul exterior de 7...10 x 3...3,5  $\mu m$ ; conidiile sferice, având 4...5  $\mu m$  în diametru, cafenii, cu înveliș bine evidențiat, rugos.
- Pe mediul de malț agarizat coloniile au 2...3 cm în diametru, sunt netede, sporulează slab. Miceliul culturii tinere este alb, pufoș. În a 14-a zi de dezvoltare unele porțiuni ale miceliului devin cafeniu-negrii. Conidioforii cu conidii sferice negre se repartizează la marginile coloniei. Rezervumul alb, cutat radial.
- Pe mediul nutritiv (Czapek Dox) coloniile se dezvoltă lent, atingând în diametru 1,5...2,0 cm. Partea opusă a coloniei este albă, cutată mai slab radial. Temperatura optimă de creștere +30°C.
- Caracteristica fiziologo-biochimică:** tulpina crește pe surse de azot organice, amoniacale și pe bază de azotați; se caracterizează prin activitate amilolitică extracelulară înaltă. Activitatea amilolitică maximă se înregistrează în ziua a 6-a de cultivare.
- Chemoorganotrof:** Crește în limitele de temperaturi +5...+42°C. Temperatura optimă de creștere și biosinteză +28...+30°C. Creșterea la temperaturi mai înalte (+42°C) este urmată de pierderea esențială a activității amilolitice. pH optimă pentru biosinteza enzimelor amilolitice constituie 5,0...5,2.
- Produsele sintetizate de tulpină:** tulpina acumulează biomasă până la 15 g/L de mediu, cu indicii de compoziție (%): proteină brută - 19,39, grăsimi brute - 5,76, substanțe minerale (cenușă) - 11,61.

# MD 2363 F1 2004.01.31

4

Posedă capacitatea de a sintetiza enzime hidrolitice extracelulare: amilolitice, lipolitice, proteolitice.

5 *Metoda, condițiile și componența mediilor pentru păstrarea tulpinii:* tulpina se păstrează pe medii înclinate de malț (7B) sau Czapek agarizate, la temperatura de 3...7°C. Termenul de reinsămânțare: la fiecare 2 luni.

*Metoda, condițiile și componența mediilor pentru înmulțirea tulpinii:* reproducerea tulpinii se realizează pe mediul de păstrare sau alte medii utilizate în aceste scopuri (malț-agar, Czapek), temperatura de creștere +28...+30°C, durata de creștere 14 zile.

10 *Condițiile și componența mediului pentru fermentare:* cultivarea submersă a producătorului se realizează în baloane Erlenmayer, pe agitatoare cu 80...200 r.p.m. în decurs de 4 zile, la temperatura 28...30°C, pe mediul nutritiv cu compoziția (g/L): amidon - 3,0; făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; MgSO<sub>4</sub> - 0,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 2,0; KCl - 0,5; apă potabilă până la 1 L, pH 5,0.

*Gradul de puritate al tulpinii:* pentru cultivarea tulpinii sunt necesare condiții sterile, în caz contrar poate să fie contaminată cu alte microorganisme (bacterii, mucegaiuri, drojdii).

15 *Exemplu de utilizare a tulpinii*

#### *Exemplul 1*

În baloane Erlenmayer cu capacitatea de 1,0 L se pregătesc câte 200 mL de mediu nutritiv cu următoarea componență, (g/L): amidon - 3,0; făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; MgSO<sub>4</sub> - 0,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 2,0; KCl - 0,5; apă potabilă - 1,0; pH mediului - 5.

20 Mediul se sterilizează în autoclav la presiunea 1 atm și temperatura de 120°C timp de 1 h. Se inoculează cu suspensie de spori ai tulpinii obținute *Aspergillus niger* 33-19.

Cultivarea tulpinii are loc în termostate la temperatura de +30°C în decurs de 6 zile în condiții de agitare continuă cu 180...200 r.p.m.

25 Activitatea amilolitică a lichidului cultural al tulpinii *Aspergillus niger* 33-19 în ziua a 6-a, determinată după metoda colorimetrică, constituie 413...425 u/mL la hidroliza amidonului în condiții standard și 346...351 u/mL în condiții acide conform invenției (tabel).

Tulpina	Nr. probei	Activitatea amilolitică, u/mL	
		pH 4,7	pH 2,5
<i>Aspergillus niger</i> 33-19	1	425,0	349,3
	2	413,1	346,1
	3	417,1	351,5
<i>Aspergillus niger</i> 33*	1	96,5	91,3

\*Condițiile de cultivare, indicate în ex. 1 sunt optime și pentru tulpina parentală.

30 Astfel, activitatea amilolitică pentru tulpina propusă *Aspergillus niger* 33-19 depășește de 4 ori activitatea tulpinii conform celei mai apropiate soluții și de 7 ori activitatea conform soluției apropiate.

Tulpina nouă se caracterizează prin stabilitate înaltă acidă a amidazelor biosintetizate.

35

#### **(57) Revendicare:**

1. Tulpină de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNM FD 02 – producătoare de enzime amilolitice.

40

#### **(56) Referințe bibliografice:**

1. SU 1158579 A 1985.05.30

2. Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. Тбилиси, Мецниереба, 1984, с. 154

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

LOZOVANU Maria

## RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2002 0257	(85) Data fazei naționale PCT:	
(22) Data depozit: 2002.10.24	(86) Cerere internațională PCT:	
Prioritatea invocată : (31) nr.:            32) data :            33) țara : (51) <sup>7</sup> : C 12 N 1/14, 9/30 Alți indici de clasificare: <b>Titlul</b> : Tulpină de fungi <i>Aspergillus niger</i> 33-19 producător de enzime amilolitice (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici: <i>Aspergillus niger</i> , enzime amilolitice		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
MD 1993-2003, EA 1996-2003, SU fond BRȘT Int. Cl. <sup>7</sup> C 12 N 1/14, 9/30		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	SU 1440922 A1 1988.11.30	1
A	SU 1158579 A 1985.05.30	1
A	Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. Тбилиси, Мецниереба, 1984, с. 154	1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> 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 evidența 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		2003.11.04
Examinatorul		Bantaș Valentina