



MD 2588 F1 2004.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2588<sup>(13)</sup> F1  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 12 N 1/14 ,  
(C 12 N 1/14,  
C 12 R 1:80), 9/42

(12) BREVET DE INVENȚIE

<b>Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării</b>	
(21) Nr. depozit: a 2004 0061 (22) Data depozit: 2004.03.19	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2004.10.31, BOPI nr. 10/2004
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: DESEATNIC Alexandra, MD; PAȘA Lilia, MD; CLAPCO Steliana, MD; TIURIN Janetta, MD; LABLIUC Svetlana, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Tulpină de fungi *Penicillium expansum* - producătoare de celulaze

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la o tulpină de fungi, care poate fi utilizată în industriile microbiologică, alimentară și farmaceutică.

Se propune o tulpină de fungi *Penicillium expansum* – producătoare de celulaze, depusă în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene a Republicii Moldova sub nr. CNMN FD 05 C.

2  
5 Tulpina se caracterizează prin activitate celulozolică înaltă a complexului enzimatic ce conține endoglucanaze, celobiohidrolaze și β-glucozidaze, activitatea cărora constituie 42,43; 2,07 și 4,08 U/ml, corespunzător.

10 Revendicări: 1

MD 2588 F1 2004.10.31

# MD 2588 F1 2004.10.31

3

## Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la o tulpină de fungi, care poate fi utilizată în industriile microbiologică, alimentară și farmaceutică.

5 În prezent cei mai activi producători de celuloze se consideră tulpinile de fungi din genul *Trichoderma*. Preparatele enzimatic obținute din tulpinile respective posedă doar celobiohidrolaze și nu sunt active față de celuloza cristalină sau solubilă (carboximetilceluloza), de asemenea în aceste preparate lipsesc celobiazeele ( $\beta$ -glucozidazele), ceea ce se manifestă prin acumularea celobiozei în hidrolizat și reducerea vitezei de formare a glucozei. Producerea unor complexe celulozice mai echilibrate este caracteristică tulpinilor din genurile *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium* etc. [1].

10 În calitate de cea mai apropiată soluție servește tulpina *Aspergillus fumigatus*, al cărei complex celulozic posedă activitate după hârtia de filtru  $2,5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  și  $\beta$ -glucozidazică  $0,725 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Dezavantajul tulpinii date constă în lipsa componentului endoglucanazic activ, care creează noi extremități nereducătoare – ținte pentru acțiunea celobiohidrolazelor, respectiv sporind randamentul hidrolizei [2].

15 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în evidențierea unei noi tulpini de fungi, care în condițiile cultivării submersive posedă capacitatea de biosinteză a unui complex enzimatic integru, care conține celobiohidrolaze, endoglucanaze și  $\beta$ -glucozidaze într-un raport echilibrat, astfel asigurând hidroliza eficientă a biomasei celulozocomponente.

20 Esența invenției o constituie tulpina de fungi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C – producătoare a unui complex enzimatic cu un conținut echilibrat al endoglucanazelor, celobiohidrolazelor și  $\beta$ -glucozidazelor activitatea cărora este respectiv de  $42,43 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $2,07 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $4,08 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Tulpina *Penicillium expansum* este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Republicii Moldova sub nr. CNMN FD05C.

Rezultatul invenției constă în producerea unui preparat enzimatic celulozolic, care asigură dezintegrarea profundă și eficientă a biomasei celulozocomponente.

25 **Particularitățile morfologico-culturale ale tulpinii.** Pe must de malț-agar coloniile cresc rapid. Inițial acestea sunt albe, după 3 zile, când începe formarea conidioforilor cu conidii colonia capătă o culoare cenușie cu nuanță verzuie, având o suprafață uniformă, catifelată. Marginile coloniei rămân albe, rar galbene. Reversul este de culoare cafenie. Pe mediul Czapek cu zaharoză coloniile cresc rapid, sunt extinse, regiunea cu conidiofori are o culoare verde murdar, reversul – cafeniu. Conidioforii sub formă de ramificări scurte ale hifelor. Conidiile au formă elipsoidală, aproape sferică,  $3 \times 3,4 \mu\text{m}$ , în lanțuri.

**Particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii.** Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C crește pe mediile: must de malț-agar, Czapek-agar, cartof-agar în limitele de temperatură  $+5\dots+45^\circ\text{C}$ . Temperatura optimă de creștere  $+28\dots+30^\circ\text{C}$ .

35 Cultivată submersiv pe mediile Czapek cu  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  hârtie de filtru, mediul Ghetsinson cu  $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  extract de porumb și  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  celuloză microcristalină sau cu alte surse naturale de carbon (paie de porumb, tescovină de mere, borhot de sfeclă) în concentrație de  $10\dots60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  tulpina crește intens și manifestă activitate endoglucanazică, celobiohidrolazică și  $\beta$ -glucozidazică.

40 Pe mediul Ghetsinson cu surse ușor asimilabile de carbon (mono- și dizaharide) tulpina crește intens, dar activitățile menționate diminuează.

Tulpina nu asimilează amidon.

În calitate de surse de azot asimilează azotul nitric și amoniacal, precum și azotul din surse organice: extract de porumb, drojii etc.

45 Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și  $\beta$ -glucozidazică se depistează în lichidul cultural după 24 ore de cultivare submersivă pe mediul Ghetsinson cu  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  celuloză microcristalină și  $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  extract de porumb, fiind în creștere acestea ating indicele maxim după 168 ore de cultivare.

Dezvoltarea tulpinii are loc la pH-ul cuprins în limitele  $2,5\dots9,0$ ; pH-ul mediului, optimal pentru biosinteza enzimelor menționate, este de  $5,5\dots6,5$ .

50 Pentru păstrarea îndelungată a tulpinii cultura de 14 zile, crescută la temperatura de  $30^\circ\text{C}$  pe coloane oblice de must de malț-agar, este conservată în frigider la  $+4^\circ\text{C}$ . Pasajele pe mediu proaspăt se efectuează la fiecare 6 luni.

Tulpina este înmulțită pe coloane oblice de must de malț-agar. Pasajele se efectuează prin porțiuni de miceliu cu conidii.

Cultivarea se realizează în termostate la temperatura de  $+30^\circ\text{C}$  timp de  $10\dots14$  zile.

55 **Exemple de utilizare a tulpinii**

**Exemplul 1**

Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C s-a cultivat în baloane Erlenmayer de  $0,5 \text{ l}$  cu  $0,1 \text{ l}$  mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă ( $180 \text{ rot} \cdot \text{min}^{-1}$ ), la temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , timp de 168 ore.

## MD 2588 F1 2004.10.31

4

Compoziția mediului (g):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{KCl}$  – 0,1;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{FeCl}_3$  – 0,01; celuloză microcristalină – 10; extract de porumb – 15; apă distilată 1 litru la pH-ul de 4,5.

5 Separarea lichidului cultural de biomasă s-a efectuat prin filtrare. Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică,  $\beta$ -glucozidazică și xilanazică s-au determinat prin dozarea zaharurilor reducătoare (metoda Somogy-Nelson) în urma acțiunii lichidului cultural asupra substratelor specifice: Na-carboximetilceluloză, hârtie de filtru și p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranozid și au avut valorile 39,4  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 2,07  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$  și 4,08  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$  respectiv.

### Exemplul 2

10 Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD05C s-a cultivat în baloane Erlenmayer de 0,5 l cu 0,1 l mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (180  $\text{rot}\cdot\text{min}^{-1}$ ), la temperatura de 28°C, timp de 168 ore. Compoziția mediului (g):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{KCl}$  – 0,1;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{FeCl}_3$  – 0,01; celuloză microcristalină – 10; extract de porumb – 15; apă distilată 1 litru la pH-ul de 5,5.

15 Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și  $\beta$ -glucozidazică au avut valorile 42,43  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 1,66  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$  și 5,03  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$  respectiv.

### (57) Revendicare:

20 1. Tulpină de funghi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C – producătoare de celulaze.

### (56) Referințe bibliografice:

1. Biotechnologie. Coordonateur Rene Scriban. TEC&DOC, Paris, 1999, p. 67
2. SU 1440920 A1 1988.11.30

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

LOZOVANU Maria