



MD 1947 G2 2002.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1947⁽¹³⁾ G2
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/14

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2001 0220 (22) Data depozit: 2001.07.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2002.06.30, BOPI nr. 6/2002
(71) Solicitanți: RUDIC Valeriu, MD; DVORNIN Ala, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; DVORNIN Ala, MD; DVORNIN Elena, MD (73) Titulari: RUDIC Valeriu, MD; DVORNIN Ala, MD	

(54) Tulpină a ciupercii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. - producătoare de biomasă

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de ciuperci nouă, care poate fi utilizată în industria farmaceutică pentru obținerea preparatelor medicamentoase și în industria alimentară pentru obținerea produselor cu aromă pronunțată de ciuperci.

Se propune o tulpină nouă de ciuperci *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., depusă în Colecția Națională

2
de Microorganisme a Institutului de Microbiologie al AȘ RM cu nr. CNM-FB-01 - producătoare de biomasă. Tulpina propusă posedă o productivitate înaltă și o aromă specifică pronunțată de ciuperci.
Revendicări: 1

10

MD 1947 G2 2002.06.30

MD 1947 G2 2002.06.30

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină nouă de ciuperci, care poate fi utilizată în industria farmaceutică pentru obținerea preparatelor medicamentoase și în industria alimentară pentru obținerea produselor cu aromă pronunțată de ciuperci.

5 Sunt cunoscute ciupercile de tipul *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., care se cultivă pe medii cu o compoziție complexă și se caracterizează printr-o aromă slab pronunțată de ciuperci [1].

Mai sunt cunoscute tulpini de ciuperci *bazidiale*, capabile să se dezvolte la suprafață sau în profunzimea mediilor lichide.

10 Biomasa obținută de ciupercă *shiitake* (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) este utilizată ca material pentru înșămânțare în vederea înmulțirii miceliului, precum și pentru obținerea prafului de ciuperci [2].

Dezavantajul acestei tulpini constă în productivitatea ei joasă: 30...40 g la 100 g de glucoză utilizată și lipsa aromei de ciuperci.

15 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unei astfel de tulpini, care ar poseda o productivitate înaltă și o aromă pronunțată de ciuperci.

Esența invenției constă în faptul că se propune o tulpină nouă de ciuperci *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. din Colecția Națională de Microorganisme a Institutului de Microbiologie al AȘ RM cu nr. CNM-FB-01 – producătoare de biomasă.

Rezultatul invenției constă în faptul că tulpina propusă:

20 – posedă o productivitate înaltă: 65...75 g de biomasă la 100 g de glucoză utilizată, ieșirea maximă a biomasei constituie 14,1...21,3 g/L după masa uscată;

– posedă o aromă pronunțată de ciuperci.

În afară de aceasta, tulpina propusă poate fi cultivată pe medii ieftine, cu o compoziție simplă, cum ar fi malțul, mediile minerale cu adaos de melasă, extract de levuri, decoct de rumeguș de stejar.

25 Rezultatul obținut este determinat de particularitățile biochimice ale tulpinii. Tulpina propusă posedă o activitate enzimatică și biologică înaltă. Din corpul fructifer și biomasa ciupercii se extrage polizaharida - lentinan, care determină proprietățile curativo-profilactice. De rând cu acestea, proprietățile biochimice ale tulpinii determină aroma sa pronunțată de ciuperci.

Tulpina propusă a fost izolată în cultura pură din ciuperca *Lentinus edodes*, adusă din China.

30 Cultura se păstrează pe malț-agar neutru la temperatura de 4°C în colecția Institutului de Microbiologie al AȘ RM.

Pentru cultivarea tulpinii poate fi utilizat mediul nutritiv cu următoarea componență, (g/L):

decoct de rumeguș de stejar – 10,00;

NH₄Cl – 2,00; KH₂PO₄ – 2,00; KCl – 1,20;

35 MgSO₄ • 7H₂O – 0,25; pH – 7,00.

Caracteristicile morfoculturale

– Pe mediile cu malț agarizat și minerale colonia de ciuperci este albă, pufoasă, hifele sunt situate radial.

– Marginile coloniilor – pe dreapta.

40 – Primordiile apar la a 34...36 zi după inoculare. Mediul și miceliile în acest caz capătă nuanțe brună și brun-închisă, lamelele regulate.

– Este caracteristică prezența artrosporilor, grosimea hifelor fiind de 1,25...3,00 μm și 5,02...6,25 μm.

45 La îmbătrânire, pe alocuri, coloniile devin brune-închise, se observă dezvoltarea corpiilor fructiferi cu bazidiospori maturi.

La suprafața malțului lichid (6° după Baling) se observă o peliculă micelială pufoasă cu o aromă plăcută de ciuperci. La cultivarea îndelungată, miceliul capătă nuanță dublă brună-închisă, la suprafață se formează primordii mature și corpi fructiferi.

50 La cultivarea în profunzime pe medii cu decoct de rumeguș de stejar și mediu mineral cu melasă și extract de levuri miceliul crește sub formă de sfere miceliale. Grosimea hifelor ating valorile 2,0...4,0 μm. Miceliul posedă aromă de ciuperci.

Caracteristica fiziologico-biochimică

Tulpina propusă a ciupercii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. nr. CNM-FB-01 este aerobă. Temperatura optimă de dezvoltare este de 26°C; pH optimal – 8,0.

55 Comportamentul față de sursele de carbon: asimilează glucoza, galactoza, rafinoza, manitul, amidonul, lignina și celuloza. Comportamentul față de sursele de azot: utilizează peptona, asparagina, ureea.

MD 1947 G2 2002.06.30

4

Creșterea în cultură este stimulată de adaosurile de natură vegetală: coajă de stejar, rumeguș de stejar.

Se observă reacția pozitivă față de celulozele extracelulare și sinteza enzimelor proteolitice.

Proprietățile antagoniste: manifestă proprietăți antagoniste față de tulpinile *Candida albicans*.

5 Exemplet de realizare a invenției

Tulpina *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. este cultivată pe rând pe medii lichide cu următoarea componență, g/L:

1. Malț (6° după Baling)

pH 7,0

2. Mediu mineral cu melasă, g/ L:

Melasă 25,00

(NH₄)₂SO₄ 3,00

KH₂PO₄ 1,20

Extract de levuri 2,00

pH 7,00

apă până la 1 L

3. Mediu mineral, g/L:

decoct de rumeguș de stejar 10,00

NH₄Cl 2,00

KH₂PO₄ 2,00

KCl 1,20

MgSO₄ • 7H₂O 0,25

pH 7,00

apă până la 1 L

Mediile se toarnă separat în baloane cu agitatoare cu capacitatea de 750 ml. Volumul mediului în baloane constituie 250 ml.

10 Pentru fărâmițarea ulterioară a miceliului, la fundul baloanelor se presoaară bucățele de faianță.

Mediile se însămânțează cu inoculum în cantitate de 10...20% vol. Cultivarea se efectuează pe agitatoare la 200 rot/min. Temperatura de incubare a ciupercii pe toate mediile studiate este de 26...28°C, timp de 10...14 zile. La sfârșitul incubării, la ziua a 10-ea și a 14-ea, se determină biomasa uscată calculată la 1 L de mediu.

15 A fost determinată biomasa obținută la cultivarea ciupercii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. pe mediu cu malț (6° după Baling) în următorul raport dintre volumul mediului și al suspensiei de miceliu inoculat (10% miceliu din volumul mediului).

S-a determinat cantitatea de miceliu uscat în g/L la ziua a 10-ea de cultivare. S-a determinat superioritatea cultivării în profunzime față de cultivarea la suprafață.

20 Cantitatea minimă de biomasă obținută la raportul dintre volumul mediului și al inoculumului de 9:1, la cultivarea la suprafață constituie 11,0 g/L și la cultivarea în profunzime – 14,1 g/L.

Cantitatea maximă – la raportul 5:5, la suprafață – 13,4 g/L, în profunzime – 21,3 g/L.

A fost studiată productivitatea tulpinii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. la cultivare pe mediu mineral cu melasă și extract de levuri la diferite mărimi ale pH-ului. S-a determinat că acumularea maximă a biomasei se observă la pH-ul inițial de 8,0 și constituie 5,7 g/L.

25 Cercetând creșterea *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. în mediul mineral cu decoct de rumeguș de stejar cu adăugarea diferitelor surse de carbon: glucoză, galactoză, rafinoză, manit, zaharoză, amidon, xiloză, lactoză s-a determinat că cele mai bune surse de carbon sunt: maltoza, amidonul, xiloza, lactoza.

30 A fost studiată dependența vitezei de creștere *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. pe același mediu mineral cu decoct de rumeguș de stejar de sursa de azot: NaNO₃, (NH₄)SO₄, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂C₄H₄O₆, NH₄Cl.

Cea mai bună creștere a fost constatată în cazul utilizării (NH₄)₂HPO₄ – 133 g/L, o creștere bună s-a observat în cazul (NH₄)₂C₄H₄O₆ și NaNO₃ – corespunzător 100 și 83 g/L.

35 A fost studiată influența CaCO₃ asupra creșterii tulpinii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. în profunzime. Acumularea zilnică a biomasei alcătuiește 19,9 g/L la concentrația de 0,1% CaCO₃ și 25,0 g/L la concentrația de 0,01% CaCO₃, ceea ce constituie 105-133% față de martor fără CaCO₃.

Au fost obținute date despre acumularea biomasei ciupercii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. în comparație cu cea mai apropiată soluție la cultivarea în profunzime pe mediu cu decoct de rumeguș de stejar, procentul căruia constituie 2, 5, 10, 25, 50. Cantitatea miceliului uscat se determină la ziua a 10-ea și a 14-ea de cultivare.

40 A fost determinată superioritatea evidentă a tulpinii propuse față de soluția cea mai apropiată. Cantitatea maximă de biomasă obținută pe mediu cu 25% de rumeguș la ziua a 10-ea constituia 8,3 g/L. La adăugarea a 50% de rumeguș se obțin 12,8 g/L de biomasă. Pe când pentru soluția cea mai

MD 1947 G2 2002.06.30

5

apropiată avem corespunzător 6,7 și 9,3 g/L. Astfel, tulpina propusă de ciupercă comestibilă *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. manifesta o bună creștere pe mediile lichide, ce conțin surse ieftine și accesibile de carbon, azot. Pe aceste medii, la pH-ul optim de 8,0 a fost obținută următoarea productivitate maximă: 13,4 g/L la cultivare la suprafață și 21,3 g/L – în profunzime.

5 Cele mai bune surse de carbon sunt: maltoza, amidonul, xiloza, lactoza. Cantitatea de biomasă constituind 96...115 g la 100 g de glucidă asimilată.

Cele mai bune surse de azot s-au dovedit a fi: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, NaNO_3 . Cantitatea de biomasă la miceliu uscat acumulată pe mediul cu NH_4Cl constituie 83...133 g/L.

10 Cercetările au demonstrat superioritatea tulpinii propuse față de soluția cea mai apropiată în ce privește acumularea biomasei.

Conținutul de proteină ($N_{\text{gen}} \times 6,25$) în biomasa tulpinii propuse constituie 28,8...36,0% la biomasa uscată, în funcție de mediul și vârsta miceliului.

Conținutul de aminoacizi în miceliul cultivat în profunzime pe malț, în % la proteina totală, este următorul:

lizină	4,05	valină	3,93
histidină	1,60	metionină	3,00
arginină	3,94	leucină	2,39
acid asparagic	20,82	serină	2,51
treonină	4,75	glicină	11,10
alanină	4,19	acid glutamic	5,59
fenilalanină	urme		

15

Masa micelială, cultivată la suprafață și în profunzime, posedă o aromă pronunțată de ciuperci.

Miceliul, uscat la 40°C, își păstrează aroma timp de câteva luni. Biomasa micelială conține toți aminoacizii esențiali. În plus, tulpina formează în cultură pe medii solide și lichide corpi fructiferi cu spori maturi, ce determină posibilitatea utilizării ei în activitatea de selecție.

20

(57) Revendicare:

25 Tulpină a ciupercii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., deponată în Colecția Națională de Microorganisme a Institutului de Microbiologie al AȘ RM cu nr. CNM-FB-01 - producătoare de biomasă.

(56) Referințe bibliografice:

1. SU 427993
2. Коробан Л.П., Дворнина А.А. Получение жидкого инокулюма гриба шиитаке (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) методом глубинного культивирования. Кишинев, 1998, Деп. в РНТБ

Şef Secție: GUŞAN Ala

Examinator: BANTAŞ Valentina

Redactor: LOZOVANU Maria