



MD 2362 C2 2004.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2362 (13) C2
(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

<p>(21) Nr. depozit: a 2001 0302 (22) Data depozit: 2001.09.13 (41) Data publicării cererii: 2003.04.30, BOPI nr. 4/2003</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2004.01.31, BOPI nr. 1/2004</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: DESEATNIC-CILOCI Alexandra, MD; SÎRBU Tamara, MD; TIURIN Jana, MD; LABLIUC Svetlana, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD</p>	

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

(57) Rezumat:

1

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

10

2

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

Rezultatul invenției constă în sporirea activității enzimelor lipolitice.

Revendicări: 1

MD 2362 C2 2004.01.31

MD 2362 C2 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 mutații 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 și micșorarea duratei de cultivare.

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 sferic, apoi radial, la maturizare se divizează în câteva colonii spongioase, dar bine conturate cu dimensiunile 700...800 μ m; conidioforii variază între 1,5...3,0 mm înălțime, 15...20 μ m lățime, cu învelișuri groase netede, incolore sau cafenii în partea superioară; sterigmele cafenii bietajate; conidiile sferice, cu 4...5 μ m în diametru, cu înveliș bine evidențiat, rugos; rezervum incolor; exudatul lipsește; mirosul tipic de mușcegai.

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 optimală 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 componență (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 C2 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