Invenţia se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de fungi miceliali Trichoderma koningii Oudemans şi poate fi utilizată pentru obţinerea preparatelor enzimatice proteolitice.

Sunt cunoscute un şir de tulpini de fungi microscopici din genurile Aspergillus, Penicillium, Rhizopus, Trichoderma – producătoare active a unui spectru larg de hidrolaze exocelulare, inclusiv proteaze [1].

Dezavantajele acestor producători prezintă capacitatea joasă de sinteză a proteazelor, lipsa capacităţii de sinteză concomitentă în cantităţi suficiente a altor hidrolaze nespecifice complexului de profil.

Soluţia cea mai apropiată de obiectul revendicat prezintă tulpina de fungi Fusarium gibbosum CNMN-FD-12, care în cultură submersă sintetizează un complex enzimatic specific cu acţiune proteolitică, compus din două tipuri de proteaze: acide – în cantităţi de 25,2...26,7 u/ml şi neutre – 30,2...32,9 u/ml, şi enzime satelit – xilanaze şi β-glucozidaze [2].

Dezavantajul acestei tulpini îl constituie complexul proteolitic incomplet – lipsa proteazelor alcaline şi nivelul redus de proteaze neutre, care reprezintă unul din principalele componente ale complexului proteolitic necesare pentru o proteoliză profundă a proteinelor, lipsa capacităţii de sinteză a amilazelor.

Problema rezolvată de invenţie constă în evidenţierea unei noi tulpini de fungi miceliali care la cultivarea submersă pe un mediu nutritiv pe bază de ingrediente vegetale să sintetizeze complexul integru de enzime proteolitice: proteaze acide, neutre şi alcaline.

Esenţa invenţiei o constituie tulpina de fungi Trichoderma koningii Oudemans, care este depozitată în Colecţia Naţională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie şi Biotehnologie al AŞM cu numărul CNMN-FD-15 şi poate fi utilizată în calitate de sursă de proteaze acide, neutre şi alcaline.

Rezultatul tehnic constă în obţinerea complexului enzimatic hidrolitic cu activitate proteolitică înaltă, constituit din proteaze acide, neutre şi alcaline, capabil să activeze într-un diapazon larg al pH-ului (3,6...9,03), care de asemenea posedă cantităţi considerabile de α-amilaze, ce asigură hidroliza efectivă a proteinelor şi a polizaharidelor amidonoase din ţesuturile vegetale şi animale, cu aplicare largă în diferite procese tehnologice şi în medicină. Activitatea proteazelor acide, care înfăptuiesc proteoliza substratului la valoarea pH-ului 3,6, este situată în limitele 26,4 ...27,5 u/ml, activitatea proteazelor neutre, care realizează hidroliza substratului la pH-ul 7,4, este cuprinsă în limitele 63,5... 66,9 u/ml iar activitatea proteazelor alcaline, ce realizează hidroliza substratului la pH-ul 9,03, se situiază în intervalul 59,9...61,9 u/ml. Concomitent, tulpina sintetizează în calitate de enzime nespecifice (însoţitoare, satelit) în cantităţi suficiente α-amilaze acidlabile (standard) cu activitatea de 19,9...22,3 u/ml, ce realizează hidroliza substratului în codiţii standard de aciditate la pH-ul 4,7 şi acidstabile cu activitatea de 36,2...43,4 u/ml în condiţii de hidroliză acidă la pH-ul 2,5, fapt ce contribuie la extinderea domeniilor de aplicare.

1. Caracterele morfologo-culturale ale tulpinii: micromicetele Trichoderma koningii Oudemans CNMN-FD-15 cresc bine pe diverse medii agarizate.

Pe mediul malţ-agar micromicetele formează colonii de culoare albă, care cu timpul capătă o nuanţă verde. Coloniile sunt intens sporulate. Miceliul este aderent la substrat, septat, cu zone de mănunchiuri de conidiofori ramificaţi, amplasaţi opus, prevăzuţi cu fialide situate solitar sau în grupuri de 2...3. Fialidele au formă de „garafă" – adică bombate în partea de jos şi subţiri, adesea curbate, în partea terminală pe care sunt situate conidiile. Conidiile sunt unicelulare, subglobuloase sau elipsoidale, cu pereţii netezi.

Pe mediul Czapek micromicetele formează colonii pufoase, iniţial albe, ulterior de culoare albicioasă-verde, albastră-verzuie; reversul coloniei necolorat. Conidiosporii se formează pe fialide şi cresc pe ramuri laterale în mănunchi.

2. Particularităţile fiziologo-biochimice ale tulpinii: tulpina Trichoderma koningii Oudemans CNMN-FD-15 creşte pe surse de azot organice, amoniacale şi pe bază de azotaţi.

Chemoorganotrof. Creşte în limitele de temperaturi +5...+40ºC. Temperatura optimă de creştere a miceliului este de +28...+30ºC. Creşterea la temperaturi mai înalte (+40ºC) este urmată de pierderea esenţială a activităţii enzimatice. Valoarea pH-ului optim pentru biosinteza proteazelor este cuprinsă între 8,0...9,3.

3. Produsul sintetizat de tulpină: tulpina Trichoderma koningii Oudemans CNMN-FD-15 posedă capacitatea de a sintetiza enzime hidrolitice extracelulare: proteaze (acide, neutre, alcaline) şi amilaze, în calitate de enzime satelit.

4. Parametrii productivi ai tulpinii: tulpina Trichoderma koningii Oudemans CNMN-FD-15 se distinge printr-un nivel înalt al activităţii proteazelor exocelulare acide (pH – 3,6), neutre (pH – 7,4) şi alcaline (pH 9,03), cu activitatea enzimatică respectivă: proteaze acide – 1,48...154 u/ml; proteaze neutre – 3,56...3,75 u/ml, proteaze alcaline – 3,36...3,47 u/ml.

5. Metoda de determinare a activităţii tulpinii: activitatea proteolitică s-a determinat în conformitate cu metoda propusă de Willstätter, după gradul de hidroliză a gelatinei până la aminoacizi şi polipeptide, cu dozarea ulterioară a grupelor carboxilice libere formate ca rezultat al hidrolizei (Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. Москва. Легкая и пищевая промышленность, 1982, p. 41-43).

6. Condiţiile şi componenţa mediului pentru cultivare: tulpina se cultivă submers în baloane Erlenmayer, pe agitatoare cu 180...200 rot/min, timp de 7…11 zile, la temperatura de 28...30°C, pe mediul nutritiv cu următoarea compoziţie, (%): tărâţe de grâu – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO3 – 0,2; (NH4)2SO4 – 0,1; pH-ul iniţial al mediului 6,25.

7. Condiţiile şi componenţa mediilor pentru păstrarea îndelungată şi reproducerea tulpinii: cultura se păstrează pe coloane oblice de malţ-agar sau Czapek la temperatura de 4...5°C. Termenul de reînsămânţare: la fiecare 2 luni.

Cultivarea se realizează în termostate la temperatura de +30°C timp de 10…14 zile. Reproducerea tulpinii se realizează pe mediul de păstrare sau alte medii, utilizate în acest scop.

Exemple de utilizare a tulpinii
Exemplul 1
Tulpina Trichoderma koningii Oudemans CNMN-FD-15 s-a cultivat pe mediul nutritiv cu următoarea compoziţie, (%): tărâţe de grâu – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO3 – 0,2; (NH4)2SO4 – 0,1; pH-ul iniţial al mediului 6,25, prealabil sterilizat la presiunea de 1 atm timp de 1 oră. După răcire până la 25…30ºC (sau temperatura camerei) mediul nutritiv se însămânţează cu suspensie de spori şi miceliu în cantitate de 5% v/v a culturii, crescute pe suprafeţe înclinate de malţ-agar timp de 12…14 zile şi obţinute prin spălare de pe coloana oblică cu 10 ml apă sterilă. Cultivarea se realizează în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 l, care conţin 0,2 l de mediu, în condiţii de agitare continuă (180...200 rot/min), la temperatura de 28º C, timp de 216 ore (9 zile).
Activitatea proteolitică, determinată în conformitate cu metoda Anson după acţiunea asupra cazeinatului de sodiu, pentru proteazele acide (valoarea pH-ului 3,6) a constituit 26,9 u/ml; pentru proteazele neutre (valoarea pH-ului 7,4) – 65,3 u/ml; pentru proteazele alcaline (valoarea pH-ului 9,0) – 60,7 u/ml (Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. Москва. Легкая и пищевая промышленность, 1982, p. 36- 41).
Activitatea amilazelor (α-amilaze), determinată după gradul de hidroliză a soluţiei de 1% de amidon, a constituit: 20,3 u/ml (pH-ul 4,7) şi 41,8 u/ml (pH-ul 2,5) (Рухлядева А.П., Полыгалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1981, 288 p.)

Exemplul 2
Tulpina Trichoderma koningii Oudemans CNMN-FD-15 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 l, care conţineau 0,1 l de mediu, la temperatura de 30º C, timp de 192 ore (8 zile), în rest condiţiile sunt echivalente exemplului 1.
Activitatea componentelor complexului enzimatic a constituit: proteaze acide – 27,2 u/ml, proteaze neutre – 64,2 u/ml, proteaze alcaline – 61,5 u/ml, amilaze – 22,1 u/ml (pH-ul 4,7) şi 42,9 u/ml (pH-ul 2,5).