

Invenția se referă la biotehnologii microbiene, în particular, la un mediu de cultivare a tulpinii de funghi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 și poate fi utilizată pentru obținerea preparatelor proteolitice cu largi aplicări în medicină, industria farmaceutică, producerea detergenților.

În tehnologia cultivării tulpinilor fungice producătoare de enzime proteolitice, în scopul sporirii biosintezei metaboliților secundari se utilizează diverse tehnici, inclusiv: modificarea componenței minerale a mediului de cultivare, selectarea inductorilor specifici ai sintezei proteazelor (ingrediente naturale cu conținut înalt de proteine – făină de fasole, făină de porumb, tărâțe de grâu etc.), și, în dependență de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii, diferiți biostimulatori (Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. М., Агропромиздат, 1975, p. 325-327).

În calitate de cea mai apropiată soluție s-a utilizat mediul nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 cu următoarea compoziție, %: tărâțe de grâu 2,0, făină de soia 1,0, CaCO₃ 0,2, (NH₄)₂SO₄ 0,1, restul apă de robinet, pH-ul inițial al mediului 6,25 [1].

Dezavantajul mediului constă în faptul că acesta nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al tulpinii, asigurând obținerea unor valori ale activității proteazelor neutre de maximum 51,03 U/mL.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu de cultivare submersă a tulpinii de funghi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMNF 15, care să asigure sporirea biosintezei proteazelor neutre.

Esența invenției constă în aceea că pentru cultivarea submersă a tulpinii de funghi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 se propune o variantă nouă de mediu nutritiv care suplimentar la componentele mediului cunoscut, în calitate de stimulator include unul dintre compușii coordinați ai Mn(II) izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat cu formula [Mn(is)(Cl)(tpt)(CH₃OH)]·CH₃OH (compusul I) sau diaqua-nitrato-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat cu formula [Mn(NO₃)(tpt)(H₂O)₂](NO₃) (compusul II), în următorul raport al componentelor, %: tărâțe de grâu – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO₃ – 0,2; (NH₄)₂SO₄ – 0,1; compusul coordinațiv [Mn(is)(Cl)(tpt)(CH₃OH)]·CH₃OH sau [Mn(NO₃)(tpt)(H₂O)₂](NO₃) - 0,0005...0,0010, restul apă potabilă, pH-ul inițial al mediului - 6,25.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea activității proteazelor neutre cu 84,9% și 40,9%, în cazul compusului I și, respectiv, II.

Efectul biostimulator pronunțat al compușilor coordinați utilizați asupra proteazelor neutre poate fi determinat de specificul structurii și activității ligandului 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină (tpt) în componența compușilor I și II, care datorită conținutului sporit de atomi de azot manifestă activități antioxidante și catalitice.

Avantajele invenției:

- creșterea activității proteazelor neutre;
- diversificarea preparatelor proteolitice după ponderea componentelor compexului enzimatic (în special, obținerea preparatelor îmbogățite cu proteaze neutre), în funcție de cerințele specifice ale domeniului de aplicare.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Tulpina *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 L, care conțineau 0,2 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție, %: tărâțe de grâu – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO₃ – 0,2; (NH₄)₂SO₄ – 0,1; [Mn(is)(Cl)(tpt)(CH₃OH)]·CH₃OH (I) – 0,0005-0,0015; restul apă de robinet; pH-ul inițial al mediului 6,25. Mediul nutritiv se însămânțează cu suspensie de spori și miceliu în cantitate de 5% v/v, obținută prin spălare cu apă distilată sterilă a culturii de 12-14 zile, crescută pe suprafețe înclinate de malț-agar. Cultivarea s-a realizat în condiții de agitare continuă la 180 rot./min, timp de 240 ore, la temperatura de 28°C.

Activitatea maximă a proteazelor în variantele optimizate de mediu, determinată în lichidul cultural prin metoda Anson după acțiunea asupra cazeinului de sodiu la pH-ul 7,4 s-a înregistrat în ziua a 9-a de cultivare, în varianta cu concentrația compusului I de 0,0005%, constituind 94,39 U/mL față de 51,03 U/mL în varianta control, ce depășește proba de referință cu 84,9%.

Tabel

Modificarea activității proteolitice a tulpinii de micromicete *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 sub influența compușilor I și II

Comp. coord.	Conc., mg/L	Proteaze neutre (pH 7,4)			
		a 9 zi		a 10 zi	
		U/mL	%	U/mL	%
I	5	94,39	184,9	61,38	440,9/120,3*
	10	79,41	155,6	61,38	440,9/120,3
	15	62,98	123,4	53,88	387,1/105,6
II	5	71,91	140,9	51,03	366,6/100,0
	10	55,49	108,7	49,43	355,1/96,9
	15	44,96	88,1	49,43	355,1/96,9
Martor	-	51,03	100,0	13,92	100,0

*Calcululele sunt efectuate în raport cu maxima de biosinteză a mediului martor - ziua a 9-a de cultivare.

Procedeu de preparare a izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat, $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ (I). S-a adăugat izobutiratul de Mn(II) (0,1 g, 0,43 mmoli), clorhidrat de 2-[bis(2-hidroxietil)amino]acetonitril (0,11 g, 0,61 mmoli) și 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină (0,06 g, 0,19 mmoli) în 8 ml metanol. Soluția obținută a fost pusă la ultrasunet timp de 30 minute, filtrată și lăsată într-un flacon acoperit timp de 4 zile. Cristalele de culoare cafenie, aciforme au fost filtrate și spălate cu metanol și uscate în aer. S-a determinat, %: C-51,84; H-5,02; N-15,39. Pentru $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ (I), $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{ClMnN}_6\text{O}_4$, s-a calculat, %: C-52,04; H-4,91; N-15,17. Spectrul infraroșu: FT/IR (ν , cm^{-1}) (I): 3352 br/m, 3068m, 2963 br/m, 2929 m, 2861 w, 2560 w, 1651 sh, 1596 v/s, 1572 s, 1544s, 1531 v/s, 1434 s, 1426 v/s, 1376 v/s, 1299 v/s, 1259 s, 1161 w, 1092 s, 1047 m, 1006 m, 924 w, 858 w, 850 w, 771 m, 676 w, 667 w. Exemplu de obținere a diaqua-nitrato-(2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat, $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ (II). S-a adăugat pivalat de Mn(II,III), $[\text{Mn}_6\text{O}_2((\text{CH}_3)_3\text{CCO}_2)_{10}((\text{CH}_3)_3\text{CCO}_2\text{H})_4]$, (0,02 g, 0,01 mmoli), nitrat de disprosiu(III) (0,04 g, 0,09 mmoli) și 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină (0,007 g, 0,022 mmoli) în 8 ml etanol. În continuare, amestecul reactant se refluxează timp de 30 minute, utilizând un refrigerent ascendent. Soluția obținută a fost filtrată și lăsată într-un flacon acoperit. La răcire și evaporare lentă în soluție se depun cristale de culoare cafenie, aciforme, care se filtrează, se spală cu etanol și se uscă în aer. S-a determinat, %: C-40,68; H-3,22; N-21,59. Pentru $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ (II), $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{MnN}_8\text{O}_8$, s-a calculat, %: C-40,99; H-3,06; N-21,25. Spectrul infraroșu: FT/IR (ν , cm^{-1}) (II): 3731 br/m, 3405 br/m, 3073 m, 2962 br/m, 2909 m, 2821 w, 1662 sh, 1572 v/s, 1545 s, 1532 v/s, 1474 s, 1428 v/s, 1388 v/s, 1377 v/s, 1294 s, 1260 m, 1159 w, 1103 s, 1035 m, 1021 m, 1005 m, 927 w, 859 w, 850 w, 778 m, 679 w, 667 w. Activitatea proteazelor în variantele optimizate este superioară valorii maxime a martorului și în ziua a 10-a de cultivare, constituind 61,38 U/mL față de 51,03 U/mL în varianta martor, depășind proba de referință cu 20,3%.

Exemplul 2

Tulpina *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L care conțineau 0,1 L mediu, la temperatura de 30°C, $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ (II) - 0,0005...0,0015%, în restul condițiilor echivalente exemplului 1.

Activitatea maximă a proteazelor a fost determinată similar exemplului 1 și s-a înregistrat în lichidul cultural în ziua a 9-a de cultivare, în varianta cu concentrația compusului coordonativ de 0,0005%, constituind 71,91 U/mL în comparație cu 51,03 U/mL în varianta proxim, depășind varianta proxim cu 40,9%.

Adăugarea compușilor coordonativi izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat cu formula $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ (I) și diaqua-nitrato-(2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat cu formula $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ (II) în mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi miceliali *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 în concentrații de 0,0005% sporește activitatea proteazelor neutre sintetizate de tulpină cu 40,9... 84,9%.

Maxima biosintezei proteazelor neutre (pH 7,4) la micromiceta *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 în variantele optimizate se manifestă în ziua a 9-a de cultivare și coincide cu maxima în varianta martor. Activitatea proteazelor neutre (pH 7,4) determinată similar, variază în limitele 94,39...62,98 U/mL pentru compusul I și 71,91...55,49 U/mL pentru compusul II în funcție de concentrația aplicată a compusului coordonativ cu manifestarea maximei (94,39 U/mL, 71,91 U/mL) la concentrația de 0,0005% față de 51,03 U/mL în varianta martor, sporul activității constituind 84,9...23,4% pentru compusul I și 40,9% pentru compusul II.

Compușii coordonativi izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat cu formula $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ și diaqua-nitrato-(2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat cu formula $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$, datorită proprietăților pe care le manifestă prezintă interes în calitate de biostimulatori ai proceselor de enzimizare la cultivarea tulpinii de fungi miceliali *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15.