

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3945** ⁽¹³⁾ **B1**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/685 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12N 9/30 (2006.01)

(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 2009 0041 (22) Data depozit: 2009.04.07	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.07.31, BOPI nr. 7/2009
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: CILOCI Alexandra, MD; STRATAN Maria, MD; CLAPCO Steliana, MD; TIURIN Janeta, MD; LABLIUC Svetlana, MD; GHIȚU Dumitru, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de funghi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN
FD 02**

(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la biotehnologie, în special la cultivarea submersă a tulpinii de funghi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor amilolitice.

Procedeu, conform invenției, include creșterea culturii de funghi pe malț-agar timp de 14 zile, pregătirea suspensiei de spori prin spălarea culturii de funghi cu apă distilată, tratarea suspensiei de spori cu unde de intensitate joasă cu lungimea $\lambda=7,1$ mm, emise în regim continuu, timp de 15 min, introducerea suspensiei de spori în cantitate de

2

10% vol. într-un mediu nutritiv steril care conține, g/L: 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 cu pH-ul mediului 3,0, cultivarea submersă în baloane Erlenmayer în condiții de agitare la temperatura de 28...30 C, timp de 144 ore.

Rezultatul constă în majorarea conținutului de enzime amilolitice și în micșorarea duratei de cultivare.

Revendicări: 1

MD 3945 B1 2009.07.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor amilolitice.

5 Majoritatea tehnologiilor existente de obținere a preparatelor enzimatiche amilolitice utilizează ca producători tulpini de bacterii și fungi miceliali în cultură submersă.

Pentru cultivarea tulpinilor fungice producătoare de enzime amilolitice se utilizează medii, care conțin ca parte minerală diferite modificări ale mediului Czapek și inductori ai sintezei amidazelor: amidon sau ingrediente naturale cu conținut înalt de amidon - făină de porumb, făină de fasole, tărâțe de grau etc. [1].

10 În calitate de cea mai apropiată soluție s-a utilizat procedeul de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 ce include etapele: pregătirea materialului semincer prin spălarea cu apă distilată a culturii de 14 zile de pe coloane oblice de malț-agar Czapek, însămânțarea mediului nutritiv steril cu următoarea componentă, g/L: amidon - 3,0; făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; KH₂PO₄ - 2,0, KCl - 0,5, MgSO₄ - 0,5, apă potabilă până la 1,0 L; pH inițial al mediului 3,0; cultivarea submersă a tulpinii în condiții de agitare continuă (80...200 rot./min) în baloane Erlenmayer cu capacitate de 1,0 L, cu 0,2 L mediu nutritiv, la temperatura 28...30°C, durata cultivării 144 ore. Tulpina a fost obținută în urma iradierii cu raze γ cu frecvența de 1500 Hz a suspensiei de spori ai tulpinii *Aspergillus niger* 33 [2].

20 La cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 în condiții proximale lichidul cultural manifestă activitate amilolitică de 413...425 u/mL la hidroliza amidonului solubil în condiții standard (pH 4,7).

Dezavantajul procedeei cunoscut constă în faptul că în condiții proximale tulpina, fiind o variantă mutantă, după 6 ani de păstrare manifestă tendințe de scădere a activității enzimatiche.

25 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02, care să asigure sporirea și menținerea la nivelul original a capacității biosintetice a producătorului.

30 Esența invenției constă în aceea că procedeul, conform invenției, include creșterea culturii de fungi pe malț-agar timp de 14 zile, pregătirea suspensiei de spori prin spălarea culturii de fungi cu apă distilată, tratarea suspensiei de spori cu unde de intensitate joasă cu lungimea $\lambda=7,1$ mm, emise în regim continuu, timp de 15 min, introducerea suspensiei de spori în cantitate de 10% vol. într-un mediu nutritiv steril care conține, g/L: 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 cu pH-ul mediului 3,0. Cultivarea submersă în baloane Erlenmayer în condiții de agitare la temperatura de 28...30 C, timp de 144 ore.

35 Rezultatul constă în majorarea conținutului de enzime amilolitice și în micșorarea duratei de cultivare. Ca sursă de unde milimetrice servește generatorul „UEM-3”.

40 Efectul biostimulator al undelor milimetrice de intensitate joasă este determinat de activarea sistemelor enzimatiche ale celulelor microbiene, urmată de creșterea vitezei de transport a substanțelor nutritive și intensificarea proceselor de formare a produselor metabolice (Пичко В.Б., Поваляева И.В. Электромагнитная стимуляция продуцирующей способности микроорганизмов и ее механизмы. Прикладная биохимия и микробиология. 1996, т. 32, № 4, с. 468-472).

Exemplu de realizare a invenției

45 Suspensia de spori se pregătește prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii de *Aspergillus niger* crescută timp de 14 zile pe suprafețe oblice de malț-agar. Suspensia de spori astfel pregătită este supusă acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă cu lungimea de undă $\lambda=7,1$ mm emise în regim continuu timp de 15 min și în cantitate de 10% vol. într-un mediu nutritiv steril care conține, g/L: 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 cu pH-ul mediului 3,0. Cultivarea submersă în baloane Erlenmayer în condiții de agitare 180...200 rot./min la temperatura de 28...30 C, timp de 144 ore.

50 Activitatea amilolitică în lichidul cultural determinată prin metoda fotocolorimetrică cu iod în dinamică pe parcursul a 4 zile, începând cu ziua a 4-a de cultivare a micromicetei a constituit respectiv 430,61 u/mL, 420,64 u/mL și 360,18 u/mL la 4-a, a 5-a și a 6-a zi de cultivare față de 320,56 u/mL în varianta conform celei mai apropiate soluții în ziua a 6-a de cultivare (termenul manifestării maxime de biosinteză), ceea ce depășește cu 34,33, 31,22 și 12,36% activitatea fixată la cultivarea tulpinii în condiții proximale (tabelul).

60

MD 3945 B1 2009.07.31

4

Tabel

Modificarea activității amilolitice a tulpinii *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 în funcție de acțiunea undelor milimetrice de intensitate joasă cu lungimea $\lambda=7,1$ mm

5

Regimul	Durata de iradiere, min	Activitatea amilolitică					
		a 4-a zi		a 5-a zi		a 6-a zi	
		u/mL	%*	u/mL	%*	u/mL	%*
Cu impulsuri cu frecvența 8 Hz	10	177,08	55,24	241,06	75,20	241,15	75,23
	15	251,19	78,36	181,18	56,52	386,59	120,6
	20	265,87	82,94	320,56	100	333,76	104,12
Cu impulsuri cu frecvența 16 Hz	10	371,85	116,0	378,26	118,0	465,86	145,33
	15	258,53	80,65	200,35	62,50	267,67	83,51
	20	123,03	38,38	101,30	31,60	238,56	74,42
Frecvent	10	280,52	87,51	121,33	37,85	320,56	100
	15	148,51	46,33	261,00	81,42	214,87	67,03
	20	267,82	83,55	80,81	25,21	294,11	91,75
Continuu	10	133,93	41,78	178,14	55,57	280,52	87,51
	15	430,61	134,33	420,64	131,22	360,18	112,36
	20	212,50	66,29	350,78	109,43	478,92	149,4
Martor	0	167,75	-	220,59	-	320,56	100

* față de martor în ziua manifestării maxime de biosinteză.

10

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de funghi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 care include creșterea culturii de funghi pe malț-agar timp de 14 zile, pregătirea suspensiei de spori prin spălarea culturii de funghi cu apă distilată, tratarea suspensiei de spori cu unde de intensitate joasă cu lungimea $\lambda=7,1$ mm, emise în regim continuu, timp de 15 min, introducerea suspensiei de spori în cantitate de 10 % vol. într-un mediu nutritiv steril care conține, g/L: făină de fasole - 9,0; tărâțe de grâu - 18,0; $MgSO_4$ - 0,5; KH_2PO_4 - 2,0; KCl - 0,5; apă potabilă până la 1 L cu pH-ul mediului 3,0, cultivarea submersă în baloane Erlenmayer în condiții de agitare la temperatura de 28...30°C, timp de 144 ore.

20

(56) Referințe bibliografice:

1. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. Москва, Агропромиздат, 1987, с. 169-171
2. MD 2363 F1 2004.01.31