



MD 4445 C1 2017.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4445** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)
C12N 9/58 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2015 0107 (22) Data depozit: 2015.10.28</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.11.30, BOPI nr. 11/2016</p>
<p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE INGINERIE ELECTRONICĂ ȘI NANOTEHNOLOGII IEN "D. Ghițu" al ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD</p> <p>(72) Inventatori: DESEATNIC-CILOCI Alexandra, MD; TIURINA Janetta, MD; GUȚUL Tatiana, MD; CLAPCO Steliana, MD; BIVOL Cezara, MD; LABLIUC Svetlana, MD; DVORNINA Elena, MD; NICORICI Andrei, MD; RUSU Emil, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE INGINERIE ELECTRONICĂ ȘI NANOTEHNOLOGII IEN "D. Ghițu" al ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD</p>	

(54) Procedeu de cultivare a tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* CNMN-FD-15

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* CNMN-FD-15.

Procedeu, conform invenției, prevede obținerea suspensiei de spori a tulpinii crescute timp de 12...14 zile pe un mediu de malț-agar inclinat, adăugarea în condiții sterile a nanoparticulelor de ZnO cu dimensiunile de 29 nm în concentrație de 0,005% cu agitare în decurs de 1...2 min, inocularea suspensiei într-

2
un mediu nutritiv în concentrație de 10% vol. și cultivarea submersă la temperatura de 28...30°C cu agitare continuă la 180...200 rot/min în decurs de 240 ore, totodată mediul nutritiv conține, g/L: tărâțe de grâu – 2,0, făină de soia – 1,0, CaCO₃ – 0,2, (NH₄)₂ SO₄ – 0,1 și apă potabilă restul.

Revendicări: 1

MD 4445 C1 2017.06.30

(54) Process for cultivation of fungus strain *Trichoderma koningii* CNMN-FD-15**(57) Abstract:**

1
The invention relates to biotechnology, particularly to a process for cultivation of fungus strain *Trichoderma koningii* CNMN-FD-15.

The process, according to the invention, provides for the preparation of a strain spore suspension grown for 12...14 days on a slope agar medium, addition in sterile conditions of ZnO nanoparticles of a size of 29 nm in a concentration of 0.005% with stirring for 1...2

2
min, inoculation of the suspension into a nutrient medium in a concentration of 10% vol. and deep cultivation at a temperature of 28...30°C with continuous stirring at 180...200 rev/min for 240 hours, at the same time the nutrient medium contains, g/L: wheat bran – 2.0, soybean meal – 1.0, CaCO₃ – 0.2, (NH₄)₂ SO₄ – 0.1 and drinking water the rest.

Claims: 1

(54) Способ культивирования штамма гриба *Trichoderma koningii* CNMN-FD-15**(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу культивирования штамма гриба *Trichoderma koningii* CNMN-FD-15.

Способ, согласно изобретению, предусматривает получение суспензии спор штамма выращенного в течение 12...14 дней на скошенной агаризованной среде, добавление в стерильных условиях наночастиц ZnO размером 29 нм в концентрации 0,005% с перемешиванием в

2
течение 1...2 мин, инокуляцию суспензии в питательную среду в концентрации 10% об. и глубинное культивирование при температуре 28...30°C с непрерывным перемешиванием при 180...200 об/мин в течение 240 часов, при этом питательная среда содержит, г/л: пшеничные отруби – 2,0, соевую муку – 1,0, CaCO₃ – 0,2, (NH₄)₂ SO₄ – 0,1 и питьевую воду остальное.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* CNMN-FD-15.

5 Cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15 cu însușirea distinctivă de a sintetiza simultan toate trei tipuri de proteaze (acide, neutre și alcaline), precum și amilaze – în calitate de enzime secundare, asigură hidroliza spontană a polimerilor proteici și a polizaharidelor amidonoase. Procedeu
10 poate fi utilizat pentru obținerea proteazelor, cu potențial de aplicare în procesele tehnologice de prelucrare a materiei prime de diferită proveniență, bogată în proteine și polizaharide amidonoase (industria alimentară, de pielărie și blănuri, farmaceutică, oenologie, în producerea berii și alcoolului, detergenților ș.a.).

În tehnologia de cultivare a tulpinilor fungice producătoare de enzime proteolitice, în scopul sporirii biosintezei metaboliților secundari se utilizează diverse proceduri, inclusiv: modificarea componenței mediului de cultivare, selectarea inductorilor
15 specifici ai sintezei proteazelor (ingrediente naturale cu conținut înalt de proteine), aplicarea, în dependență de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii, a diferitor agenți fizico-chimici cu efect stimulator – compuși coordinativi ai metalelor de tranziție, precum și a radiației electromagnetice în diapazon milimetric.

20 Se cunoaște mediul, ce conține borhot de sfeclă, azotat de amoniu, dihidrofosfat de potasiu, malț și tărâțe de grâu [1].

Se cunoaște, de asemenea, mediul nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi, ce conține: făină de porumb, făină de soia, CaCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot (\text{Thio})_2]\text{F}[\text{PF}_6] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ și apă, având pH-ul 6,25 [2].

25 Recent s-a demonstrat eficacitatea nanocompozitelor în ameliorarea bioprocесelor. Însușirile nanomaterialelor se deosebesc principal de însușirile particulelor brute cu aceeași compoziție chimică, prezentând efectiv o punte de legătură între materialele brute și structurile atomice și moleculare. La scala nano proprietăți dependente de mărime sunt deseori observate, dimensiunea constituind un parametru-cheie ce
30 determină însușirile fizice și chimice ale nanoparticulelor [3, 4].

În calitate de cea mai apropiată soluție servește procedeu de cultivare clasică a tulpinii *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15 în cultură submersă cu utilizarea mediului selectat anterior cu următoarea componență (%): tărâțe de grâu – 2,0, făină de soia – 1,0, CaCO_3 – 0,2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1, apă potabilă până la 1L, pH 6,25
35 realizat în baloane Erlenmayer, pe agitatoare rotative (180...200 rot/min) la temperatura de 28...30°C în decurs de 240 ore [5].

Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al tulpinii, iar biosinteza enzimelor proteolitice nu atinge valoarea maximă.

40 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15, aplicarea căruia asigură sporirea biosintezei proteazelor acide și neutre, ce contribuie la hidroliza mai profundă a substanțelor proteice și la lărgirea sferei de aplicare practică a preparatului.

45 Procedeu de cultivare a tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* CNMN-FD-15 prevede obținerea suspensiei de spori prin cultivarea acesteia pe un mediu de malț-agar inclinat timp de 12...14 zile, adăugarea în condiții sterile a nanoparticulelor de ZnO cu dimensiunile de 29 nm în concentrație de 0,005% cu agitare în decurs de 1...2 min, inocularea suspensiei într-un mediu nutritiv în cantitate de 10% vol. și cultivarea
50 submersă la temperatura de 28...30°C cu agitare continuă la 180...200 rot/min în decurs de 240 ore, totodată mediul nutritiv conține, g/L: tărâțe de grâu – 2,0, făină de soia – 1,0, CaCO_3 – 0,2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1 și apă potabilă restul.

Rezultatul invenției constă în sporirea nivelului de biosinteză a două tipuri de proteaze sintetizate de micromiceta *Trichoderma koningii* CNMN-FD-15: a proteazelor
55 acide cu 83,7...87,6% (cca de 2x), a celor neutre cu 342,7...350,8% (de 4,4...4,5x), precum și păstrarea activității proteazelor alcaline și amilazelor satelit la nivelul celei mai apropiate soluții.

Efectul biostimulator al nanoparticulelor se datorează însușirilor distincte unice în dependență de dimensiuni la scala nano, exprimate în viteză mare de mișcare, capacitate excepțională de penetrare a peretelui și membranelor celulare, suprafață specifică mare la o unitate de masă ce sporește capacitatea de adsorbție, reactivitatea chimică și potențialul catalitic, ce oferă o platformă deosebită în modelarea proceselor de biosinteză a principiilor bioactive la fungii miceliali.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Suspensia de spori a culturii de *Trichoderma koningii* CNMN-FD-15, crescută timp de 12...14 zile pe suprafețe oblice de malț-agar și pregătită prin spălarea cu apă distilată sterilă, se supune în condiții sterile tratării cu nanoparticule de oxid de zinc – nano ZnO (29 nm) în cantitate de 0,005% cu agitare riguroasă timp de 1...2 min manual sau pe agitator.

Ulterior, materialul semincer tratat, în concentrație de 10% V/V, se inoculează în mediul nutritiv steril cu următoarea componență (%): tărâțe de grau – 2,0, făină de soia – 1,0, CaCO₃ – 0,2, (NH₄)₂SO₄ – 0,1, apă potabilă până la 1 L, pH 6,25. Cultivarea tulpinii se realizează în baloane Erlenmayer de 0,75 L cu 0,2 L mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă, pe agitatoare rotative (180...200 rot/min) la temperatura de 28°C, durata cultivării 240 ore.

Activitatea maximă a proteazelor acide (pH 3,6) și neutre (pH 7,4), determinată prin metoda Anson după acțiunea asupra cazeinatului de sodiu, în condițiile enunțate a fost înregistrată la concentrația de 50 mg de nano-ZnO cu dimensiunile de 29 nm și constituie 49,42 u/mL și, respectiv, 283,68 u/mL, fiind cu 83,7% (cca 2x) și 442,7% (4,4x) superioară variantei de control (26,90 u/mL și 64,08 u/mL) (vezi tabelul).

Tabel

Modificarea activității proteazelor acide și neutre la micromiceta *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15 în funcție de concentrația nano-ZnO (29 ± 5 nm)

Variante	Concentrația,%	Proteaze acide		Proteaze neutre	
		u/mL	%	u/mL	%
Nano-ZnO* (29 nm)	0,001	30,34	112,8	76,83	119,9
	0,005	49,42	183,7	283,68	442,7
	0,010	46,48	172,8	265,35	414,1
Cea mai apropiată soluție	-	26,90	100	64,08	100

*Sinteza sonochimică a nanoparticulelor ZnO/PVP.

Pentru efectuarea sintezei nanoparticulelor de ZnO/PVP în prealabil au fost pregătite două soluții: 0,44 g (0,02 mol) Zn (CH₃COOH)₂ · 2H₂O dizolvate în 30 mL de metanol și 0,08 g PVP Ms PVP = 8000 dizolvate în 20 mL de metanol, care apoi au fost amestecate și agitate timp de 10 min cu ajutorul unui agitator magnetic. După aceasta amestecul a fost plasat într-un pahar Erlenmayer cu condensator de reflux, apoi, prin picurare, în amestec s-au introdus 10 mL de soluție (0,04 moli) de KOH în metanol. Sinteza s-a efectuat la temperatura de 60°C timp de 14 ore sub influența constantă a ultrasunetului (38 kHz). Precipitatul alb, format în urma sintezei, a fost centrifugat la 2000 rot/min, spălat repetat cu etanol și acetonă, apoi uscat la temperatura de 100 °C. Randamentul sintezei este de 66%.

Produsul obținut a fost examinat prin diverse metode: difracția de raze X (DRX), spectroscopia IR, analiza de absorbție atomică.

Compoziția chimică a fost determinată prin analiza absorbției atomice

Pentru ZnO/PVP: Găsit, %: Zn – 79,75, O – 19,78, C – 0,32, N – 0,070, H – 0,049.

Calculat, %: Zn – 79,84, O – 19,65, C – 0,39, N – 0,075, H – 0,049.

Analiza de fază a pulberii de ZnO a fost efectuată cu ajutorul difractometrului DRON-UM (metoda $\Theta - 2\Theta$, Fe-K α - radiația, $\lambda = 1,93604$ Å). Au fost observate următoarele picuri de difracție pentru $2\Theta = 40,19^\circ, 43,64^\circ, 46,05^\circ, 60,80^\circ, 73,04^\circ$ și $81,90^\circ$ ce corespund fazei hexagonale a nanoparticulelor de ZnO grupa spațială P63mc,

$a = 3,249 \text{ \AA}$, $c = 5,206 \text{ \AA}$). Dimensiunile nanoparticulelor de ZnO calculate după semilărgimea picurilor de difracție sunt de $29 \pm 5 \text{ nm}$.

În spectrele IR a fost observată o deplasare a benzii de absorbție a grupului carbonilic C = O de la 1645 cm^{-1} pentru PVP pur la $1559,9 \text{ cm}^{-1}$ pentru sistemul ZnO/PVP ($M_s = 8000$). Acest lucru poate fi rezultatul interacțiunii dintre oxigenul grupului carbonilic și ionii de zinc. De asemenea s-a observat o schimbare și pentru banda 1341 cm^{-1} responsabilă pentru legătura N-C, care se deplasează spre lungimi de undă mai scurte în ZnO/PVP ($M_s = 8000$). Picul îngust de absorbție centrat la 1409 cm^{-1} se referă la conexiunea C-H în PVP.

Activitatea proteazelor alcaline (pH 9,0) a constituit $60,4 \text{ u/mL}$; activitatea α -amilazelor, determinată după gradul de hidroliză a amidonului a constituit $20,5 \text{ u/mL}$ pentru amilazele acidulabile (pH 4,7) și $38,2 \text{ u/mL}$ pentru cele acidstabile (pH 2,5), aceste valori se înscriu în limitele nivelului celei mai apropiate soluții.

Exemplul 2

Tulpina *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN-FD-15 a fost cultivată în baloane Erlenmayer cu capacitatea de $0,5 \text{ L}$, cu $0,1 \text{ L}$ mediu nutritiv la temperatura de 30°C , celelalte condiții fiind echivalente cu cele din exemplul 1.

Activitatea maximă a proteazelor acide (pH 3,6) și neutre (pH 7,4), determinată prin metoda Anson după acțiunea asupra cazeinatului de sodiu, în condițiile enunțate pentru $0,005\%$ de nano-ZnO cu dimensiunile de 29 nm a constituit $52,90 \text{ u/mL}$ și, respectiv, $295,73 \text{ u/mL}$, ce este cu $87,6\%$ (cca $2x$) și $350,8\%$ ($4,5x$) superioară variantei celei mai apropiate soluții ($28,2 \text{ u/mL}$ și $65,6 \text{ u/mL}$).

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. 1975, Москва, Агропромиздат, p. 325-327
2. MD 4234 B1 2013.06.30
3. Robert Walisko, Rainer Krull. Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganism for industrial bio-production. Biotechnol Lett. 2012, 34:1975-1982 DOI 10.1007/s10529-012-0997-1
4. Habib Driouch, Andreas Roth, Petra Dersch, Christoph Wittmann. Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. Appl Microbiol Biotechnol (2010) 87:2011-2024 DOI 10.1007/s00253-010-2661-9
5. MD 4285 B1 2014.05.31

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare a tulpinii de fungi *Trichoderma koningii* CNMN-FD-15, care prevede obținerea suspensiei de spori a tulpinii crescute timp de $12 \dots 14$ zile pe un mediu de malț-agar înclinat, adăugarea în condiții sterile a nanoparticulelor de ZnO cu dimensiunile de 29 nm în concentrație de $0,005\%$ cu agitare în decurs de $1 \dots 2 \text{ min}$, inocularea suspensiei într-un mediu nutritiv în concentrație de $10\% \text{ vol.}$ și cultivarea submersă la temperatura de $28 \dots 30^\circ\text{C}$ cu agitare continuă la $180 \dots 200 \text{ rot/min}$ în decurs de 240 ore , totodată mediul nutritiv conține, g/L: tărâțe de grâu – $2,0$, făină de soia – $1,0$, CaCO_3 – $0,2$, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ – $0,1$ și apă potabilă restul.

Șef Direcție Brevete:

GUȘAN Ala

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

DUBĂSARU Nina