



MD 2363 G2 2004.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2363⁽¹³⁾ G2
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/14, 9/30

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2002 0257 (22) Data depozit: 2002.10.24</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; TIURIN Jana, MD; LABLIUC Svetlana, MD; LĂZĂRESCU Ana, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD</p>	

(54) Tulpină de fungi *Aspergillus niger* 33-19 - producătoare de enzime amilolitice

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la o tulpină de fungi nouă, care poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor amilolitice, în industria alimentară la producerea amidonului, alcoolului, în panificație, în industria farmaceutică pentru obținerea preparatelor medicinale.

2
Se propune o tulpină nouă de fungi *Aspergillus niger* 33-19, depusă în Colecția Națională de Microorganisme a Institutului de Microbiologie al AȘ RM cu nr. CNM FD 02 – producătoare de enzime amilolitice. Tulpina se caracterizează prin nivel înalt de biosinteză a amilazelor.
Revendicări: 1

10

MD 2363 G2 2004.01.31

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la o tulpină de fungi care poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor amilolitice, în industria alimentară la producerea amidonului, alcoolului, în panificație, în industria farmaceutică pentru obținerea preparatelor medicamentoase.

5 Sunt cunoscute un șir de tulpini de fungi – producătoare de enzime amilolitice, printre care în primul rând pot fi menționați fungii din genul *Aspergillus*. La ei se rapoartă și tulpina *Aspergillus oryzae* HPB-169, considerată de noi drept cea mai apropiată soluție, care manifestă activitate amilolitică maximă 40...50 u/mL [1].

10 Dezavantajul tulpinii menționate constă în nivelul scăzut de biosinteză a enzimelor amilolitice. Pe lângă aceasta ea nu realizează hidroliza amidonului în condiții acide de pH.

Este cunoscut faptul că dintre tulpinile genului *Aspergillus* numai *Aspergillus niger* (unii reprezentanți ai speciei *niger* a genului respectiv) produc enzime amilolitice, care se caracterizează prin însușirea unică – stabilitate acidă sporită. Această proprietate a enzimelor amilolitice de a hidroliza substraturile bogate în amidon în mediul de pH acid ridică valoarea lor practică, oferind posibilități de realizare a proceselor tehnologice la valori scăzute de pH. În astfel de condiții are loc reducerea riscului de contaminare cu microorganisme patogene și mărirea rentabilității producerii [2].

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unei tulpini noi de fungi, ce ar asigura un nivel înalt de biosinteză a enzimelor amilolitice, realizând hidroliza atât în condiții standard, cât și în condiții optimal acide de pH.

20 Esența invenției constă în faptul că se propune o tulpină nouă de fungi *Aspergillus niger* 33-19, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme a Institutului de Microbiologie al A.Ș. R.M. cu nr. CNM FD 02 – sursă de enzime amilolitice.

25 Rezultatul invenției constă în obținerea unei tulpini noi *Aspergillus niger* 33-19 cu nivel înalt de biosinteză a enzimelor amilolitice acidstabile cu capacitate de a realiza hidroliza efectivă a amidonului atât în condiții standard, cât și optimal acide de pH. Rezultatul este condiționat de proprietățile fiziologo-biochimice (procesele anabolice și catabolice care decurg în acest organism) și metabolismul adaptiv al tulpinii.

30 Tulpina *Aspergillus niger* 33-19 propusă a fost obținută în urma iradierii cu raze γ în doză de 1500 Gy a suspensiei de spori a tulpinii *Aspergillus niger* 33 pentru care preventiv au fost selectate condițiile optime de cultivare pentru atingerea potențialului maximal de biosinteză a enzimelor amilolitice.

Nivelul de sinteză a enzimelor amilolitice al tulpinii *Aspergillus niger* 33-19 depășește de 4 ori nivelul tulpinii parentale.

Stabilitatea biochimică a tulpinii propuse a fost verificată timp de 2 ani.

35 Pentru creșterea și dezvoltarea tulpinii poate fi folosit mediul cu compoziția (g/L): făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; $MgSO_4$ - 0,5; KH_2PO_4 - 2,0; KCl - 0,5; restul apă potabilă până la 1 L; pH-ul mediului - 5,0. Activitatea amilolitică constituie 413 u/mL în condiții standard de hidroliză și 346 u/mL în condiții acide de pH.

40 *Caracteristica morfologo-culturală* a tulpinii *Aspergillus niger* 33-19: miceliul de substrat compact, alb cu hife subțiri; capsulele conidiale abundente, conglomerate, de culoare neagră pal; conidioforii incolori, neseptați, cu o lărgire apicală sferică de 45...80 μm în diametru. Lățimea conidioforilor de 15...20 μm ; sterigmele cafenii stratificate: bazale de 20...40 x 5...7 μm , uneori septate, stratul exterior de 7...10 x 3...3,5 μm ; conidiile sferice, având 4...5 μm în diametru, cafenii, cu înveliș bine evidențiat, rugos.

45 Pe mediul de malț agarizat coloniile au 2...3 cm în diametru, sunt netede, sporulează slab. Miceliul culturii tinere este alb, pufos. În a 14-a zi de dezvoltare unele porțiuni ale miceliului devin cafeniu-negrii. Conidioforii cu conidii sferice negre se repartizează la marginile coloniei. Rezervumul alb, cutat radial.

Pe mediul nutritiv (Czapek Dox) coloniile se dezvoltă lent, atingând în diametru 1,5...2,0 cm. Partea opusă a coloniei este albă, cutată mai slab radial. Temperatura optimă de creștere +30°C.

50 *Caracteristica fiziologo-biochimică*: tulpina crește pe surse de azot organice, amoniacale și pe bază de azotați; se caracterizează prin activitate amilolitică extracelulară înaltă. Activitatea amilolitică maximă se înregistrează în ziua a 6-a de cultivare.

55 *Chemoorganotrof*: Crește în limitele de temperaturi +5...+42°C. Temperatura optimă de creștere și biosinteză +28...+30°C. Creșterea la temperaturi mai înalte (+42°C) este urmată de pierderea esențială a activității amilolitice. pH optimal pentru biosinteză enzimelor amilolitice constituie 5,0...5,2.

Produsele sintetizate de tulpină: tulpina acumulează biomasă până la 15 g/L de mediu, cu indicii de compoziție (%): proteină brută - 19,39, grăsimi brute - 5,76, substanțe minerale (cenușă) - 11,61.

Posedă capacitatea de a sintetiza enzime hidrolitice extracelulare: amilolitice, lipolitice, proteolitice.

MD 2363 G2 2004.01.31

4

Metoda, condițiile și componența mediilor pentru păstrarea tulpinii: tulpina se păstrează pe medii înclinate de malț (7B) sau Czapek agarizate, la temperatura de 3...7°C. Termenul de reînsămânțare: la fiecare 2 luni.

5 *Metoda, condițiile și componența mediilor pentru înmulțirea tulpinii:* reproducerea tulpinii se realizează pe mediul de păstrare sau alte medii utilizate în aceste scopuri (malț-agar, Czapek), temperatura de creștere +28...+30°C, durata de creștere 14 zile.

10 *Condițiile și componența mediului pentru fermentare:* cultivarea submersă a producătorului se realizează în baloane Erlenmayer, pe agitatoare cu 80...200 r.p.m. în decurs de 4 zile, la temperatura 28...30°C, pe mediul nutritiv cu compoziția (g/L): amidon - 3,0; făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; MgSO₄ - 0,5; KH₂PO₄ - 2,0; KCl - 0,5; apă potabilă până la 1 L, pH 5,0.

Gradul de puritate al tulpinii: pentru cultivarea tulpinii sunt necesare condiții sterile, în caz contrar poate să fie contaminată cu alte microorganisme (bacterii, mucegaiuri, drojdii).

Exemplu de utilizare a tulpinii

Exemplul 1

15 În baloane Erlenmayer cu capacitatea de 1,0 L se pregătesc câte 200 mL de mediu nutritiv cu următoarea componență, (g/L): amidon - 3,0; făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; MgSO₄ - 0,5; KH₂PO₄ - 2,0; KCl - 0,5; apă potabilă - 1,0; pH mediului - 5.

Mediul se sterilizează în autoclav la presiunea 1 atm și temperatura de 120°C timp de 1 h. Se inoculează cu suspensie de spori ai tulpinii obținute *Aspergillus niger* 33-19.

20 Cultivarea tulpinii are loc în termostate la temperatura de +30°C în decurs de 6 zile în condiții de agitare continuă cu 180...200 r.p.m.

Activitatea amilolitică a lichidului cultural al tulpinii *Aspergillus niger* 33-19 în ziua a 6-a, determinată după metoda colorimetrică, constituie 413...425 u/mL la hidroliza amidonului în condiții standard și 346...351 u/mL în condiții acide conform invenției (tabel).

25

Tulpina	Nr. probei	Activitatea amilolitică, u/mL	
		pH 4,7	pH 2,5
<i>Aspergillus niger</i> 33-19	1	425,0	349,3
	2	413,1	346,1
	3	417,1	351,5
<i>Aspergillus niger</i> 33*	1	96,5	91,3

*Condițiile de cultivare, indicate în ex. 1 sunt optimele și pentru tulpina parentală.

Astfel, activitatea amilolitică pentru tulpina propusă *Aspergillus niger* 33-19 depășește de 4 ori activitatea tulpinii conform celei mai apropiate soluții și de 7 ori activitatea conform soluției apropiate.

30

Tulpina nouă se caracterizează prin stabilitate înaltă acidă a amilazelor biosintetizate.

(57) Revendicare:

35

1. Tulpină de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNM FD 02 – producătoare de enzime amilolitice.

(56) Referințe bibliografice:

1. SU 1158579 A 1985.05.30

2. Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. Тбилиси, Мецниереба, 1984, с. 154

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

LOZOVANU Maria