



MD 4186 C1 2013.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4186** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/77 (2006.01)
C12N 9/58 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2012 0019 (22) Data depozit: 2012.02.20</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2012.11.30, BOPI nr. 11/2012</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: DESEATNIC-CILOCI Alexandra, MD; TIURINA Janeta, MD; LUPAȘCU Galina, MD; CLAPCO Steliana, MD; LABLIUC Svetlana, MD; STRATAN Maria, MD; DVORNINA Elena, MD; SAȘCO Elena, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) **Tulpină de fungi *Fusarium gibbosum* - producătoare de proteaze acide și neutre, xilanaze și β-glucozidaze**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, in special la o tulpină de fungi miceliali *Fusarium gibbosum* și poate fi utilizată pentru obținerea preparatelor enzimactice hidrolitice complexe.

Tulpina de fungi este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie

2
al AȘM cu numărul CNMN-FD-12 și poate fi utilizată în calitate de sursă de proteaze acide și neutre, xilanaze și β-glucozidaze.

Revendicări: 1

5

10

MD 4186 C1 2013.06.30

(54) Strain of fungus *Fusarium gibbosum* - producer of acid and neutral proteases, xylanases and β -glucosidases

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, in particular to a strain of filamentous fungi *Fusarium gibbosum* and can be used to obtain complex hydrolytic enzymatic drugs.

The fungus strain is deposited in the National Collection of Non-Pathogenic

2
Microorganisms of the Institute of Microbiology and Biotechnology of the ASM under the number CNMN-FD-12 and can be used as a source of acid and neutral proteases, xylanases and β -glucosidases.

10
Claims: 1

(54) Штамм гриба *Fusarium gibbosum* - продуцент кислых и нейтральных протеаз, ксиланаз и β -глюкозидаз

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к штамму мицелиальных грибов *Fusarium gibbosum* и может быть использовано для получения комплексных гидролитических ферментных препаратов.

Штамм гриба депонирован в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов Института Микробиологии и Биотехнологии АНМ под номером CNMN-FD-12 и может быть использован в

2
качестве источника кислых и нейтральных протеаз, ксиланаз и β -глюкозидаз.

10
П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la tulpina de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 — producătoare a complexului enzimatic hidrolitic cu activitate proteolitică, xilanazică și β -glucozidazică, ce realizează hidroliza concomitentă a moleculelor proteice și a polizaharidelor din componența țesuturilor vegetale, și poate fi utilizată în industria microbiologică la obținerea preparatelor enzimactice hidrolitice complexe cu aplicare în industria alimentară, în oenologie, la fabricarea berii și alcoolului, farmaceutică, producerea furajelor, prelucrarea pieilor etc.

Este cunoscut un șir de tulpini de funghi microscopici din genurile *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* — producătoare active a unui spectru larg de hidrolaze exocelulare, inclusiv proteaze, celulaze, xilanaze [1]. Dezavantajele acestor producători sunt capacitatea joasă de sinteză a proteazelor, lipsa capacității de sinteză a xilanazelor și/sau a β -glucozidazelor.

Soluția cea mai apropiată de obiectul revendicat este tulpina *Aspergillus oryzae*-12, care sintetizează un complex enzimatic cu acțiune proteolitică și xilanolică. La cultivarea submersă, tulpina manifestă activitate enzimatică ce constituie: proteaze — 21,0...24,6 u/ml; xilanaze — 7,5...9,8 u/ml [2]. Dezavantajul tulpinii constă în nivelul scăzut al activității proteazice și xilanazice, lipsa β -glucozidazelor, necesare pentru o hidroliză mai profundă a materiei prime vegetale.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în evidențierea unei noi tulpini de funghi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12, care la cultivarea pe medii nutritive ieftine, în bază de deșeuri ale industriei alimentare, sintetizează complexul de enzime hidrolitice constituit din: proteaze acide, ce realizează hidroliza substratului la pH-ul de 3,6 — 25,2...26,7 u/ml; proteaze neutre, ce realizează hidroliza la pH-ul de 7,4 — 30,2...32,9 u/ml; xilanaze — 8,75...11,32 u/ml; β -glucozidaze — 2,23...2,42 u/ml, caracterizat prin nivel înalt al activității proteazice în limite largi ale pH-ului (3,6 și 7,4), xilanazice, cât și prezența β -glucozidazelor, fapt ce contribuie la extinderea domeniilor de aplicare.

Esența invenției o constituie tulpina de funghi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 — producătoare de proteaze acide și neutre, xilanaze și β -glucozidaze, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM sub nr. CNMN-FD-12 (adeverință de depozitare din 11.XI.2011).

Rezultatul tehnic constă în obținerea unui complex enzimatic hidrolitic cu spectru larg de acțiune (proteaze, xilanaze, β -glucozidaze) capabil să realizeze hidroliza concomitentă a moleculelor proteice și polizaharidelor structurale ale materiei vegetale.

Particularitățile morfologo-culturale ale tulpinii. Micromiceta *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 crește bine pe diverse medii agarizate.

Pe mediul malț-agar micromiceta formează colonii pufoase cu diametrul de 5,0 cm de culoare albă. Miceliul aerian este alb, bine dezvoltat, cu creștere difuză. Conidiile sunt netede, dispuse în lanțuri, uneori conidii solitare și septate (1...3 septuri). Reversul de culoare bej-cafeniu.

Pe mediul Czapek cultura prezintă colonii mari, formate din miceliu dens, roz pal. Conidiile sunt septate, în special cu 3 septuri. Reversul este de culoare galben pal, iar partea centrală — galben intens. La cultivarea pe mediul Czapek suplimentat cu amidon, se formează colonii mari cu diametrul de 8,0 cm. Miceliul aerian este de culoare albă cu o slabă nuanță roz. Conidiile sunt elipsoidale. Exudatul lipsește. Reversul este galben pal.

Pe mediul cu extract de cartof sunt prezente multiple colonii albe, pufoase, cu diametru mic (0,5...1,0 cm). Conidiile sunt mărunte, ovale, uniceleulare, triseptate. Reversul este de culoare galbenă.

La cultivarea pe mediul Reistrich coloniile sunt solitare, mărunte (0,5 cm), slab sporulate, prezentate prin miceliu aderent la substrat. Reversul este incolor.

Particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii. Tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 crește pe surse organice de azot, amoniac și azotați.

Chemoorganotrof. Crește în limitele de temperaturi 5...40°C. Temperatura optimă de creștere a miceliului este de 28...30°C. Creșterea la temperaturi mai înalte de 40°C este urmată de pierderea esențială a activității enzimactice. Valoarea pH-ului optim pentru biosinteza complexului enzimatic este cuprinsă între 8,0...9,0.

Tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 se caracterizează prin nivel înalt al activității proteazelor exocelulare neutre (pH 7,4) și acide (pH 3,6), posedă capacitatea de a sintetiza enzime celulozolitice (β -glucozidaze, endoglucanaze), xilanaze.

Cultura se păstrează pe coloane oblice de malț-agar sau Czapek la temperatura de 4...5°C. Termenul de reînsămânțare: la fiecare 2 luni.

Reproducerea tulpinii se realizează pe mediul de păstrare (malț-agar) sau alte medii utilizate în aceste scopuri. Pasajele se efectuează prin porțiuni de miceliu cu conidii. Cultivarea se realizează în termostate la temperatura de 30°C, timp de 10...14 zile.

Tulpina este cultivată submers în baloane Erlenmayer, pe agitatoare cu 180...200 rot/min, timp de 5...6 zile, la temperatura de 28...30°C, pe mediul nutritiv cu următoarea compoziție (%): făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO₃ – 0,2; (NH₄)₂SO₄ – 0,1; pH-ul inițial al mediului – 6,25.

10 *Exemple de utilizare a tulpinii*

Exemplul 1. Tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 s-a cultivat pe mediul nutritiv cu următoarea compoziție, (%): făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO₃ – 0,2; (NH₄)₂SO₄ – 0,1; restul – apă de robinet, pH-ul inițial al mediului – 6,25. Mediul nutritiv se însămânțează cu suspensie de spori și miceliu în cantitate de 5% v/v a culturii crescute pe suprafețe înclinate de malț-agar timp de 12...14 zile. Cultivarea se realizează în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 l, care conțin 0,2 l de mediu, în condiții de agitare continuă (200 rot/min), la temperatura de 28° C, timp de 144 ore.

Activitatea proteolitică, determinată în baza metodei Anson după acțiunea asupra cazeinului de sodiu, pentru proteazele acide (valoarea pH-ului – 3,6) a constituit 25,5 u/ml, iar pentru proteazele neutre (valoarea pH-ului – 7,4) a constituit 32,8 u/ml. Activitatea β-glucozidazică și xilanazică s-a determinat în baza acțiunii asupra substratelor specifice (n-nitrofenil β-D-glucopiranozid și xilan, respectiv) prin determinarea cantității de zaharuri reducătoare conform metodei Somogy-Nelson și au constituit, respectiv, 2,39 u/ml și 9,42 u/ml.

25 *Exemplul 2.* Tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 l, care conțineau 0,1 l de mediu, la temperatura de 30° C, timp de 144 ore, în rest condițiile sunt similare celor din *exemplul 1*.

Nivelul de activitate a componentelor complexului enzimatic a constituit: proteaze acide – 26,6 u/ml, proteaze neutre – 30,2 u/ml, β-glucozidaze – 2,28 u/ml și xilanaze – 11,3 u/ml.

30

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Biotehnologie. Coordonateur Rene Scriban, TEC&DOC, Paris, 1999, p. 67
2. RU 2315097 C1 2008.01.20

(57) Revendicări:

Tulpină de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 producătoare de proteaze acide și neutre, xilanaze și β-glucozidaze.

Șef Secție:	IUSTIN Viorel
Examinator:	LUPAȘCU Lucian
Redactor:	LOZOVANU Maria