

Invenția se referă la microbiologie, în particular la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de funghi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C și poate fi aplicată pentru obținerea preparatelor celulozolitice, utilizate în oenologie.

Tulpina de funghi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C cultivată pe mediul conform celei mai apropiate soluții care include celuloza microcristalină în calitate de inductor și sursă de carbon posedă capacitatea de a sintetiza trei componente de bază ale complexului celulazic – endoglucanaze, celobiohidrolaze și β -glucozidaze. Este cunoscut faptul că nu toate micromicetele – producători de celuloze posedă potențialul de a sintetiza β -glucozidaze, ceea ce constituie dezavantajul principal al acestor producători.

Este cunoscut mediul pentru cultivarea tulpinii de funghi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C, care conține (g): KH_2PO_4 1,0; CaCl_2 0,1; KCl 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3; NaNO_3 2,5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01; paie de porumb 40,0; extract de porumb 15,0; apă distilată 1,0 L; pH 4,5...5,5, pe care tulpina fiind cultivată submers în baloane Erlenmeyer de 0,5 L la temperatura 28...30°C, pe agitator rotativ (180...200 rot.min⁻¹), timp de 168 ore, activitatea enzimatică a componentelor complexului celulazic constituie: 42,43 U·mL⁻¹ endoglucanaze, 2,07 U·mL⁻¹ celobiohidrolaze și 4,08 U·mL⁻¹ β -glucozidaze [1].

Dezavantajele acestui mediu constau în activitatea relativ joasă a β -glucozidazei, conținutul înalt în mediul nutritiv al componentei costisitoare celuloză microcristalină, durata mare de cultivare – 168 ore.

Este cunoscut un mediu cu aceeași componență ca mediul din cea mai apropiată soluție (cu celuloza microcristalină), care suplimentar în calitate de biostimulator al biosintezei complexului celulazic include în microdoze compusul $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3\text{Gly}$. Durata de cultivare pe acest mediu de asemenea constituie 168 ore [2].

Dezavantajul acestui mediu constă de asemenea în activitatea joasă a biosintezei β -glucozidazei.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii de funghi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C, care să asigure biosinteza sporită a β -glucozidazelor.

Mediul nutritiv pentru cultivarea tulpinii de funghi *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C conține KH_2PO_4 , CaCl_2 , KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, extract de porumb, un compus coordinativ conținând glicină și apă distilată, având pH-ul 4,5...5,5. Suplimentar mediul conține paie de porumb, iar în calitate de compus coordinativ se utilizează $\text{MoO}_2(\text{acac})_2\text{Gly}$, ingredientele fiind luate în următorul raport, g/L:

| | |
|---|---------|
| KH_2PO_4 | 1,0 |
| CaCl_2 | 0,1 |
| KCl | 0,1 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,3 |
| NaNO_3 | 2,5 |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,01 |
| $\text{MoO}_2(\text{acac})_2\text{Gly}$ | 0,015 |
| extract de porumb | 15,0 |
| paie de porumb | 40,0 |
| apă distilată | restul. |

Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei β -glucozidazelor cu 63...65%, activitatea în lichid cultural constituind 6,82...6,91 U·mL⁻¹ față de 4,10...4,15 U·mL⁻¹ la cultivare pe mediul celei mai apropiate soluții, reducerea duratei de cultivare cu 48 ore, constituind 120 ore față de 168 ore pe mediul conform celei mai apropiate soluții. Un alt avantaj al invenției constă în substituirea componentei costisitoare – celuloza microcristalină cu o componentă ieftină – paie de porumb, care reprezintă un deșeu al fitotehniei.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1. Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C se cultivă în baloane Erlenmeyer de 0,5 L cu 0,1 L mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (180...200 rot.min⁻¹) la temperatura 28°C, durata cultivării 120 ore. Pe mediul nutritiv cu compoziția (g): KH_2PO_4 1,0; CaCl_2 0,1; KCl 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3; NaNO_3 2,5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{MoO}_2(\text{acac})_2\text{Gly}$ 0,015; paie de porumb 40,0; extract de porumb 15,0; apă distilată 1,0 L; pH 4,5.

Activitățile endoglucanazică, celobiohidrolazică și β -glucozidazică s-au determinat prin dozarea zaharurilor reducătoare (metoda Somogy - Nelson) în urma acțiunii lichidului cultural asupra substraturilor specifice: Na-carboximetilceluloză, hârtie de filtru și p-nitrofenil- β -D-glucopiranozid și în varianta propusă au avut valorile respective 29,74 U·mL⁻¹, 1,20 U·mL⁻¹ și 6,82 U·mL⁻¹.

Exemplul 2. Tulpina *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C se cultivă în baloane Erlenmeyer de 0,5 L cu 0,1 L mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (180...200 rot.min⁻¹) la temperatura 28°C, timp de 120 ore. Pe mediul cu compoziția (g): KH_2PO_4 1,0; CaCl_2 0,1; KCl 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3; NaNO_3 2,5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{MoO}_2(\text{acac})_2\text{Gly}$ 0,015; paie de porumb 40,0; extract de porumb 15,0; apă distilată 1,0 L; pH 5,5. Activitatea endoglucanazică, celobiohidrolazică și β -glucozidazică au avut valorile 25,63 U·mL⁻¹, 1,14 U·mL⁻¹, 6,92 U·mL⁻¹ (v. tabelul).

| Mediul | Activitatea, U·mL ⁻¹ | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------|------------------------|
| | endoglucanazică | celobiohidrolazică | β -glucozidazică |
| Conform celei mai apropiate soluții | 40,12 | 1,92 | 4,1 |
| Conform invenției | 29,74 | 1,20 | 6,82 |
| Conform celei mai apropiate soluții | 42,31 | 2,02 | 4,15 |
| Conform invenției | 25,63 | 1,14 | 6,92 |

Metoda obținerii combinației $\text{MoO}_2(\text{acac})_2\text{Gly}$: 0,4 g (0,001 moli) de $\text{MoO}_2(\text{acac})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, se dizolvă la încălzire în 30 mL de amestec de apă și metanol (1:2). La soluția obținută se adaugă 0,1 g (0,0001 moli) glicină în 10 H_2O . Amestecul se încălzește 5 min ($\sim 40^\circ\text{C}$). La răcirea lentă $\text{MoO}_2(\text{acac})_2\text{Gly}$ se sedimentează sub formă de cristale aciforme de culoare albă-gri. Randamentul $\sim 40\%$. Substanța este solubilă în apă, alcool metilic și etilic.

Găsit, %: C – 27,63; H – 3,48; N – 4,25

pentru $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{Mo N O}_4$

Calculat, %: C – 27,92; H – 3,68; N – 4,65; M – 301,11.