



MD 4121 B1 2011.07.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4121** (13) **B1**

(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)  
*C12N 9/62* (2006.01)  
*C12N 9/26* (2006.01)  
*C12N 9/28* (2006.01)  
*C12N 9/42* (2006.01)  
*C12R 1/685* (2006.01)  
*A23K 1/165* (2006.01)

MD 4121 B1 2011.07.31

**(12) BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi  
revocată în termen de 6 luni de la data publicării

<p>(21) Nr. depozit: a 2010 0101 (22) Data depozit: 2010.09.16</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.07.31, BOPI nr. 7/2011</p>
<p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; ÎNTREPRINDEREA DE STAT PENTRU CERCETARE ÎN SELECȚIA ȘI HIBRIDAREA SUINELOR "MOLDSUINHIBRID" A INSTITUTULUI ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE BIOTEHNOLOGII ÎN ZOOTEHNIE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ AL AȘM, MD; UNIVERSITATEA AGRARĂ DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p> <p>(72) Inventatori: DESEATNIC-CILOCI Alexandra, MD; TIURINA Janetta, MD; CLAPCO Steliana, MD; CAISIN Larisa, MD; HAREA Vasile, MD; LABLIUC Svetlana, MD; STRATAN Maria, MD; DVORNINA Elena, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; ÎNTREPRINDEREA DE STAT PENTRU CERCETARE ÎN SELECȚIA ȘI HIBRIDAREA SUINELOR "MOLDSUINHIBRID" A INSTITUTULUI ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE BIOTEHNOLOGII ÎN ZOOTEHNIE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ AL AȘM, MD; UNIVERSITATEA AGRARĂ DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p>	

**(54) Procedeu de obținere a complexului celulozo-amilazic****(57) Rezumat:**

1  
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la obținerea unui complex celulozo-amilazic ce poate fi utilizat în zootehnie ca mijloc de sporire a asimilării rațiilor alimentare.

Procedeu de obținere a complexului celulozo-amilazic include cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 pe un mediu de cultură cu următorul raport al componentelor, g/L: borhot de sfeclă – 10,0;

2  
5 amidon – 10,0; tărâțe de grâu – 20,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5; apă până la 1,0 L, la pH 6,0, timp de 168 ore, după cultivare lichidul de cultură se separă de biomasă prin filtrare sau centrifugare, complexul celulozo-amilazic se separă din filtratul de cultură prin sedimentare cu alcool etilic rectificat și se centrifugază.

Revendicări: 1

15

**(54) Process for the production of cellulase-amylase complex**

**(57) Abstract:**

1  
The invention relates to biotechnology, in particular to the production of a cellulase-amylase complex which can be used in animal husbandry as a means to improve the assimilation of food rations.

The process for the production of cellulase-amylase complex includes submerged cultivation of *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 fungus strain on a nutrient medium in the following component ratio, g/L: sugar beet

2  
pulp – 10.0; starch – 10.0; wheat bran – 20.0 ;  
5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.1;  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.3;  $\text{NaNO}_3$  – 2.5; water up to  
10 1.0 L, at pH 6.0, during 168 hours, after  
cultivation the culture liquid is separated from  
the biomass by filtration or centrifugation, the  
cellulase-amylase complex is separated from  
15 the culture filtrate by sedimentation with  
rectified ethyl alcohol and centrifuged.

Claims: 1

**(54) Способ получения целлюлазо-амилазного комплекса**

**(57) Реферат:**

1  
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к получению целлюлазо-амилазного комплекса, который может  
5 быть использован в животноводстве в качестве средства для повышения ассимиляции пищевых рационов.

Способ получения целлюлазо-амилазного комплекса включает глубинное культивирование штамма гриба *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 на питательной среде,  
10 при следующем соотношении компонентов, г/л: свекловичный жом - 10,0; крахмал – 10,0; пшеничные отруби – 20,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  –

2  
1,0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  
 $\text{NaNO}_3$  – 2,5; вода до 1,0 л, при pH 6,0, в  
5 течение 168 часов, после культивирования культуральную жидкость отделяют от биомассы фильтрацией или центрифугированием, целлюлазо-амилазный комплекс  
10 отделяют из культурального фильтрата путем осаждения этиловым ректификованным спиртом и центрифугируют.

П. формулы: 1

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la obținerea unui complex celulazo-amilazic ce poate fi utilizat în zootehnie ca mijloc de sporire a asimilării rațiilor alimentare.

5 Este cunoscut că în industriile de prelucrare a materiilor vegetale în scopul dezintegrării polimerilor naturali (celuloza, hemicelulozele, amidonul) din compoziția furajelor pentru sporirea asimilării lor de către animale și păsări sunt utilizate preparate enzimice hidrolitice mixte, obținute prin agitare mecanică a componentelor din diferite surse (diverse microorganisme producătoare) sau obținute prin cultivarea mixtă a producătorilor microbieni de origine diferită [1].

10 Dezavantajul constă în optimizarea dificilă a preparatului după componentele enzimice și/sau a condițiilor de cultivare ce necesită cercetări suplimentare voluminoase, complexitatea sporită a realizării procesului tehnologic, ceea ce conduce la creșterea prețului de cost al produsului final.

15 Cea mai apropiată soluție pentru invenția revendicată este procedeul de obținere a enzimelor celulozolitice care include cultivarea unui amestec în raport de 1:1 constituit din două microorganisme *Trichoderma viride* și *Aspergillus niger* (tulpini de colecție) pe un mediu de cultură constituit din tărâțe de grâu, extract de malț și săruri minerale [2].

20 Dezavantajul acestui procedeu constă în optimizarea dificilă a condițiilor de cultivare mixtă a două microorganisme diferite pentru obținerea efectului optim. Complexul enzimatic obținut prin acest procedeu nu conține amilaze și xilanaze, enzime cu capacitate de dezintegrare a amidonului și xemicelulozelor, constituenți majori ai materiei vegetale. Lipsa acestor două componente conduce la diminuarea eficienței complexului enzimatic integral la asimilarea de către animale și păsări a furajelor concentrate în bază de orz, ovăz, grâu și alte grăunțoase.

25 Procedeul nu permite modificarea ponderii componentelor enzimice din compoziția complexului în concordanță cu compoziția substratului.

30 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui complex celulazo-amilazic specific, echilibrat conform activității enzimice respective (celobiohidrolaze, endoglucanaze,  $\beta$ -glucozidaze, amilaze) cu capacități de dezintegrare a polimerilor naturali din compoziția țesuturilor vegetale (celuloza, hemicelulozele, amidonul).

35 Esența invenției constă în aceea că procedeul de obținere a complexului celulazo-amilazic include cultivarea submersă a tulpinii de funghi *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 pe un mediu de cultură cu următorul raport al componentelor, g/L: borhot de sfeclă – 10,0; amidon – 10,0; tărâțe de grâu – 20,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5; apă până la 1,0 L, la pH 6,0, timp de 168 ore, după cultivare lichidul de cultură se separă de biomasă prin filtrare sau centrifugare, complexul celulazo-amilazic se separă din filtratul de cultură prin sedimentare cu alcool etilic rectificat și se centrifughează.

40 Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea complexului celulazo-amilazic echilibrat la cultivarea unui singur microorganism - tulpina fungică *Aspergillus niger* CNMN-FD-10.

Rezultatul tehnic obținut se datorează capacității înalte de adaptare a fungilor la condițiile de mediu, caracterul indus al enzimelor hidrolitice, diferența termenelor de acumulare maximă a enzimelor de tipuri diferite.

**Exemplu de realizare a invenției**

45 Tulpina *Aspergillus niger* CNMN-FD-10, utilizată ca producător, produce extracelular complexul enzimatic hidrolitic constituit din: celobiohidrolaze, endoglucanaze,  $\beta$ -glucozidaze, xilanaze, ca enzime-satelit în cantități mici - amilaze.

50 Se prepară mediul nutritiv cu compoziția, g/L: borhot de sfeclă – 10,0; amidon – 10; tărâțe de grâu - 20,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,3;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5; apă până la 1,0 L; pH 6,0. Mediul se repartizează a câte 0,2 L în vase Erlenmayer cu capacitatea de 1 L și se sterilizează în autoclavă la regimul 120°C, timp de 1 oră. După răcire la 30°C mediul se inoculează cu 5% v/v suspensie de spori ai culturii de 10...12 zile. Retortele se montează pe agitator cu viteza de rotație 180...200 rot./min. Cultivarea se efectuează într-o încăpere termostată la 28...30°C, timp de 168 ore. Ca material de  
55 inoculare servește suspensia de spori cu concentrația de  $2,5 \cdot 3,0 \times 10^6 \dots 10^7$  spori/mL, obținută prin spălare cu apă distilată sterilă de pe suprafețe înclinate de malț-agar a culturii fungice *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 în vârstă de 10...12 zile.

# MD 4121 B1 2011.07.31

4

După cultivare lichidul de cultură se separă de biomasă prin filtrare sau centrifugare, complexul celulozo-amilazic se separă din filtratul de cultură prin sedimentare cu alcool etilic rectificat și se centrifughează, ulterior se determină activitățile enzimatică care în aceste condiții prezintă următoarele valori, u/g:

- 5 celobiohidrolaze - 13,6;  
 β-glucozidaze - 309,9;  
 endoglucanaze - 467,1;  
 xilanaze - 2881,6;  
 amilaze - 37,7.
- 10 Eficacitatea complexului celulozo-amilazic (Cellamyl-5) obținut a fost evaluată printr-un test de digestibilitate în nutriția suinelor de prăsilă. Rezultatele sunt reprezentate în tabel. În urma cercetărilor s-a stabilit îmbunătățirea indicilor de valorificare digestivă a substanțelor nutritive din nutrețul combinat (cu conținutul de celuloză ridicat) de către suinele de prăsilă.
- 15 Digestibilitatea substanței uscate în lotul experimental nr. 3 s-a mărit cu 1,75% în comparație cu lotul martor, iar digestibilitatea substanțelor nutritive în lotul experimental nr. 2 cu 1,67%, s-a constatat tendința măririi digestibilității proteinei brute 72,33 și 72,06% respectiv loturile experimentale nr. 2 și nr. 3 în comparație cu lotul martor (69,91%). Se poate observa astfel creșterea sub influența preparatului a digestibilității substanțelor:
- 20 uscate, organice, proteinei brute și grăsimii brute, reducând în același timp digestibilitatea grăsimii brute.

Tabel

- 25 Influența complexului celulozo-amilazic (Cellamyl-5) asupra digestibilității substanțelor nutritive din componența nutrețurilor combinate (NC) destinate tineretului porc

Nr. d/o	Lotul ( $X \pm s_x$ )			
	LM* (NC)	LE** <sub>1</sub> (NC + 0,8 kg/t Farmazyme 2575)	LE <sub>2</sub> (NC + 0,8 kg/t Cellamyl - 5)	LE <sub>3</sub> (NC + 1,0 kg/t Cellamyl - 5)
1	Digestibilitatea substanței uscate (SU)			
	75,37 ± 1,195	74,04 ± 1,288	76,98 ± 0,870	77,12 ± 1,588
2	Digestibilitatea substanței organice (SO)			
	69,45 ± 3,019	72,73 ± 1,836	76,50 ± 1,276	76,84 ± 1,028
3	Digestibilitatea proteinei brute (PB)			
	69,91 ± 2,826	68,82 ± 2,947	72,33 ± 4,100	72,06 ± 3,507
4	Digestibilitatea grăsimii brute			
	84,26 ± 3,194	84,88 ± 5,587	76,78 ± 8,045	73,36 ± 4,006
5	Digestibilitatea celulozei brute (CB)			
	39,89 ± 1,605	43,96 ± 1,284	42,57 ± 1,574	44,39 ± 1,743
6	Digestibilitatea substanțelor extractive neazotoase (SEN)			
	85,44 ± 1,190	86,36 ± 4,00	88,03 ± 3,380	82,78 ± 0,847

LM\* - lot martor; LE\*\* - lot experimental

30

**(56) Referințe bibliografice citate în descriere:**

1. RO 114150 B 1999.01.29
2. RO 100891 A2 1991.08.02

**(57) Revendicări:**

Procedeu de obținere a complexului celulazo-amilazic, care include cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* pe un mediu de cultură constituit din tărâțe de grâu și săruri minerale, **caracterizat prin aceea că** se utilizează tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN-FD-10, iar cultivarea se efectuează pe un mediu conținând, g/L: borhot de sfeclă – 10,0; amidon – 10,0; tărâțe de grâu – 20,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5; apă până la 1,0 L, la pH 6,0, timp de 168 ore, după cultivare lichidul de cultură se separă de biomasă prin filtrare sau centrifugare, complexul celulazo-amilazic se separă din filtratul de cultură prin sedimentare cu alcool etilic rectificat și se centrifughează.

**Șef Secție:**

IUSTIN Viorel

**Examinator:**

DUMANSCAIA Olga

**Redactor:**

CANȚER Svetlana