

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la o tulpină de fungi, care poate fi utilizată în industriile microbiologică, alimentară și farmaceutică.

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 celobiazazele ( $\beta$ -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].

În calitate de cea mai apropiată soluție servește tulpina *Aspergillus fumigatus*, al cărei complex celulazic posedă activitate după hârtia de filtru 2,5 U·ml<sup>-1</sup> și  $\beta$ -glucozidazică 0,725 U·ml<sup>-1</sup>. Dezavantajul tulpinii date constă în lipsa componentului endoglucanazic activ, care creează noi extremități nereducătoare – ținte pentru acțiunea celobiohidrolazelor, respectiv sporind randamentul hidrolizei [2].

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  $\beta$ -glucozidaze într-un raport echilibrat, astfel asigurând hidroliza eficientă a biomasei celulozocomponente.

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  $\beta$ -glucozidazelor activitatea cărora este respectiv de 42,43 U·ml<sup>-1</sup>; 2,07 U·ml<sup>-1</sup>; 4,08 U·ml<sup>-1</sup>.

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.

Particularitățile morfologoco-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 ramificări scurte ale hifelor. Conidiile au formă elipsoidală, aproape sferică, 3x3,4  $\mu$ m, în lanțuri.

Particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii. Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD05C crește pe mediile: must de malț-agar, Czapek-agar, cartof-agar în limitele de temperatură +5...+45°C. Temperatura optimă de creștere +28...+30°C.

Cultivată submersiv pe mediile Czapek cu 10 g·l<sup>-1</sup> hârtie de filtru, mediul Ghetsinson cu 15 g·l<sup>-1</sup> extract de porumb și 10 g·l<sup>-1</sup> celuloză microcristalină sau cu alte surse naturale de carbon (paie de porumb, tescovină de mere, borhot de sfeclă) în concentrație de 10...60 g·l<sup>-1</sup> tulpina crește intens și manifestă activitate endoglucanazică, celobiohidrolazică și  $\beta$ -glucozidazică.

Pe mediul Ghetsinson 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, drojii etc.

Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și  $\beta$ -glucozidazică se depistează în lichidul cultural după 24 ore de cultivare submersivă pe mediul Ghetsinson cu 10 g·l<sup>-1</sup> celuloză microcristalină și 15 g·l<sup>-1</sup> 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...9,0; pH-ul mediului, optimal pentru biosinteza enzimelor menționate, este de 5,5...6,5.

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 frigidere la +4°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°C timp de 10...14 zile.

Exemple de utilizare a tulpinii

Exemplul 1

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<sup>-1</sup>), la temperatura de 30°C, timp de 168 ore. Compoziția mediului (g): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1; CaCl<sub>2</sub> – 0,1; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,3; KCl – 0,1; NaNO<sub>3</sub> – 2,5; FeCl<sub>3</sub> – 0,01; celuloză microcristalină – 10; extract de porumb – 15; apă distilată 1 litru la pH-ul de 4,5.

Separarea lichidului cultural de biomasă s-a efectuat prin filtrare. Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică,  $\beta$ -glucozidazică și xilanazică s-au determinat prin dozarea zăharurilor reducătoare (metoda Somogy-Nelson) în urma acțiunii lichidului cultural asupra substratelor specifice: Na-carboximetilceluloză, hârtie de filtru și p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranozid și au avut valorile 39,4 U·ml<sup>-1</sup>; 2,07 U·ml<sup>-1</sup> și 4,08 U·ml<sup>-1</sup> respectiv.

## Exemplul 2

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<sup>-1</sup>), la temperatura de 28°C, timp de 168 ore. Compoziția mediului (g): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1; CaCl<sub>2</sub> – 0,1; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,3; KCl – 0,1; NaNO<sub>3</sub> – 2,5; FeCl<sub>3</sub> – 0,01; celuloză microcristalină – 10; extract de porumb – 15; apă distilată 1 litru la pH-ul de 5,5.

Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și β-glucozidazică au avut valorile 42,43 U·ml<sup>-1</sup>; 1,66 U·ml<sup>-1</sup> și 5,03 U·ml<sup>-1</sup> respectiv.