



MD 2588 G2 2004.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **2588** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) **Int. Cl.⁷**: C 12 N 1/14 ,
(C 12 N 1/14,
C 12 R 1:80), 9/42

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2004 0061 (22) Data depozit: 2004.03.19	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2004.10.31, BOPI nr. 10/2004
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: DESEATNIC Alexandra, MD; PAȘA Lilia, MD; CLAPCO Steliana, MD; TIURIN Janetta, MD; LABLIUC Svetlana, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) **Tulpină de fungi *Penicillium expansum* - producătoare de celulaze**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular
la o tulpină de fungi, care poate fi utilizată în
5 industriile microbiologică, alimentară și farmaceu-
tică.

Se propune o tulpină de fungi *Penicillium
expansum* – producătoare de celulaze, depusă în
Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene
a Republicii Moldova sub nr. CNMN FD 05 C.

2
Tulpina se caracterizează prin activitate celulozoli-
5 tică înaltă a complexului enzimatic ce conține endo-
glucanaze, celobiohidrolaze și β -glucozidaze,
activitatea cărora constituie 42,43; 2,07 și 4,08
U/ml, corespunzător.

Revendicări: 1

10

MD 2588 G2 2004.10.31

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la o tulpină de fungi, care poate fi utilizată în industriile microbiologică, alimentară și farmaceutică.

În prezent cei mai activi producători de celuloze se consideră tulpinile de fungi din genul *Trichoderma*. Preparatele enzimactice obținute din tulpinile respective posedă doar celobiohidrolaze și nu sunt active față de celuloza cristalină sau solubilă (carboximetilceluloza), de asemenea în aceste preparate lipsesc celobiazazele (β -glucozidazele), ceea ce se manifestă prin acumularea celobiozei în hidrolizat și reducerea vitezei de formare a glucozei. Producerea unor complexe celulozice mai echilibrate este caracteristică tulpinilor din genurile *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium* etc. [1].

În calitate de cea mai apropiată soluție servește tulpina *Aspergillus fumigatus*, al cărei complex celulozic posedă activitate după hârtia de filtru $2,5 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ și β -glucozidazică $0,725 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Dezavantajul tulpinii date constă în lipsa componentului endoglucanazic activ, care creează noi extremități nereducătoare – țințe pentru acțiunea celobiohidrolazelor, respectiv sporind randamentul hidrolizei [2].

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în evidențierea unei noi tulpini de fungi, care în condițiile cultivării submersive posedă capacitatea de biosinteză a unui complex enzimatic integru, care conține celobiohidrolaze, endoglucanaze și β -glucozidaze într-un raport echilibrat, astfel asigurând hidroliza eficientă a biomasei celulozocomponente.

Esența invenției o constituie tulpina de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C – producătoare a unui complex enzimatic cu un conținut echilibrat al endoglucanazelor, celobiohidrolazelor și β -glucozidazelor activitatea cărora este respectiv de $42,43 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$; $2,07 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$; $4,08 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Tulpina *Penicillium expansum* este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Republicii Moldova sub nr. CNMN FD05C.

Rezultatul invenției constă în producerea unui preparat enzimatic celulozolit, care asigură dezintegrarea profundă și eficientă a biomasei celulozocomponente.

Particularitățile morfologico-culturale ale tulpinii. Pe must de malț-agar coloniile cresc rapid. Inițial acestea sunt albe, după 3 zile, când începe formarea conidioforilor cu conidii colonia capătă o culoare cenușie cu nuanță verzuie, având o suprafață uniformă, catifelată. Marginile coloniei rămân albe, rar galbene. Reversul este de culoare cafenie. Pe mediul Czapek cu zaharoză coloniile cresc rapid, sunt extinse, regiunea cu conidiofori are o culoare verde murdar, reversul – cafeniu. Conidioforii sub formă de ramificații scurte ale hifelor. Conidiile au formă elipsoidală, aproape sferică, $3 \times 3,4 \text{ } \mu\text{m}$, în lanțuri.

Particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii. Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C crește pe mediile: must de malț-agar, Czapek-agar, cartof-agar în limitele de temperatură $+5 \dots +45^\circ\text{C}$. Temperatura optimă de creștere $+28 \dots +30^\circ\text{C}$.

Cultivată submersiv pe mediile Czapek cu $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ hartie de filtru, mediul Ghetsinson cu $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ extract de porumb și $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ celuloză microcristalină sau cu alte surse naturale de carbon (paie de porumb, tescovină de mere, borhot de sfeclă) în concentrație de $10 \dots 60 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ tulpina crește intens și manifestă activitate endoglucanazică, celobiohidrolazică și β -glucozidazică.

Pe mediul Ghetsinson cu surse ușor asimilabile de carbon (mono- și dizaharide) tulpina crește intens, dar activitățile menționate diminuează.

Tulpina nu asimilează amidon.

În calitate de surse de azot asimilează azotul nitric și amoniacal, precum și azotul din surse organice: extract de porumb, drojdii etc.

Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și β -glucozidazică se depistează în lichidul cultural după 24 ore de cultivare submersivă pe mediul Ghetsinson cu $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ celuloză microcristalină și $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ extract de porumb, fiind în creștere acestea ating indicele maxim după 168 ore de cultivare.

Dezvoltarea tulpinii are loc la pH-ul cuprins în limitele $2,5 \dots 9,0$; pH-ul mediului, optimal pentru biosinteza enzimelor menționate, este de $5,5 \dots 6,5$.

Pentru păstrarea îndelungată a tulpinii cultura de 14 zile, crescută la temperatura de 30°C pe coloane oblice de must de malț-agar, este conservată în frigider la $+4^\circ\text{C}$. Pasaje pe mediu proaspăt se efectuează la fiecare 6 luni.

Tulpina este înmulțită pe coloane oblice de must de malț-agar. Pasaje se efectuează prin porțiuni de miceliu cu conidii.

Cultivarea se realizează în termostate la temperatura de $+30^\circ\text{C}$ timp de $10 \dots 14$ zile.

MD 2588 G2 2004.10.31

4

Exemple de utilizare a tulpinii

Exemplul 1

5 Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C s-a cultivat în baloane Erlenmayer de 0,5 l cu 0,1 l mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă ($180 \text{ rot} \cdot \text{min}^{-1}$), la temperatura de 30°C , timp de 168 ore. Compoziția mediului (g): $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1$; $\text{CaCl}_2 - 0,1$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,3$; $\text{KCl} - 0,1$; $\text{NaNO}_3 - 2,5$; $\text{FeCl}_3 - 0,01$; celuloză microcristalină - 10; extract de porumb - 15; apă distilată 1 litru la pH-ul de 4,5.

10 Separarea lichidului cultural de biomasă s-a efectuat prin filtrare. Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică, β -glucozidazică și xilanazică s-au determinat prin dozarea zaharurilor reducătoare (metoda Somogy-Nelson) în urma acțiunii lichidului cultural asupra substratelor specifice: Na-carboximetilceluloză, hârtie de filtru și p-nitrofenil- β -D-glucopiranozid și au avut valorile $39,4 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$; $2,07 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ și $4,08 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ respectiv.

Exemplul 2

15 Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD05C s-a cultivat în baloane Erlenmayer de 0,5 l cu 0,1 l mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă ($180 \text{ rot} \cdot \text{min}^{-1}$), la temperatura de 28°C , timp de 168 ore. Compoziția mediului (g): $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1$; $\text{CaCl}_2 - 0,1$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,3$; $\text{KCl} - 0,1$; $\text{NaNO}_3 - 2,5$; $\text{FeCl}_3 - 0,01$; celuloză microcristalină - 10; extract de porumb - 15; apă distilată 1 litru la pH-ul de 5,5.

20 Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și β -glucozidazică au avut valorile $42,43 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$; $1,66 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ și $5,03 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ respectiv.

(57) Revendicare:

25 1. Tulpină de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C – producătoare de celulaze.

(56) Referințe bibliografice:

1. Biotehnologie. Coordonateur Rene Scriban. TEC&DOC, Paris, 1999, p. 67
2. SU 1440920 A1 1988.11.30

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2004 0061	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2004.03.19	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.: 32) data : 33) țara : (51) ⁷ : C 12 N 9/42, 9/00, 1/14 Alți indici de clasificare: Titlul : Tulpina de fungi <i>Penicillium expansum</i> CNMN FD 05 C - producator de celuloze (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici: tulpina de fungi <i>Penicillium</i> , producătoare de celuloze	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))	
MD 1994-2003 EA 1996-2003 SU fond BRIT Int. Cl. ⁷ C 12 N 9/42, 9/00, 1/14	
II. Documente considerate ca relevante	
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente
A	SU 1440920 A1 1988.11.30
A	SU 1643608 A1 1991.04.23
A	SU 1445180A1
A	SU 923188 A1 1994.01.30
A	SU 1125247 A 1984.11.23
A	SU 1252336 A1 1986.08.23
☐ 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	2004.08.03
Examinatorul	Bantaș Valentina