



MD 4285 C1 2014.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4285** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)
C12N 9/58 (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2013 0012 (22) Data depozit: 2013.02.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2014.05.31, BOPI nr. 5/2014
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: DESEATNIC-CILOCI Alexandra, MD; TIURINA Janetta, MD; BIVOL Cezara, MD; CLAPCO Steliana, MD; LABLIUC Svetlana, MD; DVORNINA Elena, MD; STRATAN Maria, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Tulpină de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans - producătoare de proteaze acide, neutre și alcaline

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de fungi miceliali *Trichoderma koningii* Oudemans și poate fi utilizată pentru obținerea preparatelor enzimactice proteolitice.

Tulpina de fungi este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a

2
Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM cu numărul CNMN-FD-15 și poate fi utilizată în calitate de sursă de proteaze acide, neutre și alcaline.

Revendicări: 1

MD 4285 C1 2014.12.31

(54) Strain of *Trichoderma koningii* Oudemans fungi - producer of acid, neutral and alkaline proteases

(57) Abstract:

1

The invention relates to biotechnology, in particular to a strain of filamentous fungi *Trichoderma koningii* Oudemans and can be used for producing proteolytic enzymatic agents.

Fungus strain is deposited at the National Collection of Nonpathogenic Microorganisms

2

of the Institute of Microbiology and Biotechnology of the ASM under the number CNMN-FD-15 and may be used as a source of acid, neutral and alkaline proteases.

Claims: 1

(54) Штамм грибов *Trichoderma koningii* Oudemans - продуцент кислых, нейтральных и щелочных протеаз

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к штамму мицелиальных грибов *Trichoderma koningii* Oudemans и может быть использовано для получения протеолитических ферментных препаратов.

Штамм гриба депонирован в Национальной Коллекции Непатогенных

2

Микроорганизмов Института Микробиологии и Биотехнологии АНМ под номером CNMN-FD-15 и может быть использован в качестве источника кислых, нейтральных и щелочных протеаз.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de fungi miceliali *Trichoderma koningii* Oudemans și poate fi utilizată pentru obținerea preparatelor enzimatic proteolitice.

Sunt cunoscute un șir de tulpini de fungi microscopici din genurile *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* – producătoare active a unui spectru larg de hidrolaze exocelulare, inclusiv proteaze [1].

Dezavantajele acestor producători prezintă capacitatea joasă de sinteză a proteazelor, lipsa capacității de sinteză concomitentă în cantități suficiente a altor hidrolaze nespecifice complexului de profil.

Soluția cea mai apropiată de obiectul revendicat prezintă tulpina de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12, care în cultură submersă sintetizează un complex enzimatic specific cu acțiune proteolitică, compus din două tipuri de proteaze: acide – în cantități de 25,2...26,7 u/ml și neutre – 30,2...32,9 u/ml, și enzime satelit – xilanaze și β -glucozidaze [2].

Dezavantajul acestei tulpini îl constituie complexul proteolitic incomplet – lipsa proteazelor alcaline și nivelul redus de proteaze neutre, care reprezintă unul din principalele componente ale complexului proteolitic necesare pentru o proteoliză profundă a proteinelor, lipsa capacității de sinteză a amilazelor.

Problema rezolvată de invenție constă în evidențierea unei noi tulpini de fungi miceliali care la cultivarea submersă pe un mediu nutritiv pe bază de ingrediente vegetale să sintetizeze complexul integru de enzime proteolitice: proteaze acide, neutre și alcaline.

Esența invenției o constituie tulpina de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans, care este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM cu numărul CNMN-FD-15 și poate fi utilizată în calitate de sursă de proteaze acide, neutre și alcaline.

Rezultatul tehnic constă în obținerea complexului enzimatic hidrolitic cu activitate proteolitică înaltă, constituit din proteaze acide, neutre și alcaline, capabil să activeze într-un diapazon larg al pH-ului (3,6...9,03), care de asemenea posedă cantități considerabile de α -amilaze, ce asigură hidroliza efectivă a proteinelor și a polizaharidelor amidonoase din țesuturile vegetale și animale, cu aplicare largă în diferite procese tehnologice și în medicină. Activitatea proteazelor acide, care înfăptuiesc proteoliza substratului la valoarea pH-ului 3,6, este situată în limitele 26,4...27,5 u/ml, activitatea proteazelor neutre, care realizează hidroliza substratului la pH-ul 7,4, este cuprinsă în limitele 63,5...66,9 u/ml iar activitatea proteazelor alcaline, ce realizează hidroliza substratului la pH-ul 9,03, se situează în intervalul 59,9...61,9 u/ml. Concomitent, tulpina sintetizează în calitate de enzime nespecifice (însoțitoare, satelit) în cantități suficiente α -amilaze acidlabile (standard) cu activitatea de 19,9...22,3 u/ml, ce realizează hidroliza substratului în condiții standard de aciditate la pH-ul 4,7 și acidstabile cu activitatea de 36,2...43,4 u/ml în condiții de hidroliză acidă la pH-ul 2,5, fapt ce contribuie la extinderea domeniilor de aplicare.

1. Caracterile morfologo-culturale ale tulpinii: micromicetele *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15 cresc bine pe diverse medii agarizate.

Pe mediul malt-agar micromicetele formează colonii de culoare albă, care cu timpul capătă o nuanță verde. Coloniile sunt intens sporulate. Miceliul este aderent la substrat, septat, cu zone de mănunchiuri de conidiofori ramificați, amplasați opus, prevăzuți cu fialide situate solitar sau în grupuri de 2...3. Fialidele au formă de „garafă” – adică bombate în partea de jos și subțiri, adesea curbate, în partea terminală pe care sunt situate conidiile. Conidiile sunt unicelulare, subglobuloase sau elipsoidale, cu pereții netezi.

Pe mediul Czapek micromicetele formează colonii pufoase, inițial albe, ulterior de culoare albicioasă-verde, albastră-verzuie; reversul coloniei necolorat. Conidiosporii se formează pe fialide și cresc pe ramuri laterale în mănunchi.

2. Particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii: tulpina *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15 crește pe surse de azot organice, amoniacale și pe bază de azotați.

Chemoorganotrof. Crește în limitele de temperaturi +5...+40°C. Temperatura optimă de creștere a miceliului este de +28...+30°C. Creșterea la temperaturi mai înalte (+40°C) este urmată de pierderea esențială a activității enzimatică. Valoarea pH-ului optim pentru biosinteza proteazelor este cuprinsă între 8,0...9,3.

5 3. Produsul sintetizat de tulpină: tulpina *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15 posedă capacitatea de a sintetiza enzime hidrolitice extracelulare: proteaze (acide, neutre, alcaline) și amilaze, în calitate de enzime satelit.

4. Parametrii productivi ai tulpinii: tulpina *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15 se distinge printr-un nivel înalt al activității proteazelor exocelulare
10 acide (pH – 3,6), neutre (pH – 7,4) și alcaline (pH 9,03), cu activitatea enzimatică respectivă: proteaze acide – 1,48...154 u/ml; proteaze neutre – 3,56...3,75 u/ml, proteaze alcaline – 3,36...3,47 u/ml.

5. Metoda de determinare a activității tulpinii: activitatea proteolitică s-a determinat în conformitate cu metoda propusă de Willstatter, după gradul de hidroliză a gelatinei
15 până la aminoacizi și polipeptide, cu dozarea ulterioară a grupelor carboxilice libere formate ca rezultat al hidrolizei (Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. Москва. Легкая и пищевая промышленность, 1982, p. 41-43).

6. Condițiile și componența mediului pentru cultivare: tulpina se cultivă submers în
20 baloane Erlenmayer, pe agitatoare cu 180...200 rot/min, timp de 7...11 zile, la temperatura de 28...30°C, pe mediul nutritiv cu următoarea compoziție, (%): tărâțe de grau – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO₃ – 0,2; (NH₄)₂SO₄ – 0,1; pH-ul inițial al mediului 6,25.

7. Condițiile și componența mediilor pentru păstrarea îndelungată și reproducerea
25 tulpinii: cultura se păstrează pe coloane oblice de malț-agar sau Czapek la temperatura de 4...5°C. Termenul de reînsămânțare: la fiecare 2 luni. Cultivarea se realizează în termostate la temperatura de +30°C timp de 10...14 zile. Reproducerea tulpinii se realizează pe mediul de păstrare sau alte medii, utilizate în acest scop.

Exemple de utilizare a tulpinii

30 Exemplul 1

Tulpina *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15 s-a cultivat pe mediul nutritiv cu următoarea compoziție, (%): tărâțe de grâu – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO₃ – 0,2; (NH₄)₂SO₄ – 0,1; pH-ul inițial al mediului 6,25, prealabil sterilizat la presiunea de 1 atm timp de 1 oră. După răcire până la 25...30°C (sau temperatura camerei) mediul
35 nutritiv se însămânțează cu suspensie de spori și miceliu în cantitate de 5% v/v a culturii, crescute pe suprafețe înclinate de malț-agar timp de 12...14 zile și obținute prin spălare de pe coloana oblică cu 10 ml apă sterilă. Cultivarea se realizează în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 l, care conțin 0,2 l de mediu, în condiții de agitare continuă (180...200 rot/min), la temperatura de 28°C, timp de 216 ore (9 zile).

40 Activitatea proteolitică, determinată în conformitate cu metoda Anson după acțiunea asupra cazeinatului de sodiu, pentru proteazele acide (valoarea pH-ului 3,6) a constituit 26,9 u/ml; pentru proteazele neutre (valoarea pH-ului 7,4) – 65,3 u/ml; pentru proteazele alcaline (valoarea pH-ului 9,0) – 60,7 u/ml (Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. Москва. Легкая и пищевая промышленность,
45 1982, p. 36- 41).

Activitatea amilazelor (α -amilaze), determinată după gradul de hidroliză a soluției de 1% de amidon, a constituit: 20,3 u/ml (pH-ul 4,7) și 41,8 u/ml (pH-ul 2,5) (Рухлядева А.П., Польшалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1981,
50 288 p.)

Exemplul 2

Tulpina *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 l, care conțineau 0,1 l de mediu, la temperatura de 30°C, timp de 192 ore (8 zile), în rest condițiile sunt echivalente exemplului 1.

55 Activitatea componentelor complexului enzimatic a constituit: proteaze acide – 27,2 u/ml, proteaze neutre – 64,2 u/ml, proteaze alcaline – 61,5 u/ml, amilaze – 22,1 u/ml (pH-ul 4,7) și 42,9 u/ml (pH-ul 2,5).

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Biotechnologie. Coordinateur Rene Scriban, TEC&DOC, Paris, 1999, p. 67
2. MD 4186 B1 2012.11.30

(57) Revendicări:

Tulpină de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15 – producătoare de proteaze acide, neutre și alcaline.

Șef secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2013 0012

(22) Data depozit: 2013.02.28

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

(54) **Titlul: Tulpină de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans - producătoare de proteaze acide, neutre și alcaline**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C12N 1/14* (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

C12N 9/58 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): “trichoderma proteaze”, “fungi proteaze”

Int. Cl: C12 N1/14, C12 R1/885, C12 N9/58, C12 N9/50

"Worldwide" (Espacenet): “trichoderma protease”, “fungal protease”, “acid fungal protease”, “neutral fungal protease”, “alkaline fungal protease”

Int. Cl: C12 N1/14, C12 R1/885, C12 N9/58, C12 N9/50

EA, CIS (Eapatis): “trichoderma протеазы”, “грибные протеазы”, “кислые грибные протеазы”, “нейтральные грибные протеазы”, “щелочные грибные протеазы”

Int. Cl: C12 N1/14, C12 R1/885, C12 N9/58, C12 N9/50

SU (nonpublic): “trichoderma протеазы”, “грибные протеазы”, “кислые грибные протеазы”, “нейтральные грибные протеазы”, “щелочные грибные протеазы”

Int. Cl: C12 N1/14, C12 R1/885, C12 N9/58, C12 N9/50

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

<http://edu.znate.ru/docs/3997/index-94472-1.html?page=8>

<http://publicatio.bibl.u-szeged.hu/3739/1/kredics-paris.pdf>

<http://publicatio.bibl.u-szeged.hu/512/2/amihprot.pdf>

http://www.academicjournals.org/article/article1381136163_Kamala%20and%20Devi.pdf

Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Сербя Е.М., Трифонова В.В. Сравнительная характеристика микробных протеаз по степени гидролиза белковых субстратов // Прикл. биохимия и микробиология. 1997. - Г.33, №1. - С. 43-45.

Cohen B. L. Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol., 1973, 79, №2., p. 311

Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. Казанский государственный университет, 2006, 193 с.

Manonmani H.K., Joseph R. Purification and properties of an extracellular proteinase of *Trichoderma koningii*. Enzyme Microb. Technol., 1993, 15, p. 624–628.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1998, 62, p. 597–635.

Rodriguez-Kabana R., Kelley W.D., Curl E.A. Proteolytic activity of *Trichoderma viride* in mixed cultures with *Sclerotium rolfii* in soil. Can. J. Microbiol., 1978, 24, p. 487–490.

Elad Y., Kapat A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant. Pathol., 1999, 105, p. 177–189.

Sivan A., Chet I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. J. Gen. Microbiol., 1989, 135, p. 675–682.

Delgado-Jarana J., Pintor-Toro J.A., Benitez T. Overproduction of β -1,6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. Biochim. Biophys. Acta, 2000, 1481, p. 289–296.

Kredics L., Antal Z., Szekeres A., Manczinger L., Kevei F., Nagy E. Production of extracellular proteases by human pathogenic *Trichoderma longibrachiatum* strains. Acta Microbiol. Immunol. Hung, 52, 2004, p. 223–229.

Dunaevsky Y.E., Gruban T.N., Beliakova G.A., Belozersky M.A. Enzymes secreted by filamentous fungi: Regulation of secretion and purification of an extracellular protease of *Trichoderma harzianum*. Biochemistry (Moscow), 2000, 65, p. 723–727.

Manonmani H.K., Joseph R. Purification and properties of an extracellular proteinase of *Trichoderma koningii*. Enzyme Microb. Technol., 1993, 15, p. 624–628.

Haab D., Hagspiel K., Szakmary K., Kubicek C.P. Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM 9414 involved in cellulase degradation. J. Biotechnol., 1990, 16, p. 187–198.

Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Savelev A.N., Saveleva N.V., Shabalin K.A., Neustroev K.N. Acid protease from *Trichoderma reesei*: limited proteolysis of fungal carbohydrases. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52, p. 226–231.

V. 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	MD 2363 G2 2004.01.31	1
A	MD 4072 C1 2010.10.31	1
A	CN 101942396 A 2010.09.06	1
A	KR 20090122069 A 2009.11.26	1
A	RU 2323973 C1 2008.05.10	1
A	EP 1022329 A1 2000.07.26	1
A	US 2009155239 A1 2009.06.18	1
A	MX 2011011528 A 2012.05.29	1

A	WO 9746689 A1 1997.12.11	1
A	WO 0061767 A1 2000.10.19	1
A	US 4518697 A 1985.05.21	1
A	ES 8604312 A1 1986.06.01	1
A	RU 2315097 C1 2008.01.20	1
A	CN 1986770 A 2007.06.27	1
A	KR 20030075730 A 2003.09.26	1
A	CN 101948763 A 2011.01.19	1
A	BG 110055 A 2009.08.31	1
A	RU 2315098 C1 2008.01.20	1
A	RU 93050097 A 1996.02.20	1
A, D	Biotechnologie. Coordinateur Rene Scriban, TEC&DOC, Paris, 1999, p. 67	1
A, D, C	MD 4186 C1 2012.11.30	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 evidență 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 03.03.2014

Examinator LUPAȘCU Lucian