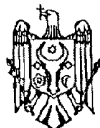




MD 4072 C1 2010.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4072** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2010 0041 (22) Data depozit: 2010.03.12	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.10.31, BOPI nr. 10/2010
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: CILOCI Alexandra, MD; TIURINA Janeta, MD; CLAPCO Steliana, MD; LABLIUC Svetlana, MD; STRATAN Maria, MD; GRUMEZA Maria, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Tulpină de fungi *Aspergillus niger* - producătoare de enzime cu activitate celulozolică și xilanazică

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de fungi noi, care poate fi
5 utilizată în industriile microbiologică, alimentară, eterooleaginoasă și farmaceutică, precum și în enologie și la producerea furajelor.

Se propune o tulpină de fungi *Aspergillus niger*, depozitată în Colecția Națională de

2
Microorganisme Nematogene a A.Ș.M. cu nr. CNMN FD 10, în calitate de producător al complexului enzimatic hidrolitic ce posedă activitate celulozolică și xilanazică.

10 Revendicări: 1

15

MD 4072 C1 2010.10.31

(54) Strain of *Aspergillus niger* fungi - producers of enzymes with cellulolytic and xylanase activity

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, in particular to a new fungus strain, which can be used in microbiological, food, ether-bearing and pharmaceutical industries, as well as wine making and fodder production.

It is proposed a strain of fungus *Aspergillus niger*, deposited in the National Collection of

2
Nonpathogenic Microorganisms of the ASM under № CNMN FD 10, as a producer of hydrolytic enzyme complex possessing cellulolytic and xylanase activity.

Claims: 1

15

(54) Штамм гриба *Aspergillus niger* - продуцент ферментов с целлюлолитической и ксиланазной активностью

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к штамму нового гриба, который может быть использован в микробиологической, пищевой, эфиромасличной и фармацевтической промышленности, а также в виноделии и кормопроизводстве.

2
Предлагается штамм гриба *Aspergillus niger*, депонированный в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов АНМ под № CNMN FD 10, в качестве продуцента гидролитического ферментного комплекса, обладающего целлюлолитической и ксиланазной активностью.

П. формулы: 1

15

MD 4072 C1 2010.10.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de fungi noi, care poate fi utilizată în industriile microbiologică, alimentară, eterooleaginoasă și farmaceutică, precum și în enologie și la producerea furajelor.

- 5 Pentru obținerea enzimelor celulozolitice, xilanazice sunt utilizate, în special, tulpinile fungice din genul *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* – producătoare activă a unui spectru larg de hidrolaze exocelulare [1].

- În calitate de cea mai apropiată soluție putem menționa tulpina *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D, care sintetizează un complex enzimatic cu acțiune celulozolică, xilanazică. În condiții standard de hidroliză (pH – 5,0; temperatura – 50°C) tulpina manifestă activitate enzimatică ce constituie: β -glucozidazică – 25,0 u/g; celobiohidrolazică – 22,8 u/g; endoglucanazică – 240,8 u/g; xilanazică – 90 u/g [2].

Dezavantajul tulpinii menționate constă în nivelul scăzut al activității β -glucozidazice și xilanazice, ceea ce reduce domeniile de aplicare.

- 15 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unei tulpini noi de fungi cu complexul enzimatic hidrolitic ce posedă activitate celulozolică și xilanazică.

Esența invenției o constituie tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 10 – producătoare de enzime cu activitate celulozolică și xilanazică.

- 20 Tulpina de fungi *Aspergillus niger* este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a A.Ș.M. sub nr. CNMN FD 10 în calitate de producător al complexului enzimatic hidrolitic ce posedă activitate celulozolică și xilanazică.

- Tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 10 la cultivarea pe medii nutritive ieftine, în bază de deșeuri ale industriei alimentare, sintetizează un complex de enzime celulozolitice: β -glucozidaze – 24...270 u/g; celobiohidrolaze – 12...15 u/g; endoglucanaze – 450...480 u/g și xilanaze – 2800...3200 u/g, ce posedă activitate β -glucozidazică și xilanazică înaltă, fapt ce permite aplicarea acestuia în ramurile economiei naționale ce implică hidroliza aril β -glucozidazelor și hemicelulozelor (xilani, arabani etc.), și anume în enologie, industria eterooleaginoasă, farmaceutică, producerea sucurilor etc.

- 30 Rezultatul tehnic obținut la implementarea invenției constă în producerea unui complex enzimatic hidrolitic cu un spectru larg de acțiune (β - glucozidaze, xilanaze, celobiohidrolaze, endoglucanaze), capabil să realizeze hidroliza diverselor tipuri de materie primă vegetală pentru obținerea produselor alimentare, remediilor medicamentoase, furajelor.

Particularitățile morfologo-culturale ale tulpinii *Aspergillus niger*

Crește bine pe diverse medii agarizate.

- 35 Pe mediul malț-agar formează colonii pufoase cu diametrul de 3,0 cm, abundent sporulate. Miceliul de substrat este compact, alb, aderent la mediu. Conidioforii sunt incolori, veziculele sunt de culoare cafenie-neagră, conidiile cafenii-negre, sferice, riguroase. Exudatul lipsește. Se sesizează un miros tipic de mucegai. Reversul este incolor.

- 40 Pe mediul Czapek cultura prezintă colonii netede de 1,0...1,5 cm, de culoare neagră. Miceliul de substrat este alb, aderent la mediu. Conidioforii sunt incolori, veziculele sunt globoase, de culoare neagră intensă. Conidiile sunt sferice, uneori slab alungite, riguroase. Exudatul lipsește. Se sesizează un miros tipic de mucegai. Reversul este galben pal, partea centrală – de culoare galbenă intensă.

- 45 La cultivarea pe mediul Reistrich coloniile sunt mărunte (0,5...1,0 cm), inițial albe, pufoase, mai târziu cafenii-negre, cu aspect paslos. Veziculele sunt sferice, cafenii-negre.

Particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii *Aspergillus niger*: crește pe surse de azot organice, amoniacale și pe bază de azotați.

- 50 Chemoorganotrof. Crește în limitele de temperaturi 5...42°C. Temperatura optimă de creștere a miceliului este de 28...30°C. Creșterea la temperaturi mai înalte (+42°C) este mai slabă, urmată de pierderea esențială a activității celulozolitice și xilanazice. Valoarea pH-ului optim pentru biosinteza celulazelor și xilanazelor este cuprinsă între 5,0...6,5.

- 55 Tulpina *Aspergillus niger* se caracterizează prin nivel înalt al activității celulozolitice și xilanazice, precum și prezența enzimelor satelit – amilazelor, proteazelor. Maximumul activității enzimatic se semnalează în a 8-a zi de cultivare submersă și constituie: celobiohidrolaze – 12...15 u/g; endoglucanaze – 450...480 u/g; β -glucozidaze – 240...270 u/g; xilanaze – 2800...3200 u/g.

MD 4072 C1 2010.10.31

4

La cultivarea submersă pe mediul mineral Getchinson ce conține ca inductori ai biosintezei celulazelor diferite ingrediente naturale celulozocomponente (borhot de sfeclă, tărâțe de grâu, tescovină de mere) tulpina crește intens și produce activ enzime celulozolitice, xilanaze. Maximumul activității enzimatică este semnalat la a 8-a zi de cultivare a producătorului.

- 5 Cultura se păstrează pe coloane oblice de malț-agar sau Czapek la temperatura de 4...5°C. Termenul de reînsămânțare: la fiecare 2 luni.

Reproducerea tulpinii se realizează pe mediul de păstrare sau alte medii utilizate în aceste scopuri. Pasajele se efectuează prin porțiuni de miceliu cu conidii. Cultivarea se realizează în termostate la temperatura de 30°C timp de 10...14 zile.

- 10 Tulpina este cultivată submers în baloane Erlenmayer, pe agitatoare cu 180...200 rot.min⁻¹, timp de 7...9 zile, la temperatura de 28...30°C, pe mediul nutritiv cu următoarea compoziție (g/l): KH₂PO₄ – 1,0; NaNO₃ – 2,5; MgSO₄ · 7H₂O – 0,3; KCl – 0,1; CaCl₂ · 2H₂O – 0,1; FeCl₃ – 0,01; tărâțe de grâu – 20,0; borhot de sfeclă – 20,0; pH – 5,5...6,0.

Exemple de realizare a invenției

- 15 *Exemplul 1*

Tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 10 a fost cultivată în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 l, în care erau 0,2 l mediu nutritiv cu următoarea compoziție (g/l): KH₂PO₄ – 1,0; NaNO₃ – 2,5; MgSO₄ · 7H₂O – 0,3; KCl – 0,1; CaCl₂ · 2H₂O – 0,1; FeCl₃ – 0,01; tărâțe de grau – 20,0; borhot de sfeclă – 20,0; pH – 6,0. Cultivarea s-a efectuat timp de 192 ore, la

- 20 temperatura de 28°C, în condiții de agitare continuă (200 rot. min⁻¹).

Lichidul cultural a fost separat de biomasă prin filtrare. Preparatul enzimatic a fost obținut prin sedimentare cu alcool etilic rectificat în raport de 1:4 (lichid cultural: alcool). Activitatea celobiohidrolazică, endoglucanazică, β-glucozidazică și xilanazică s-a determinat după cantitatea de zahăruri reducătoare conform metodei Somogy-Helson după acțiunea asupra

- 25 substratelor specifice (hartie de filtru, Na-carboximetilceluloză, n-nitrofenil β-D-glucopiranozid și xilan) și a constituit 12,8, 455,5, 251,8 și 2980,2 u/g, corespunzător.

Exemplul 2

Tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 10 a fost cultivată în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 l, în care erau 0,2 l mediu nutritiv cu următoarea compoziție (g/l): KH₂PO₄ – 1,0; NaNO₃ – 2,5; MgSO₄ · 7H₂O – 0,3; KCl – 0,1; CaCl₂ · 2H₂O – 0,1; FeCl₃ – 0,01; tărâțe de grau – 20,0; borhot de sfeclă – 20,0; pH – 6,0. Cultivarea s-a efectuat timp de 192 ore, la

- 30 temperatura de 28°C, în condiții de agitare continuă (200 rot.min⁻¹).

Preparatul enzimatic a fost obținut analogic metodei descrise în exemplul 1. Activitatea componentelor complexului enzimatic a constituit: celobiohidrolaze – 14,5 u/g, endoglucanaze

- 35 - 478,7 u/g, β-glucozidaze – 266,4 u/g și xilanaze – 3180,3 u/g.

40

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 356 G2 1995.12.31

(57) Revendicări:

Tulpină de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 10 - producătoare de enzime cu activitate celulozolică și xilanazică.

Șef Secție: COLESNIC Inesa

Examinator: BANTAȘ Valentina

Redactor: LOZOVANU Maria

AGENTIA DE STAT PENTRU PROPRIETATEA INTELECTUALA A REPUBLICII MOLDOVA

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii	
(21) Nr. depozit: a 2010 0041 (22) Data depozit: 2010.03.12 (54) Titlul: Tulpină de fungi <i>Aspergillus niger</i> - producătoare de enzime cu activitate celulozolică și xilanazică. (71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (51) (Int.Cl.): Int. Cl.: C12N 1/14 (2006.01) C12N 9/42 (2006.01)	
II. Condiții de unitate a invenției:	X satisface ☐ nu satisface
Note:	
III.Revendicări: claritatea, susținerea de descriere	
Note:	X satisface ☐ nu satisface
IV. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare)	
MD (Documentare Invenții (inclusiv cereri nepublicate)) – 1993-2010 tulpină, <i>Aspergillus niger</i> , activitatea celulozolică, xilanazică "Worldwide" (Espacenet) –strain <i>Aspergillus niger</i> , cellulolytic and xilanazic activity EA, CIS (Eapatis) – tulpină, <i>Aspergillus niger</i> , activitatea celulozolică, xilanazică SU (nonpublic) – colecția BRTȘ, штамм <i>Aspergillus niger</i> , целлюлолитическая и ксиланазная активность	
V. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate	
1. http://www.viniti.ru	

VI. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 356 G2 1995.12.31	1
A	Biotehnologie, Coordonteur Rene Scriban, TEC&DOC, Paris, 1999, p. 67	1
A	PT 199660101843 A 1996.03.06	1
A	CN 20041039214 A 2004.02.05	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 evidența 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 2010.08.20		
Examinator BAZARENCO Tatiana		