MD 3945 C2 2009.07.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 3945 (13) C2

(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/685 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12N 9/30 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2009 0041 (22) Data depozit: 2009.04.07	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.07.31, BOPI nr. 7/2009

(71) **Solicitant:** INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(72) **Inventatori:** CILOCI Alexandra, MD; STRATAN Maria, MD; CLAPCO Steliana, MD; TIURIN Janeta, MD; LABLIUC Svetlana, MD; GHIȚU Dumitru, MD

(73) **Titular:** INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(54) **Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02**

(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la biotehnologie, în special la cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 şi poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor amilolitice.

Procedeul, conform invenției, include creşterea culturii de fungi pe malț-agar timp de 14 zile, pregătirea suspensiei de spori prin spălarea culturii de fungi cu apă distilată, tratarea suspensiei de spori cu unde de intensitate joasă cu lungimea λ=7,1 mm, emise in regim continuu, timp de 15 min, introducerea suspensiei de spori in cantitate de 10%

2

vol. intr-un mediu nutritiv steril care conține, g/L: făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; $MgSO_4$ - 0,5; KH_2PO_4 - 2,0; KCl - 0,5; apă potabilă până la 1 L cu pH-ul mediului 3,0, cultivarea submersă în baloane Erlenmayer în condiții de agitare la temperatura de 28…30 C, timp de 144 ore.

Rezultatul constă în majorarea conținutului de enzime amilolitice şi în micşorarea duratei de cultivare.

Revendicări: 1

MD 3945 C2 2009.07.31

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 şi poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor amilolitice.

Majoritatea tehnologiilor existente de obținere a preparatelor enzimatice amilolitice utilizează ca producători tulpini de bacterii şi fungi miceliali în cultură submersă.

Pentru cultivarea tulpinilor fungice producătoare de enzime amilolitice se utilizează medii, care conțin ca parte minerală diferite modificări ale mediului Czapek şi inductori ai sintezei amilazelor: amidon sau ingrediente naturale cu conținut înalt de amidon - făină de porumb, făină de fasole, tărâțe de grau etc. [1].

În calitate de cea mai apropiată soluție s-a utilizat procedeul de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 ce include etapele: pregătirea materialului semincer prin spălarea cu apă distilată a culturii de 14 zile de pe coloane oblice de malț-agar Czapek, însămânțarea mediului nutritiv steril cu următoarea componență, g/L: amidon - 3,0; făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; KH_2PO_4 - 2,0, KCl - 0,5, $MgSO_4$ - 0,5, apă potabilă până la 1,0 L; pH inițial al mediului 3,0; cultivarea submersă a tulpinii în condiții de agitare continuă (80…200 rot./min) în baloane Erlenmayer cu capacitate de 1,0 L, cu 0,2 L mediu nutritiv, la temperatura 28…30°C, durata cultivării 144 ore. Tulpina a fost obținută în urma iradierii cu raze γ cu frecvența de 1500 Hz a suspensiei de spori ai tulpinii *Aspergillius niger* 33 [2].

La cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 în condiții proxime lichidul cultural manifestă activitate amilolitică de 413…425 u/mL la hidroliza amidonului solubil în condiții standard (pH 4,7).

Dezavantajul procedeului cunoscut constă în faptul că în condiții proxime tulpina, fiind o variantă mutantă, după 6 ani de păstrare manifestă tendințe de scădere a activității enzimatice.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02, care să asigure sporirea şi menținerea la nivelul original a capacității biosintetice a producătorului.

Esența invenției constă în aceea că procedeul, conform invenției, include creşterea culturii de fungi pe malț-agar timp de 14 zile, pregătirea suspensiei de spori prin spălarea culturii de fungi cu apă distilată, tratarea suspensiei de spori cu unde de intensitate joasă cu lungimea λ=7,1 mm, emise in regim continuu, timp de 15 min, introducerea suspensiei de spori in cantitate de 10% vol. intr-un mediu nutritiv steril care conține, g/L: făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; $MgSO_4$ - 0,5; KH_2PO_4 - 2,0; KCl - 0,5; apă potabilă până la 1 L cu pH-ul mediului 3,0. Cultivarea submersă în baloane Erlenmayer în condiții de agitare la temperatura de 28…30 C, timp de 144 ore.

Rezultatul constă în majorarea conținutului de enzime amilolitice şi în micşorarea duratei de cultivare.

Ca sursă de unde milimetrice serveşte generatorul „UEM-3".

Efectul biostimulator al undelor milimetrice de intensitate joasă este determinat de activarea sistemelor enzimatice ale celulelor microbiene, urmată de creşterea vitezei de transport a substanțelor nutritive şi intensificarea proceselor de formare a produselor metabolice (Пичко В.Б., Поваляева И.В. Электромагнитная стимуляция продуцирующей способности микроорганизмов и ее механизмы. Прикладная биохимия и микробиология. 1996, т. 32, № 4, с. 468-472).

Exemplu de realizare a invenției

Suspensia de spori se pregăteşte prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii de *Aspergillus niger* crescută timp de 14 zile pe suprafețe oblice de malț-agar. Suspensia de spori astfel pregătită este supusă acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă cu lungimea de undă λ=7,1 mm emise in regim continuu timp de 15 min şi în cantitate de 10% vol. într-un mediu nutritiv steril care conține, g/L: făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; $MgSO_4$ - 0,5; KH_2PO_4 - 2,0; KCl - 0,5; apă potabilă până la 1 L cu pH-ul mediului 3,0. Cultivarea submersă în baloane Erlenmayer în condiții de agitare 180…200 rot./min la temperatura de 28…30 C, timp de 144 ore.

Activitatea amilolitică în lichidul cultural determinată prin metoda fotocolorimetrică cu iod în dinamică pe parcursul a 4 zile, începând cu ziua a 4-a de cultivare a micromicetei a constituit respectiv 430,61 u/mL, 420,64 u/mL şi 360,18 u/mL în a 4-a, a 5-a şi a 6-a zi de cultivare față de 320,56 u/mL în varianta conform celei mai apropiate soluții în ziua a 6-a de cultivare (termenul manifestării maximei de biosinteză), ceea ce depăşeşte cu 34,33, 31,22 şi 12,36% activitatea fixată la cultivarea tulpinii în condiții proxime (tabelul).

Tabel

Modificarea activității amilolitice a tulpinii *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 în funcție de acțiunea undelor milimetrice de intensitate joasă cu lungimea λ=7,1 mm

Regimul	Durata de iradiere, min	Activitatea amilolitică					
		a 4-a zi		a 5-a zi		a 6-a zi	
		u/mL	%*	u/mL	%*	u/mL	%*
Cu impulsuri cu frecvența 8 Hz	10	177,08	55,24	241,06	75,20	241,15	75,23
	15	251,19	78,36	181,18	56,52	386,59	120,6
	20	265,87	82,94	320,56	100	333,76	104,12
Cu impulsuri cu frecvența 16 Hz	10	371,85	116,0	378,26	118,0	465,86	145,33
	15	258,53	80,65	200,35	62,50	267,67	83,51
	20	123,03	38,38	101,30	31,60	238,56	74,42
Frecvent	10	280,52	87,51	121,33	37,85	320,56	100
	15	148,51	46,33	261,00	81,42	214,87	67,03
	20	267,82	83,55	80,81	25,21	294,11	91,75
Continuu	10	133,93	41,78	178,14	55,57	280,52	87,51
	15	430,61	134,33	420,64	131,22	360,18	112,36
	20	212,50	66,29	350,78	109,43	478,92	149,4
Martor	0	167,75	-	220,59	-	320,56	100

* față de martor în ziua manifestării maximei de biosinteză.

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 care include creșterea culturii de fungi pe malț-agar timp de 14 zile, pregătirea suspensiei de spori prin spălarea culturii de fungi cu apă distilată, tratarea suspensiei de spori cu unde de intensitate joasă cu lungimea λ=7,1 mm, emise in regim continuu, timp de 15 min, introducerea suspensiei de spori in cantitate de 10 % vol. intr-un mediu nutritiv steril care conține, g/L: făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; $MgSO_4$ - 0,5; KH_2PO_4 - 2,0; KCl - 0,5; apă potabilă până la 1 L cu pH-ul mediului 3,0, cultivarea submersă în baloane Erlenmayer în condiții de agitare la temperatura de 28…30°C, timp de 144 ore.

(56) Referințe bibliografice:

1. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. Москва, Агропромиздат, 1987, с. 169-171
2. MD 2363 F1 2004.01.31

Şef Secție: COLESNIC Inesa

Examinator: GORDIENCO Maria

Redactor: CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2009 0041	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2009.04.07	(86) Cerere internațională PCT:

Prioritatea invocată :

(31) nr.: (32) data : (33) țara :

(51) : **Int. Cl.:** ***C12N 1/14*** (2006.01)
C12R 1/685 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12N 9/30 (2006.01)

Alți indici de clasificare:

(54) **Titlul** : **Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMF FD 02A**

(71) Solicitantul : **INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINȚE A MOLDOVEI, MD**

Termeni caracteristici :

a) limba română: cultivarea submersă; producătoare de enzime amilolitice; fungi; traterea cu unde

b) limba engleză: deep cultivation; produser of amilolytic enzymes; fungus; treatment with wale

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

Int. Cl.
(MD, EA, SU, inclusiv şi colecția „nepublică”)
MD Perioada: 1993-2008.08.07
EA Perioada: 1996-2008.08.07
SU Perioada: 1972-1993
ESP@CENET - WORLDWIDE (WO, EP, CH, DE, GB, FR, US, JP...)

II. Literatura tehnico-ştiințifică consultată adăugător la minim de documentație (autori, titluri, editura, țara şi data publicării)

1. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. Москва, Агропромиздат, 1987, с. 169-171

2. Калунянц К.А, Голгер Л.И. Микробные ферментные препараты. Москва, Пищевая промышленность, 1979, с.8-13

III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD şi termen de documentare)

Int. Cl. C12N 1/14; C12N9/14 C12N 13/00;
(MD, EA, SU, inclusiv şi colecția „nepublică”)
MD Perioada: 1993-2008.08.07
EA Perioada: 1996-2008.08.07
SU Perioada: 1972-1993
ESP@CENET - WORLDWIDE (WO, EP, CH, DE, GB, FR, US, JP...)

IV. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 3605 F1 2008.05.31	1
A	MD 2709 F1 2005.02.28	1
A	SU 506618 A1 1976.03.15	1
A	SU 933704 A1 1982.06.07	1
A	SU 1158579 A 1985.05.30	1
A	SU 937517 A1 1982.06.23	1
A	SU427993 A 1974.05.15	1
A	SU 1244179 A1 1986.07.15	1

☐ **Documentele următoare sunt indicate în rubrica IV**	☐ **Informația referitoare la brevete paralele se anexează**
*** categoriile speciale ale documentelor consultate:**	**P** - document publicat inainte de data depozit, dar după data priorității invocate
A - document care defineşte 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
E - document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta data	**X** - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fu considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat de unul singur
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate sau 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 fu considerată ca implicând activitate inventivă când 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 divulgare	**&** - document care face parte din aceiaşi familie de documente
Data finalizării documentării 2009.05.07	
Examinatorul GORDIENCO Maria	