

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare submersă a tulpinii de funghi miceliali *Aspergillus niger* CNMN FD 01.

Lipazele microbiene prezintă un potențial enorm în domeniul tehnologiilor alimentare, pentru medicină, în industria chimică și farmaceutică [1].

În calitate de perspectivă producători de lipaze exocelulare frecvent se utilizează tulpini de micromicete de genurile *Aspergillus* și *Rhizopus*, care sintetizează enzime lipolitice cu nivel diferit de activitate și specificitate de acțiune. Lipaze „nespecifice” (tulpini de genul *Aspergillus*) îndeplinesc scindarea deplină a trigliceridelor în acizi grași și glicerină. Lipazele „specifice” (tulpini de genul *Rhizopus*) se caracterizează prin scindarea acizilor grași din poziție extremă a catenelor moleculei de glicerină. Diferența dintre însușirile fizico-chimice ale lipazelor sintetizate oferă posibilități de utilizare ale tulpinilor de genurile *Aspergillus* și *Rhizopus* în scopuri biotehnologice diferite [2].

O concepție inovativă în obținerea biotehnologică a lipazelor microbiene este utilizarea nano-particulelor în calitate de factori stimulatori și reglatori ai proceselor biosintetice ale microorganismelor [3].

În calitate de soluție proximă servește procedeul de cultivare submersă clasică a tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 01 cu utilizarea mediului cu următoarea compoziție, g/L: făină de soia – 35,0, K_2HPO_4 – 5,0, $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0, apă potabilă – până la 1 litru, pH-ul inițial 7,2, sterilizat în autoclavă la 1 atm timp de 1 oră. În mediu se inoculează 5 ml de suspensie apoasă de spori ale fungilor *Aspergillus niger* cu concentrația de $10^6 \dots 10^7$ spori/mL. Cultivarea are loc în camere termostate la temperatura de 28...30°C în decurs de 4 zile în condiții de agitare continuă. Activitatea lipolitică a lichidului cultural după 4 zile de cultivare constituie 20500...23250 U/mL [4].

Dezavantajele acestor soluții constau în faptul că nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al tulpinii, precum și biosinteza enzimelor lipolitice nu atinge valoarea maximă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în propunerea unui procedeu de cultivare submersă a tulpinii de funghi *Aspergillus niger* CNMN FD 01, aplicarea căruia intensifică biosinteza enzimatică și asigură sporirea activității lipazelor.

Procedeul de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus niger* CNMN FD 01, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că include obținerea suspensiei de spori a tulpinii crescute timp de 14 zile pe un mediu de malț-agar înclinat, inocularea suspensiei în concentrație de 10 % vol. într-un mediu nutritiv cu pH-ul 7,2, care conține, g/L: făină de soia – 35,0, K_2HPO_4 – 5,0, $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0 și apă potabilă restul și cultivarea la temperatura de 28...30°C cu agitare continuă în decurs de 96 ore. Suspensia de spori, înainte de inoculare, se tratează cu nano-particule de dioxid de titan TiO_2 cu dimensiunile de 40 nm în concentrație de 0,0010 %.

Recent este demonstrat că însușirile nanomaterialelor se deosebesc principial de însușirile particulelor brute cu aceeași compoziție chimică, dimensiunea constituind un parametru-cheie ce determină însușirile fizice și chimice ale nano-particulelor.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea nivelului de biosinteză al lipazelor sintetizate de micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 01 cu 55,3...57,5 % față de soluția proximă.

Efectul biostimulator al nano-particulelor este cauzat de însușirile distincte ale acestora, atribuite, în special, de dimensiunea lor nanometrică, care este exprimată în viteză mare de mișcare și capacități unice de penetrare ale membranelor și peretelui celular, și de suprafața specifică mare la o unitate de masă, fapt ce sporește capacitatea de absorbție, reactivitatea chimică și potențialul catalitic.

Exemple de realizare ale invenției

Exemplul 1

Tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 01 a fost cultivată în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 0,75 L, care conțineau 0,2 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție (g/L): făină de soia – 35,0, K_2HPO_4 – 5,0, $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0, apă potabilă până la 1 L, pH – 7,2. Mediul nutritiv se inoculează cu suspensie de spori în cantitate de 10 % v/v, obținută prin spălare cu apă distilată sterilă a culturii de 14 zile, crescută pe suprafețe înclinate de malț-agar și supusă în condiții sterile tratării cu nano-particule de dioxid de titan TiO_2 cu dimensiunile de 40 nm în concentrație de 0,0005 %, 0,0010 %, 0,0015 % și agitare riguroasă timp de 1...2 minute manual sau pe agitator.

Cultivarea tulpinii s-a realizat în condiții de agitare continuă (180...200 rot·min⁻¹) timp de 96 ore la temperatura de 28°C.

Activitatea maximă a lipazelor, determinată prin metoda modificată Otto-Yamad, după gradul de hidroliză a uleiului de măsline în soluție de alcool polivinilic până la acidul oleic, în condițiile enunțate a fost înregistrată la concentrația de 0,0010 % (10 mg/L de mediu nutritiv) de nano- TiO_2 cu dimensiunile de 40 nm și constituie 33862 U/mL comparativ cu 21500 U/mL în soluția proximă, sporul activității lipolitice constituind 57,5 % (v. tabelul).

Modificarea activității lipolitice la micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 01 în prezența nano- TiO_2 (40 nm)

Tabelul

Varianta	Concentrația, %	Activitatea lipolitică	
		u/mL	%
Nano- TiO_2 (40 nm)	0,0005	26790	124,6
	0,0010	33862	157,5
	0,0015	29110	135,4
Proxim	-	21500	100,0

Sinteza nano-particulelor TiO_2

Nano-particulele de TiO_2 au fost obținute prin metoda hidrotermală. Pentru aceasta 0,2 g de alcool polivinilic se dizolvă în 50 mL de alcool etilic, apoi la soluția dată se adaugă 2 mL de izopropoxid de titan și se agită timp de 1 oră, după ce amestecul obținut se introduce în autoclavă și se tratează la $T = 220^\circ\text{C}$ timp de 2 ore. După autoclavare precipitatul se spală, se usucă la 80°C timp de 2 ore și se supune caracterizării XRD, SEM-EDAX.

Din imaginea SEM se observă că nanomaterialele de TiO_2 obținute prin metoda hidrotermală sunt alcătuite din particule de formă sferică de diferite dimensiuni. Dimensiunea medie a particulelor calculată din XRD este în jur de 40 nm.

Determinat, %: Ti 48,14; C 12,37; H 5,24; O 34,25;

Calculat, %: Ti 49,03; C 13,47; H 4,14; O 33,36.

Exemplul 2

Tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 01 a fost cultivată în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 0,5 L cu 0,1 L mediu nutritiv la temperatura de 30°C , celelalte condiții fiind echivalente cu cele din Exemplul 1.

Activitatea maximă a lipazelor, determinată prin metoda modificată Otto-Yamad, după gradul de hidroliză a uleiului de măsline în soluție de alcool polivinilic până la acidul oleic, în condițiile enunțate pentru 0,0010 % de nano- TiO_2 cu dimensiunile de 40 nm a constituit 35330 U/mL, comparativ cu 22750 U/mL în soluția proximală, înscriind o sporire a activității lipazelor cu 55,3 %.