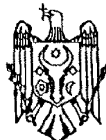




MD 2588 G2 2004.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 2588⁽¹³⁾ G2
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/14 ,
(C 12 N 1/14,
C 12 R 1:80), 9/42

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2004 0061 (22) Data depozit: 2004.03.19</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2004.10.31, BOPI nr. 10/2004</p>
<p>(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</p>	

(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 G2 2004.10.31

MD 2588 G2 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 celulaze 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 (β -glucozidazele), ceea ce se manifestă prin acumularea celobiozei în hidrolizat și reducerea vitezei de formare a glucozei. Producerea unor complexe celulazice 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 celulazic posedă activitate după hârtia de filtru $2,5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ și β -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 β -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 β -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 Neapatogene 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 ramificații scurte ale hifelor. Conidiile au formă elipsoidală, aproape sferică, $3 \times 3,4 \text{ }\mu\text{m}$, 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 $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ hartie de filtru, mediul Ghetcinson 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 $10 \dots 60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ tulpina crește intens și manifestă activitate endoglucanazică, celobiohidrolazică și β -glucozidazică.

40 Pe mediul Ghetcinson 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, drojdii etc.

45 Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și β -glucozidazică se depistează în lichidul cultural după 24 ore de cultivare submersivă pe mediul Ghetcinson 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 $2,5 \dots 9,0$; pH-ul mediului, optimal pentru biosinteza enzimelor menționate, este de $5,5 \dots 6,5$.

50 Pentru păstrarea îndelungată a tulpinii cultura de 14 zile, crescută la temperatura de 30°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 $10 \dots 14$ zile.

MD 2588 G2 2004.10.31

4

Exemple de utilizare a tulpinii

Exemplul 1

- 5 Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C s-a cultivat în baloane Erlenmayer de 0,5 l cu 0,1 l mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (180 rot · min⁻¹), la temperatura de 30°C, timp de 168 ore. Compoziția mediului (g): KH₂PO₄ – 1; CaCl₂ – 0,1; MgSO₄ · 7H₂O – 0,3; KCl – 0,1; NaNO₃ – 2,5; FeCl₃ – 0,01; celuloză microcristalină – 10; extract de porumb – 15; apă distilată 1 litru la pH-ul de 4,5.
- 10 Separarea lichidului cultural de biomasă s-a efectuat prin filtrare. Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică, β-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-β-D-glucopiranozid și au avut valorile 39,4 U·ml⁻¹; 2,07 U·ml⁻¹ și 4,08 U·ml⁻¹ respectiv.

Exemplul 2

- 15 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 rot·min⁻¹), la temperatura de 28°C, timp de 168 ore. Compoziția mediului (g): KH₂PO₄ – 1; CaCl₂ – 0,1; MgSO₄ · 7H₂O – 0,3; KCl – 0,1; NaNO₃ – 2,5; FeCl₃ – 0,01; celuloză microcristalină – 10; extract de porumb – 15; apă distilată 1 litru la pH-ul de 5,5.
- 20 Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și β-glucozidazică au avut valorile 42,43 U·ml⁻¹; 1,66 U·ml⁻¹ și 5,03 U·ml⁻¹ respectiv.

(57) Revendicare:

- 25 1. Tulpină de fungi *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