MD 2363 G2 2004.01.31

# REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2363 (13) G2
(51) Int. Cl.[7]: C 12 N 1/14, 9/30

# (12) BREVET DE INVENȚIE

| | |
|---|---|
| **(21) Nr. depozit:** a 2002 0257<br>**(22) Data depozit:** 2002.10.24 | **(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:**<br>2004.01.31, BOPI nr. 1/2004 |

**(71) Solicitant:** INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINȚE 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 ŞTIINȚE 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 enzimelor amilolitice, în industria alimentară la producerea amidonului, alcoolului, în panificație, în industria farmaceutică pentru obținerea preparatelor medicinale.

2

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

Revendicări: 1

MD 2363 G2 2004.01.31

**Descriere:**

Invenţia se referă la biotehnologie, în particular la o tulpină de fungi care poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obţinerea enzimelor amilolitice, în industria alimentară la producerea amidonului, alcoolului, în panificaţie, în industria farmaceutică pentru obţinerea preparatelor medicamentoase.

Sunt cunoscute un şir de tulpini de fungi – producătoare de enzime amilolitice, printre care în primul rând pot fi menţionaţi fungii din genul *Aspergillus*. La ei se raportă şi tulpina *Aspergillus oryzae* HPB-169, considerată de noi drept cea mai apropiată soluţie, care manifestă activitate amilolitică maximă 40…50 u/mL [1].

Dezavantajul tulpinii menţionate constă în nivelul scăzut de biosinteză a enzimelor amilolitice. Pe lângă aceasta ea nu realizează hidroliza amidonului în condiţii acide de pH.

Este cunoscut faptul că dintre tulpinile genului *Aspergillus* numai *Aspergillus niger* (unii reprezentanţi ai speciei *niger* a genului respectiv) produc enzime amilolitice, care se caracterizează prin însuşirea unicală – 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 posibilităţi de realizare a proceselor tehnologice la valori scăzute de pH. În astfel de condiţii are loc reducerea riscului de contaminare cu microorganisme patogene şi mărirea rentabilităţii producerii [2].

Problema pe care o rezolvă prezenta invenţie constă în obţinerea unei tulpini noi de fungi, ce ar asigura un nivel înalt de biosinteză a enzimelor amilolitice, realizând hidroliza atât în condiţii standard, cât şi în condiţii optimal acide de pH.

Esenţa invenţiei constă în faptul că se propune o tulpină nouă de fungi *Aspergillus niger 33-19*, depozitată în Colecţia Naţională de Microorganisme a Institutului de Microbiologie al A.Ş. R.M. cu nr. CNM FD 02 – sursă de enzime amilolitice.

Rezultatul invenţiei constă în obţinerea 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 condiţii standard, cât şi optimal acide de pH. Rezultatul este condiţionat de proprietăţile fiziologo-biochimice (procesele anabolice şi catabolice care decurg în acest organism) şi metabolismul adaptiv al tulpinii.

Tulpina *Aspergillus niger* 33-19 propusă a fost obţinută 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 condiţiile optime de cultivare pentru atingerea potenţialului maximal de biosinteză a enzimelor amilolitice.

Nivelul de sinteză a enzimelor amilolitice al tulpinii *Aspergillus niger* 33-19 depăşeşte de 4 ori nivelul tulpinii parentale.

Stabilitatea biochimică a tulpinii propuse a fost verificată timp de 2 ani.

Pentru creşterea şi dezvoltarea tulpinii poate fi folosit mediul cu compoziţia (g/L): făină de fasole - 9,0; tărâţe 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 condiţii standard de hidroliză şi 346 u/mL în condiţii acide de pH.

*Caracteristica morfologo-culturală* a tulpinii *Aspergillus niger* 33-19: miceliul de substrat compact, alb cu hife subţiri; capsulele conidiale abundente, conglomerate, de culoare neagră pal; conidioforii incolori, neseptaţi, cu o lărgire apicală sferică de 45…80 μm în diametru. Lăţimea conidioforilor de 15…20 μm; sterigmele cafenii stratificate: bazale de 20…40 x 5…7 μm, uneori septate, stratul exterior de 7…10 x 3…3,5 μm; conidiile sferice, având 4…5 μm în diametru, cafenii, cu înveliş bine evidenţiat, rugos.

Pe mediul de malţ agarizat coloniile au 2…3 cm în diametru, sunt netede, sporulează slab. Miceliul culturii tinere este alb, pufos. În a 14-a zi de dezvoltare unele porţiuni 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 creştere +30°C.

*Caracteristica fiziologo-biochimică*: tulpina creşte pe surse de azot organice, amoniacale şi pe bază de azotaţi; se caracterizează prin activitate amilolitică extracelulară înaltă. Activitatea amilolitică maximă se înregistrează în ziua a 6-a de cultivare.

*Chemoorganotrof.* Creşte în limitele de temperaturi +5…+42°C. Temperatura optimă de creştere şi biosinteză +28…+30°C. Creşterea la temperaturi mai înalte (+42°C) este urmată de pierderea esenţială a activităţii amilolitice. pH optimal 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 compoziţie (%): proteină brută - 19,39, grăsimi brute - 5,76, substanţe minerale (cenuşă) - 11,61.

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

*Metoda, condiţiile şi componenţa mediilor pentru păstrarea tulpinii*: tulpina se păstrează pe medii înclinate de malţ (7B) sau Czapek agarizate, la temperatura de 3…7°C. Termenul de reînsămânţare: la fiecare 2 luni.

*Metoda, condiţiile şi componenţa mediilor pentru înmulţirea tulpinii*: reproducerea tulpinii se realizează pe mediul de păstrare sau alte medii utilizate în aceste scopuri (malţ-agar, Czapek), temperatura de creştere +28…+30°C, durata de creştere 14 zile.

*Condiţiile şi componenţa mediului pentru fermentare*: cultivarea submersă a producentului 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 compoziţia (g/L): amidon - 3,0; făină de fasole - 9,0; tărâţe de grâu - 18,0; $MgSO_4$ - 0,5; $KH_2PO_4$ - 2,0; KCl - 0,5; apă potabilă până la 1 L, pH 5,0.

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

*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 componenţă, (g/L): amidon - 3,0; făină de fasole - 9,0; tărâţe de grâu - 18,0; $MgSO_4$ - 0,5; $KH_2PO_4$ - 2,0; KCl -0,5; apă potabilă - 1,0; pH mediului - 5.

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

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

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 condiţii standard şi 346…351 u/mL în condiţii acide conform invenţiei (tabel).

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

*Condiţiile de cultivare, indicate în ex. 1 sunt optimale şi pentru tulpina parentală.

Astfel, activitatea amilolitică pentru tulpina propusă *Aspergillus niger* 33-19 depăşeşte de 4 ori activitatea tulpinii conform celei mai apropiate soluţii şi de 7 ori activitatea conform soluţiei apropiate.

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

**(57) Revendicare:**

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

**(56) Referinţe bibliografice:**

1. SU 1158579 A 1985.05.30
2. Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. Тбилиси, Мецниереба, 1984, с. 154

**Şef Secţie:** GUŞAN Ala

**Examinator:** BANTAŞ Valentina

**Redactor:** LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

| | |
|---|---|
| (21) Nr. depozit: a 2002 0257<br><br>(22) Data depozit: 2002.10.24 | (85) Data fazei naționale PCT:<br><br>(86) Cerere internațională PCT: |

Prioritatea invocată :
(31) nr.: 32) data : 33) țara :
(51)[7] : C 12 N 1/14, 9/30
Alți indici de clasificare:
**Titlul** : Tulpină de fungi Aspergillus niger 33-19 producător de enzime amilolitice
(71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD
Termeni caracteristici: *Aspergillus niger,* enzime amilolitice

I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării şi indici de clasificare Int. Cl. (7)

MD 1993-2003,
EA 1996-2003,
SU fond BRŞT
Int. Cl.[7] C 12 N 1/14, 9/30

II. Documente considerate ca relevante

| Categoria* | Date de identificare ale documentelor citate si 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 |

| | |
|---|---|
| ☐ **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 defineşte 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 aceiaşi 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 aceiaşi familie de documente |

Data finalizării documentării 2003.11.04

Examinatorul Bantaş Valentina