



MD 2362 B2 2004.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2362** ⁽¹³⁾ **B2**
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/14, 9/20 //
(C 12 N 1/14;
C 12 R 1:685)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2001 0302 (22) Data depozit: 2001.09.13 (41) Data publicării cererii: 2003.04.30, BOPI nr. 4/2003	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2004.01.31, BOPI nr. 1/2004
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: DESEATNIC-CILOCI Alexandra, MD; ȘIRBU Tamara, MD; TIURIN Jana, MD; LABLIUC Svetlana, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Tulpină de fungi *Aspergillus niger* - producătoare de enzime lipolitice

(57) Rezumat:

1

2

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la tulpina fungilor *Aspergillus niger*, care poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor lipolitice.

Tulpina de fungi *Aspergillus niger* este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme (Institutul de Microbiologie al A.Ș.R.M.) cu

5

numărul CNM-FD 01 și este producătoare de enzime lipolitice.

Rezultatul invenției constă în sporirea activității enzimelor lipolitice.

Revendicări: 1

10

MD 2362 B2 2004.01.31

MD 2362 B2 2004.01.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la tulpina fungilor *Aspergillus niger*, care poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor lipolitice.

5 Este cunoscută tulpina de fungi *Mucor miehei* – producătoare de enzime lipolitice [1]. Dezavantajul acestei tulpini este activitatea lipolitică joasă – 4500...5000 U/mL.

Mai este cunoscută tulpina de fungi *Penicillium solitum* WEST IM – producătoare de enzime lipolitice [2]. Dezavantajele tulpinii cunoscute constau în activitatea lipolitică joasă – 10500...12000 U/mL, durata relativ mare de cultivare (5 zile). Tulpina prezintă un mutant obținut prin iradiere cu raze UV. Este cunoscut faptul că mutanții se caracterizează prin instabilitate în timp a caracterelor.

10 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unei tulpini noi de fungi cu nivel înalt de activitate lipolitică și o perioadă mai scurtă de cultivare.

Se propune o tulpină nouă de fungi *Aspergillus niger*, depusă în Colecția Națională de Microorganisme a Republicii Moldova sub numărul CNM-FD 01, fiind o sursă de enzime lipolitice.

15 Rezultatul invenției constă în sporirea activității lipolitice a tulpinii – 20500...23250 U/mL și micșorarea duratei de cultivare până la 4 zile.

Invenția mai prezintă și următorul avantaj: posibilitatea cultivării tulpinii propuse pe medii nutritive simple și ieftine (numărul de componente ale mediului este redus, ingredientele accesibile).

Rezultatul obținut este condiționat de particularitățile fiziologo-biochimice ale proceselor anabolice și catabolice care decurg în acest organism și metabolismul adaptativ al tulpinii.

20 Pentru creșterea, dezvoltarea și biosinteza enzimelor lipolitice a tulpinii poate fi utilizat mediul cu compoziția (g/L): făină de soia – 35,0; K_2HPO_4 – 5,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; apă potabilă – restul, până la 1 litru; pH-ul inițial 7,2. Activitatea lipolitică a tulpinii la cultivarea pe acest mediu constituie 20500...23250 U/mL.

Caracteristica morfologico-culturală a tulpinii *Aspergillus niger*.

25 Pe mediul agarizat Czapek se formează colonii limitate de 2,5...3,0 cm. Miceliul de substrat compact, alb, scufundat sau răspândit pe suprafața substratului în strat spongios; măciuliile conidiale abundente, conglomerate, de culoare neagră, uneori cu nuanțe cafenii, concentrate în centrul coloniei, la început sferice, apoi radial, la maturizare se divizează în câteva colonii spongioase, dar bine conturate cu dimensiunile 700...800 μm ; conidioforii variază între 1,5...3,0 mm înălțime, 15...20 μm lățime, cu învelișuri groase netede, incolore sau cafenii în partea superioară; sterigmele cafenii bietajate; conidiile sferice, cu 4...5 μm în diametru, cu înveliș bine evidențiat, rugos; rezervum incolor; exudatul lipsește; mirosul tipic de mușgai.

30 Pe mediu de malț agarizat coloniile se dezvoltă mai repede și au dimensiuni mai mari, atingând 5...6 cm în diametru, sunt netede sau pufoase, sporulează abundent.

35 Proprietățile fiziologo-biochimice. Tulpina crește și se dezvoltă bine pe mediul cu compoziția (g/L): făină de soia – 35,0; K_2HPO_4 – 5,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; restul apă potabilă până la 1 litru; pH-ul inițial 7,2.

Tulpina se caracterizează prin activitate lipolitică înaltă. Activitatea lipolitică maximă se înregistrează în ziua a 4-a de cultivare.

40 Hemoorganotrof. Crește în limitele de temperaturi +5...+42°C. Temperatura optimă de creștere și activitate lipolitică constituie +28...+30°C. Creșterea la temperaturi mai înalte (+42°C) este urmată de pierderea esențială a activității lipolitice. Limitele valorilor pH-ului pentru dezvoltarea tulpinii sunt 7,0...8,0; pH-ul optimal pentru biosinteza enzimelor lipolitice este de 7,2.

45 Tulpina *Aspergillus niger* acumulează biomasă până la 20 g/L de mediu cu indicii de compoziție (%): proteină brută – 16,02; grăsimi brute – 8,36; substanțe minerale (cenușă) – 11,89. Posedă capacitatea de a sintetiza enzime hidrolitice extracelulare: lipolitice, amilolitice, proteolitice.

Exemplul 1

50 Într-un balon Erlenmayer de 0,5 litri se pun 100 ml de mediu nutritiv cu următoarea compoziție (g/L): făină de soia – 10,0; făină de porumb – 10,0; ulei de soia – 5,0; KH_2PO_4 – 2,0; apă potabilă – restul, până la 1 litru; pH-ul inițial – 7,2, sterilizat în autoclav la 1 atm timp de 1 oră.

În mediu se inoculează 5 mL de suspensie apoasă de spori ai fungilor *Aspergillus niger* cu concentrația de 10^6 ... 10^7 spori/mL.

Cultivarea are loc în camere termostate la temperatura de +28°C în decurs de 4 zile în condiții de agitare continuă.

55 Activitatea lipolitică a lichidului cultural după 4 zile de cultivare constituie 20500 U/mL.

MD 2362 B2 2004.01.31

4

Exemplul 2

5 Într-un balon Erlenmayer de 1 litru se pun 200 mL de mediu nutritiv, cu următoarea componență (g/L): făină de soia – 25,0; K_2HPO_4 – 5,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0, apă potabilă – restul, până la 1 litru; pH-ul inițial 7,2, sterilizat în autoclav la 1 atm timp de 1 oră.

În mediu se inoculează 5 mL de suspensie apoasă de spori ai fungilor *Aspergillus niger* cu concentrația de $10^6 \dots 10^7$ spori/mL.

10 Cultivarea are loc în camere termostate la temperatura de 30°C în decurs de 4 zile în condiții de agitare continuă. Activitatea lipolitică a lichidului cultural după 4 zile de cultivare constituie 23250 U/mL.

15

(57) Revendicare:

1. Tulpină de fungi *Aspergillus niger* CNM-FD 01 – producătoare de enzime lipolitice.

20

(56) Referințe bibliografice:

1. Гулямова К. А. Липаза гриба и ее свойства. Автореферат дис. канд. биол. наук. Ташкент, 1992, с. 9
2. SU 847680 A1 1987.06.30

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2001 0302	
(22) Data depozit: 2001.09.13	
(51) ⁷ : C 12 N 1/14, 9/20 // (C 12 N 1/14; C 12 R 1: 685) (21) a 2001 0302 (54) Titlul : Tulpină de fung <i>Aspergillus niger</i> - sursă de enzime lipolitice (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : a) limba română: tulpină de fung <i>Aspergillus niger</i> ; enzyme lipolitice - cultivarea b) limba engleză: străin <i>Aspergillus niger</i> – ferments lipolitics source	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.- 7)	
Int. Cl. ⁷ C12 N 1/20 // C 12 N 9/00, 9/20	
II. Literatura tehnico-științifică consultată adăugător la minim de documentație (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
1. Гулямова К.А. Липаза гриба и ее свойства. Автореферат дис. канд. биол. наук Ташкент, 1992, с. 9	
III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD și termen de documentare)	
1. MD 2. EA 3. ФИПС 4. Espacenet	

IV. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	SU 847680 A 1979.05.07	1
A	SU 1460997 A1 1987.06.30	1
A	RU 1549227 1995.12.20	1
A	IN 182245 1992.02.13	1
☐ Documentele următoare sunt indicate în rubrica IV		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozit, dar după data priorității invocate
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
E - document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi 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 fi considerată ca implicând activitate inventivă când 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 divulgare		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2003.11.05
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr. depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4