



**C12N 1/16** (2006.01),  
**A01N 63/04** (2006.01),  
**A01N 63/02** (2006.01),  
**C05F 1/08** (2006.01),  
**C12R 1/865** (2006.01)

(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01382**

(22) Data de depozit: **21.12.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27.02.2015** BOPI nr. **2/2015**

(41) Data publicării cererii:  
**29.06.2012** BOPI nr. **6/2012**

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL DE CERCETARE-  
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA  
PLANTELOR,**  
*BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO*

(72) Inventatori:  
• **OANCEA FLORIN,** *STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;*

• **ȘTEFAN AURORA LILIANA,**  
*BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*  
• **LUPU CARMEN,** *INTRAREA BÂRSEI  
NR.5, BL.G 3, SC.A, ET.2, AP.24,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO 125071 B1; WO 03/020905 A2**

(54) **TULPINĂ DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE CU  
ACTIVITATE ANTAGONISTĂ ȘI FERMENTATIVĂ**



# RO 127523 B1

1 Inventția se referă la o tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae*, cu activitate  
2 antagonistă și fermentativă, depozitată cu numărul DSM 23648, care prezintă activitate  
3 antagonistă față de agenții fitopatogeni producători de micotoxine și capacitate de fermentare  
4 alcoolică, și care este destinată producerii concomitente de bioetanol și de bioproduse,  
5 pentru protecția plantelor din cereale contaminate cu micotoxine.

6 Sunt cunoscute mai multe tipuri de drojdii antagoniste ciupercilor fitopatogene și  
7 toxigene, care infectează cerealele în timpul vegetației și contaminatează recolta cu mico-  
8 toxine. **US 6562337** descrie diferite tulpini de drojdii, *Torula aurea* (NRRL Y-30213), o drojdie  
9 neidentificată (NRRL Y-30214), *Torula* sp. (NRRL Y-30215) și *Cryptococcus nodaensis*  
10 (NRRL Y-30216) antagoniste față de ciupercile fitopatogene și toxigene din grupul *Fusarium*  
11 *graminearum*, care produc înroșirea spicului. Autorii au revenit și au reclasificat tulpinile  
12 precum *Cryptococcus aureus* (NRRL Y-30213 și NRRL Y-30215) și *Cryptococcus flavescens*  
13 (NRRL Y-30216) (Dunlap *et al.*, 2007, *FEMS Yeast Res.* 7:449-458). **US 7570193** descrie  
14 tulpina WRL-076 de *Pichia anomala* (număr de depozit NRRL Y-30842), care are acțiuni  
15 antagonistă față de ciupercile toxigene din grupul *Aspergillus flavus*, care pot infecta  
16 porumbul în timpul vegetației, contaminând recolta cu aflatoxine. **US 7601346** descrie tulpina  
17 AS55.2 de *Aureobasidium pullulans* (NRLL Y-50291), care este antagonistă față de  
18 *Fusarium graminearum*. **RO 125071 B1** se referă la tulpina de drojdie *Saccharomyces*  
19 *cerevisiae*, antagonistă față de agenți microbiologici de dăunare, utilizată pentru protecția  
20 fructelor depozitate, pe bază de drojdii antagoniste. Aceasta se prezintă sub formă de colonii  
21 alungite, fără bordură, de culoare crem, aderente, cremoase, și este depozitată cu numărul  
22 Y 001350, în colecția internațională de microorganisme din Budapesta, Ungaria, NCAIM  
23 (National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms). **WO 03/020905 A2**  
24 cuprinde identificarea și izolarea genelor care conferă proprietăți de combatere a bolilor la  
25 plante. Aceste gene sunt derivate din diferite surse, printre care și *Saccharomyces*  
26 *cerevisiae*. Controlul conferit este împotriva uneia sau mai multor boli provocate de agenți  
27 fitopatogeni precum: *Aspergillus flavus*, *Cercospora zea-maydis*, *Fusarium moniliforme*,  
28 *Fusarium graminearum*, *Helminthosporium maydis*, *Phoma lingam*, *Phomopsis helianthi*,  
29 *Phytophthora infestans*, *Pyricularia oryzae*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia*  
30 *sclerotiorum*, *Ustilago maydis*, și *Verticillium dahliae*.

31 Nu s-au descris până în prezent tulpini de drojdii care să prezinte concomitent anta-  
32 gonism față de ciupercile fitopatogene și toxigene, rezistență la micotoxinele produse de  
33 aceste ciuperci, capacitate de a fermenta hidrolizatele de cereale contaminate cu micotoxine  
34 și rezistență bună la șocurile osmotice. Astfel de tulpini ar fi utile pentru valorificarea com-  
35 plexă a cerealelor contaminate cu micotoxine în timpul vegetației, peste limita maximă admi-  
36 sibilă, prin fermentarea plămezilor obținute prin solubilizarea/fluidificarea și zaharificarea  
37 măcinșului de cereale contaminate cu micotoxine. Biomasa de drojdii antagoniste, copro-  
38 dusă în astfel de sisteme de fermentație alcoolică, ar reprezenta o materie primă valoroasă  
39 pentru biopesticide/amelioratori de sol, active față de speciile toxigene de ciuperci  
40 fitopatogene și toxigene.

41 Tulpina L30b de *Saccharomyces cerevisiae*, depozitată cu numărul DSM 23648, la  
42 Autoritatea de Depozit Internațională DSMZ, conform invenției, este puternic antagonistă față  
43 de mai multe ciuperci producătoare de micotoxine și, în special, față de cele care produc  
44 înroșirea grâului și contaminatează recolta cu fusariotoxine, are o ridicată capacitate de fer-  
45 mentare a hidrolizatelor de cereale, inclusiv a celor care sunt contaminate cu micotoxine și,  
46 în particular, fusariotoxine, este eficientă în reducerea dezvoltării și sporulării ciupercilor  
47 fitopatogene și toxigene, și își păstrează aceste caracteristici și după ce realizează fermenta-  
48 ția alcoolică.

# RO 127523 B1

Tulpina L30b de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , depozitată cu numărul DSM 23648, prezintă următoarele avantaje:	1
- creștere bogată pe mediile uzuale, utilizate pentru cultivarea drojdiilor;	3
- rezistență mare la uscăre și la concentrații ridicate de alcool, ca urmare a selecției prin șoc osmotic;	5
- randament de fermentare alcoolică și productivitate orară, corespunzătoare utilizării practice.	7
Tulpina L30b de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , depozitată cu numărul DSM 23648, la Autoritatea de Depozit Internațională DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germania), este antagonistă față de o serie de ciuperci fitopatogene și toxigene, inclusiv față de cele care produc boli ale cerealelor, și are capacitatea de a produce fermentație alcoolică prin cultivare anaerobă pe hidrolizatele de cereale, inclusiv pe cele contaminate cu micotoxine.	9 11 13
În continuare, se dă un exemplu de realizare a invenției.	
<b>Exemplu.</b> Tulpina de drojdie antagonistă <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L30b a fost izolată de pe struguri din zona Prahova, România. Pentru izolarea primară, s-a utilizat mediul de cultură: glucoză 5%, acid tartaric 0,5% (pH puternic acid = 2,5) și agar 2%. Coloniile cu aspect de drojdie au fost apoi supuse șocului osmotic. S-au folosit diferite concentrații de glicerol în apă, pentru a se obține soluții cu activitatea apei de 0,881, 0,780, 0,648; activitatea apei în aceste soluții a fost verificată cu un aparat Aqualab (Decagon Service, SUA). Din coloniile cu aspect de drojdie, s-au realizat suspensii în tampon fiziologic salin, care au fost echilibrate cu soluțiile de șoc osmotic, prin echilibrare pe baie de apă la 25°C. Șocul osmotic a fost realizat prin injectarea rapidă a 50 μl de suspensie de drojdie în 950 μl de soluție de șoc osmotic. După trei minute, s-au reluat 100 μl din suspensia supusă șocului osmotic, care au fost trecute pe o soluție de glicerol 0,51% ( $a_w = 0,993$ ). Microorganismele care au supraviețuit șocului osmotic au fost cultivate pe mediul YPGA (glucoză 20 g, peptonă 10 g, extract de drojdie 5 g, agar 20 g și apă distilată sterilă 1000 ml) și purificate prin reluarea pe mediu YPGA a coloniilor izolate. Pentru identificarea tulpinii L30b, s-au folosit caracteristicile morfologice, fiziologice și moleculare (secvența 26S rDNA D1/D2).	15 17 19 21 23 25 27 29
Tulpina de drojdie antagonistă L30b se prezintă sub formă de colonii alungite, fără bordură, de culoare crem, aderente, cremoase, iar pe mediul nutritiv, se asigură obținerea unei densități celulare de peste $7,5 \times 10^9$ ufc/ml. Caracterile morfologice ale tulpinii L30b sunt următoarele: colonia: forma: alungită, fără bordură; aspectul suprafeței: netedă, aderentă; transparență: translucidă; consistență: cremoasă; culoarea: crem. Celule: forma: ovale-rotunde; aranjament: în perechi; culoarea pe agar: crem; suprafața pe agar: strălucitoare; textura pe agar: moale. Diviziunea celulară: înmugurire: multipolară; fisiunea: absentă. Creșterea filamentelor: pseudomiceliu: absent; miceliul: absent; conexiuni de fixare: absente. Spori asexuali: balistospori: absenți; artrospori: absenți; clamidospori: absenți. Spori sexuali: ascospori: prezenți; forma ascospori: rotundă; pereți ascospori: netezi; forma asca: ovală; conjugarea: prezentă; teliospori: absenți. În conformitate cu cheia de determinare morfologică la nivel de specie adaptată după Stelling-Dekker, tulpina L30b a fost identificată ca fiind <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	31 33 35 37 39 41
Caracterile fiziologice ale tulpinii de drojdie antagonistă L30b sunt: temperatura de dezvoltare: optimă 30°C, minimă 6°C, maximă: 40°C. Fermentația semianaerobă: glucoză, galactoză, sucroză, maltoză, rafinoză = utilizare pozitivă (+); lactoză, melinioză, amidon solubil = nu se dezvoltă cultura (-). Utilizarea aerobă și creșterea (ca singura sursă de azot): $\text{NH}_4\text{2SO}_4$ : utilizare pozitivă (+). $\text{KNO}_3$ , etilamină: nu se dezvoltă cultura (-). Utilizarea aerobă și creșterea: glucoză, galactoză, sucroză, maltoză, trehaloză, melizitoză, etanol, glicerol = utilizare pozitivă (+); celobioză, lactoză, melibioză, inulină, amidon solubil, xyloza; D arabinosa, riboza, eritritol, manitol, sorbitol, acid succinic = nu se dezvoltă cultura (-). Caracteristicile fiziologice sunt specifice tulpinilor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	43 45 47 49 51

# RO 127523 B1

1 Identificarea pe baza secvenței 26S rDNA D1/D2 s-a realizat prin aplicarea unui  
2 protocol de lucru, caracterizat prin următoarele etape: obținerea de culturi pure - colonii  
3 izolate, tehnica însămânțării prin epuizarea ansei; extracția ADN-ului din drojdii; electroforeză  
4 în gel pentru detectarea ADN-ului; amplificarea secvenței 26S rDNA D1/D2 prin tehnica PCR  
5 și electroforeză în gel; purificarea ADN-ului care codifică pentru 26S rDNA D1/D2; amplifi-  
6 carea enzimatică a acizilor nucleici înainte de secvențializare; precipitarea și uscarea ADN-  
7 ului, codificând pentru 26S rDNA D1/D2. Secvențierea nucleotidică a fost realizată cu  
8 metoda *Dye Terminator Cycle Sequencing* (Perkin Elmer, 1998), folosind un secvențiator  
9 automat de tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). Secvențele au fost analizate folosind pro-  
10 gramul *CHROMAS 2.33* (Technelysium Pty Ltd). Compararea secvențelor 26S rDNA D1/D2,  
11 obținute, cu secvențele existente în Banca de gene NCBI (National Center for Biotechnology  
12 Information) s-a realizat cu ajutorul programului BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

13 Secvența D1/D2, pentru L30b:  
14 AAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGG  
15 CAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAG  
16 GGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGG  
17 GTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGT  
18 CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAAT  
19 ATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGA ACTT  
20 TGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCA  
21 GACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCAC  
22 TGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTC  
23 GGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGT  
24 AAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGA

25 Identificarea speciei: *Saccharomyces cerevisiae* (100% secvența D1/D2). Identifica-  
26 rea tulpinii de drojdie antagonistă L30b la nivel de specie, ca fiind *Saccharomyces*  
27 *cerevisiae*, a fost confirmată cu numărul D4481, de către serviciul de identificare de la  
28 National Collection of Yeast Cultures din Norwich, Marea Britanie. Condițiile pentru depozi-  
29 tare, pe termen lung, pentru tulpina L30b, sunt liofilizare sau crioprezervare (păstrare în azot  
30 lichid sau înghețare mecanică, la temperaturi cuprinse între - 80 și -135°C). Pentru testarea  
31 viabilității, celulele de drojdie dintr-o eprubetă sunt repicate pe mediul YPGA și sunt cultivate  
32 timp de trei zile, la temperatura de 30°C. Alternativ, o suspensie provenită dintr-o eprubetă  
33 cu drojdie este testată microscopic în vederea cuantificării viabilității celulelor (hemacitometru  
34 + violet metil/albastru de metilen) și se consideră viabile, dacă mai mult de 90% dintre celule  
35 nu sunt colorate).

36 Tulpina L30b prezintă antagonism semnificativ *in vitro* față de mai multe ciuperci pro-  
37 ducătoare de micotoxine (tabelul 1) și, în special, față de cele care produc înroșirea grâului  
38 și contaminează recolta cu fusariotoxine, inclusiv deoxinivalenol.

Tabelul 1

41 *Antagonismul tulpinii de drojdie Saccharomyces cerevisiae L30b, numărul DSM 23648,*  
42 *față de ciuperci fitopatogene, producătoare de micotoxine*

Fitopatogene/micotoxine	coeficient x 4 zile*	coeficient x 8 zile*	Comportare la 8 zile
<i>Fusarium graminearum</i> DSM 4527/ fusariotoxine - trichotecene - DON	0,1	0,2	Puternic antagonist (PA)
<i>Fusarium graminearum</i> DSM 67638/ fusariotoxine - trichotecene - DON	0,1	0,1	Puternic antagonist (PA)
<i>Fusarium culmorum</i> , CBS 250.52/ fusariotoxine - trichotecene - DON	0,1	0,2	Puternic antagonist (PA)

Tabelul 1 (continuare)

Fitopatogene/micotoxine	coeficient x 4 zile*	coeficient x 8 zile*	Comportare la 8 zile
<i>Fusarium verticilloides</i> CBS 119825/ Fusariotoxine - fumonisine	0,2	0,2	Puternic antagonist (PA)
<i>Fusarium verticilloides</i> ATCC 38932/ Fusariotoxine - fumonisine	0,1	0,2	Puternic antagonist (PA)
<i>Aspergillus flavus</i> F.00048/aflatoxine	0,3	0,4	Antagonist (A)
<i>Penicillium expansum</i> F.00601/patulina	0,2	0,2	Puternic antagonist (PA)

\* Antagonism (A) cu atât mai puternic (PA) cu cât valorile coeficientului x sunt mai apropiate de valoarea 0; calcularea coeficientului x s-a realizat pe baza raportului dintre razele interne (i) și externe (e) ale ciupercii test (A) și a drojdiei (B), după formula :  $x = iA/iB \times eB/Ea$ .

Capacitatea de fermentare a hidrolizatelor de cereale contaminate cu micotoxine a fost testată pe un hidrolizat realizat din făină de grâu contaminată cu deoxinivalenol (DON) la un nivel de 1400  $\mu\text{g/kg}$ , nivel peste limita admisibilă de 1,2 ppm. Într-un vas de reacție din inox, prevăzut cu manta rezistentă la abur, 1 bar, 121°C, de 10 l, s-au adus 1360 g făină de grâu, conținând circa 818 g amidon, care au fost dispersate cu 3 l apă distilată, amestecându-se până la formarea unei paste. Vasul de reacție, conținând pasta de făină de grâu, a fost menținut, timp de 5 min, la 105°C, pentru a se produce gelatinizarea amidonului. După autoclavare, flaconul a fost răcit la 95°C și incubat la această temperatură. În pasta de făină de grâu la 95°C, s-au adăugat 5 g de  $\mu$ -amilază bacteriană (activitate enzimatică > 1500 U/kg), 3 ml soluție dintr-o soluție 1 mM de clorură de calciu (conținând 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  per ml, respectiv, 4 mg de ioni de calciu, pentru 100 g de pastă de amidon = 40 mg/kg = 40 ppm  $\text{Ca}^{2+}$ ). Suspensia gelifiată a fost incubată la 95°C, timp de două ore. La sfârșitul perioadei de incubare, s-a verificat solubilizarea amidonului, adăugând peste 2,3 ml suspensie fluidizată, răcită la temperatura camerei, 0,1 ml soluție de iod în iodură de potasiu (preparată prin dizolvarea a 2 g iod și 5 g iodură de potasiu în 100 ml apă distilată). Cu această soluție de iod, amidonul formează o culoare albastră specifică, iar maltodextrinele rezultate prin solubilizarea amidonului/fluidificarea suspensiei de făină gelifiată generează o culoare roșie care a cărei intensitate descrește cu gradul de hidroliză. Soluția rezultată prin fluidificarea făinii de grâu a fost răcită la 55°C și s-au adăugat 7,5 ml de amiloglucozidază fungică (activitate enzimatică > 2000 U/kg). S-a incubat timp de opt ore, pentru zaharificare; la final, s-au prelevat probe de 1 ml, în care s-au determinat grupările reducătoare cu reactiv DNS. Soluția de zaharuri fermentescibile, rezultată, a fost adusă la 6000 ml, cu apă distilată, pentru a se obține o soluție conținând 150 g/l. Peste cei 6000 ml apă distilată, s-au adus 300 ml *Saccharomyces cerevisiae* L30b, suspensie conținând  $10^7$  ufc/ml. S-a procedat la fermentare, timp de 42 h, după care drojdiile au fost separate și retestate din punctul de vedere al antagonismului față de o tulpină de *Fusarium graminearum* DSM 4527, producătoare de deoxinivalenol DON.

S-a constatat că tulpina de drojdie și-a menținut capacitatea antagonistă *in vitro*. În cursul fermentației, au fost monitorizați principalii parametri specifici, respectiv, concentrația de etanol (și parametrii derivați precum randamentul și productivitatea volumetrică) și concentrația de glucoză (determinată prin lichid cromatografic), și numărul de drojdii încapsulate, determinate prin tehnica unităților formatoare de colonii, după realizarea primei diluții în soluție 2% citrat de sodiu, pentru a dizolva gelul de alginat de calciu. Condițiile analizei lichid cromatografice, prin care s-a determinat simultan concentrația de alcool și de glucoză, au fost: Sistem Agilent 1290 Infinity LC, coloană Hi-Plex H 8  $\mu\text{m}$ , 300 x 7,7 mm, p/n: PL1170-6830; eluent: acid sulfuric 5 mM; gradient isocratic: flux de 0,7 ml/min, volum injectat 20  $\mu\text{l}$ , temperatură 60°C, presiune 4,6 MPa (46 bari), detector cu indice de refracție, menținut la 55°C. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Evoluția unor parametri specifici fermentației hidrolizatului de făină de grâu, contaminat cu DON, prin utilizarea drojdiilor antagoniste L30b

Timp de fermentație	25	40
Concentrație de etanol (%g/g)	7,64	9,05
Randament etanol (g/g)	0,42	0,53
Productivitate volumetrică (g/l/h)	3,03	0,51
Concentrație glucoză	89,2	3,64
Număr celule drojdie ( $\times 10^9$ ufc)	0,52	7,25

Rezultatele din tabelul 2 arată o capacitate ridicată de fermentare a hidrolizatelor de cereale contaminate cu micotoxine de către drojdiile antagoniste, în paralel cu o multiplicare semnificativă. A fost testată capacitatea drojdiei recuperate după fermentare, de a limita producerea de ascospori de către ciuperca *Fusarium graminearum* Schw. DSM 4527 (teleomorfa *Gibberella zea* Schw. Petch) pe substraturi solide. Ciuperca toxigenă, forma conidială, *F. graminearum*, a fost cultivată pe mediu înclinat cartof - glucoză - agar. După 7 zile de creștere, cultura a fost reluată în tampon fosfat salin, pH = 7,2, adusă la  $10^5$  ufc/ml și inoculată (0,1 ml/g) peste paie de grâu sterilizate prin autoclavare. Același tratament a fost aplicat și unor variante experimentale tratate aseptice (anterior, concomitent sau ulterior) cu drojdiile recuperate după fermentație (0,1 ml dintr-o suspensie  $10^5$  ufc/ml, pentru 1 g de paie) și cu inocul de reluat de pe mediu YEM agarizat, înclinat (inoculare 0,1 ml suspensie  $10^5$  ufc/ml per gram de paie).

Paiele au fost trecute apoi aseptice pe plăci Roux, închise cu dopuri de vată, care conțineau câte 5 g de vermiculit steril, umectat cu câte 5 ml de apă sterilă. Plăcile au fost incubate, timp de 21 zile, la 25°C și în lumină fluorescentă cu dominantă în UV apropiat (2 lămpi F40 BLB, două lămpi F40 CWX, Philips). Vermiculitul a fost reumectat de două ori pe săptămână. Captarea ascosporilor s-a realizat cu ajutorul unor lamele de microscop 25 x 75 mm, tratate cu silicon și plasate la 10 mm de gâtul plăcii Roux. După 21 de zile, s-a lăsat vermiculitul să se usuce timp de 5 zile, după care a fost reumectat abundent, cu 7 ml de apă sterilă. Această alternanță a favorizat ejectarea sporilor din apoteci. Sporii captați în uleiul silionic au fost numărați la microscop, pe 25% din suprafața lamelei. Fiecare variantă experimentală a fost realizată în trei repetiții, iar întregul experiment a fost repetat o dată. Datele au fost interpretate pe baza testului Friedman, pentru măsurări repetate. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3, de mai jos.

Tabelul 3

Influența aplicării suspensiilor de drojdie antagonistă *S. cerevisiae* L30b asupra producerii de ascospori de către *Fusarium graminearum* DSM 4527 (teleomorfa *Gibberella zea*)

Varianta experimentală	Ascospori ( $\times 10^5$ ) per $\text{cm}^2$ de substrat*	% față de martor
Martor, paie de grâu neinoculate cu microorganisme antagoniste, inoculare <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427, 0,1 ml suspensie $10^5$ ufc/ml per gram de paie	14,8 a	-
Preinoculat cu drojdiile L30b, recuperate după fermentație, 0,1 ml suspensie $10^5$ ufc/ml per gram de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427 $10^5$ ufc/ml per gram de paie	1,91 c	12,91%

Tabelul 3 (continuare)

Varianta experimentală	Ascospori (*10 <sup>5</sup> ) per cm <sup>2</sup> de substrat*	% față de martor
Inoculat concomitent cu drojdii L30b, recuperate după fermentație, 0,1 ml suspensie 10 <sup>5</sup> ufc/ml per gram de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427, 10 <sup>5</sup> ufc/ml per gram de paie	2,88 bc	19,46%
Postinoculat cu drojdii L30b, recuperate după fermentație, 0,1 ml suspensie 10 <sup>5</sup> ufc/ml per gram de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427, 10 <sup>5</sup> ufc/ml per gram de paie	5,17 b	34,93%
Preinoculat cu 0,1 ml suspensie L30b 10 <sup>5</sup> ufc/ml per gram de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427, 10 <sup>5</sup> ufc/ml per gram de paie	1,82 c	12,30%
Inoculat concomitent cu 0,1 ml suspensie L30b 10 <sup>5</sup> ufc/ml per gram de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427, 10 <sup>5</sup> ufc/ml per gram de paie	2,44 bc	16,49%
Postinoculat cu 0,1 ml suspensie L30b 10 <sup>5</sup> ufc/ml per gram de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427, 10 <sup>5</sup> ufc/ml per gram de paie	4,52 b	30,54%

\* Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru testul Friedman, la 0,05 nivel de încredere.

Rezultatele din tabelul 3 demonstrează că drojdia L30b este eficientă în reducerea dezvoltării și sporulării ciupercilor fitopatogene și toxigene *F. graminearum*, și că își păstrează aceste caracteristici și după fermentația alcoolică.

1

## Revendicare

3

Tulpină L30b de *Saccharomyces cerevisiae*, depozitată cu numărul DSM 23648, la Autoritatea de Depozit Internațională DSMZ, **caracterizată prin aceea că** este puternic antagonistă față de mai multe ciuperci producătoare de micotoxine și, în special, față de cele care produc înroșirea grâului și contaminează recolta cu fusariotoxine, are o ridicată capacitate de fermentare a hidrolizatelor de cereale, inclusiv a celor care sunt contaminate cu micotoxine și, în particular, fusariotoxine, este eficientă în reducerea dezvoltării și sporulării ciupercilor fitopatogene și toxigene, și își păstrează aceste caracteristici și după ce realizează fermentația alcoolică.

5

7

9



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 91/2015