

Invenția se referă la biotehnologii microbiologice, în particular la mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D* – producător de enzime lipolitice folosite la dezintegrarea țesuturilor vegetale, și poate fi utilizată în industriile microbiologică, alimentară, eterooleaginoasă, farmaceutică.

Pentru obținerea enzimelor hidrolitice este cunoscut mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D* cu următoarea compoziție (g): coarde de viță de vie – 10,0; MgSO₄ – 0,5; NaNO₃ – 3,0; KCl – 0,5; FeSO₄ · 7H₂O – 0,01; melasă – 10,0; apă de robinet până la 1,0 L; pH inițial – 4,5...5,0 [1].

Dezavantajul acestui mediu constă în randamentul scăzut al unor componente ale complexului enzimatic hidrolitic (β-glucozidaze – 0,31 U/mL și xilanaze – 3,37 U/mL), sintetizat de tulpina de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, care nu asigură realizarea deplină a potențialului ei biosintetic.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv de cultivare care să asigure sporirea capacității biosintetice a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, în special sporirea biosintezei β-glucozidazelor și xilanazelor – componente importante ale complexului enzimatic hidrolitic în vederea dezintegrării profunde a materialelor vegetale.

Esența invenției constă în faptul că se propune un mediu nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*, (varianțe), care conține coarde de viță de vie uscate și mărunțite, borhot de sfeclă uscat și mărunțit, melasă, sulfat de magneziu (MgSO₄), azotat de sodiu (NaNO₃), clorură de potasiu (KCl), sulfat de fier hidrat (FeSO₄ · 7H₂O), apă de robinet, în care suplimentar, în calitate de stimulatori ai biosintezei β-glucozidazelor și xilanazelor se adaugă unul din compușii coordinați ai Zn(II) cu aminoacizi, la concret:

Varianta 1: compusul coordinați Zn(D-Ser)₂ în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde de viță de vie	10,0
Borhot de sfeclă	10,0
Melasă	10,0
MgSO ₄	0,5
NaNO ₃	3,0
KCl	0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
Zn(D-Ser) ₂	0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

Varianta 2: compusul coordinați Zn(L-Ala)₂ în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde de viță de vie	10,0
Borhot de sfeclă	10,0
Melasă	10,0
MgSO ₄	0,5
NaNO ₃	3,0
KCl	0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
Zn(L-Ala) ₂	0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

Varianta 3: compusul coordinați Zn(D-Ala)₂ în următorul raport cantitativ al elementelor, g:

Coarde de viță de vie	10,0
Borhot de sfeclă	10,0
Melasă	10,0
MgSO ₄	0,5
NaNO ₃	3,0
KCl	0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
Zn(D-Ala) ₂	0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

Rezultatul invenției constă în sporirea productivității biosintezei β-glucozidazelor cu 49,67...65,91% și a xilanazelor cu 52,22...64,98% față de cea mai apropiată soluție.

Pe lângă aceasta invenția mai prezintă și următoarele avantaje: posibilitatea sintezei orientate a complexului enzimatic hidrolitic cu compoziție programată în concordanță cu componența materialului supus hidrolizei; posibilitatea utilizării a 3 variante de medii nutritive echivalente după efect pentru cultivarea tulpinii de funghi *Aspergillus flavus VKM F 3292 D*.

Efectul biostimulator este condiționat de însușirea elementelor chimice indispensabile care intră în compoziția compușilor coordinați: Zn(II), aminoacizii, de a regla metabolismul microorganismelor (Дедюхина Э.Г., Ерошин В.Л. Незаменимые химические элементы в регуляции метаболизма микроорганизмов. Успехи микробиологии. Наука, Москва, 1992, с. 126-142).

Exemple de realizare a invenției

1. Pentru cultivarea tulpinii de funghi *Aspergillus flavus* VKM F 3292 D în 10 baloane Erlenmayer cu volumul de 750 ml s-au introdus câte 200 ml mediu de nutriție cu următoarea compoziție, g:

Varianta 1:

Coarde de viță de vie	10,0
Borhot de sfeclă	10,0
Melasă	10,0
MgSO ₄	0,5
NaNO ₃	3,0
KCl	0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
Zn(D-Ser) ₂	0,001...0,010
Apă de robinet	până la 1 L.

Cultivarea s-a realizat în condiții de agitare continuă (200 rot./min) la temperatura de 28°C, timp de 96 h, valoarea inițială a pH – 4,5.

Activitatea β-glucozidazelor s-a determinat după acțiunea asupra substratului p-nitrofenil β-D-glucopiranozid, activitatea xilanazelor – după acțiunea asupra xilanului de ovăz prin dozarea substanțelor reducătoare acumulate în mediu de reacție (Исмаилова Д.Ю., Логинова Л.Т. Влияние некоторых веществ на биосинтез целлюлозы термотолерантного гриба *Aspergillus terreus*. Прикладная биохим. и микробиол., т. XI, вып. 5, 1975, с. 676-677).

După 96 h de cultivare în varianta celei mai apropiate soluții activitatea xilanazelor a constituit 3,37 U/mL, iar β-glucozidazelor – 0,36 U/mL.

În varianta mediului propus (var. 1), în care elementul nou introdus suplimentar este Zn(D-Ser)₂ activitatea xilanazelor și β-glucozidazelor a constituit respectiv 5,41 U/mL și 0,511 U/mL, sau cu 60,53% și 65,91% mai superioară mediului celei mai apropiate soluții.

Analogic exemplului 1 au fost efectuate experiențe cu componența mediului din variantele 2 și 3 în care elementele noi introduse au fost compușii coordinați Zn(L-Ala)₂, (varianta 2) și Zn(D-Ala)₂ (varianta 3), condițiile de cultivare fiind identice.

Rezultatele experiențelor se prezintă în tabel.

Variantele mediilor	Numărul de probe	Concentrațiile comp. coord. (g/L)	Activitatea xilanazelor		Activitatea β-glucozidazelor	
			U/mL	% față de soluția cea mai apropiată	U/mL	% față de soluția cea mai apropiată
Mediul celei mai apropiate soluții	10	-	3,37±0,23	100,00	0,31±0,05	100,00
Mediile propuse:	10	0,001	5,41±0,12	160,53	0,51±0,06	165,91
Varianta 1	10	0,005	5,56±0,31	164,98	0,49±0,03	158,44
Zn(D-Ser) ₂	10	0,010	5,67±0,25	168,24	0,42±0,14	135,71
Varianta 2	10	0,001	5,13±0,18	152,22	0,47±0,05	152,92
Zn(L-Ala) ₂	10	0,005	5,25±0,27	155,78	0,44±0,09	144,16
	10	0,010	5,46±0,36	162,02	0,43±0,06	138,63
Varianta 3	10	0,001	5,56±0,21	164,98	0,46±0,07	149,67
Zn(D-Ala) ₂	10	0,005	5,46±0,13	162,02	0,42±0,09	135,38
	10	0,010	5,65±0,25	167,65	0,40±0,10	131,17

Datele din tabel indică faptul că în cazul utilizării mediului propus (variante) cu includerea compușilor coordinați ai Zn(II) în concentrație de 0,001, 0,005, 0,010 g/L activitatea xilanazelor și β-glucozidazelor este superioară activității respective pe mediul celei mai apropiate soluții.

Activitatea maximă a β-glucozidazelor a fost înregistrată la utilizarea concentrației biostimulatorului de 0,001 g/L și constituie 149,67...165,91%, cu 49,67...65,91% mai superioară față de soluția cea mai apropiată. Activitatea xilanazelor crește odată cu majorarea concentrației biostimulatorului de la 0,001 la 0,010 g/L. Astfel cum la o mărire semnificativă a concentrației biostimulatorului de 5...10 ori (0,005...0,010 g/L) activitatea xilanazelor crește neînsemnat (în mediu 2...7%) din considerente economice se recomandă utilizarea concentrației de 0,001 g/L. Sporirea activității xilanazelor în mediul propus (variante) alcătuiește 52,22...64,98% față de soluția cea mai apropiată.