

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la medii de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 32-19 CNMN FD 02 – producător de enzime amilolitice și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea amidazelor cu spectru larg de aplicare în diverse procese tehnologice: fabricarea pâinii, producerea berii și alcoolului, producerea sucurilor și conservelor din fructe și legume, industria de amidon și melase, obținerea glucozei cristaline, industria textilă, în farmaceutică și medicină, în cercetări științifice.

Pentru cultivarea tulpinilor producătoare de enzime amilolitice se utilizează medii, care conțin ca parte minerală diferite modificări ale mediului Czapek și inductori ai sintezei amidazelor (amidon sau ingrediente naturale cu conținut de amidon – făină de fasole, făină de porumb, tărâțe de grâu etc.) și, în funcție de particularitățile fiziologobiochimice ale tulpinii, diferiți biostimulatori [1].

În calitate de cea mai apropiată soluție a servit mediul cu următoarea componență

(g·L⁻¹): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH₂PO₄ – 2,0; KCl – 0,5; MgSO₄ – 0,5, apă potabilă, pH inițial al mediului – 3,0 [2].

La cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 pe mediul menționat, timp de 144 ore (6 zile), la temperatura de 28...30°C, în condiții de agitare continuă, cultura manifestă activitate amilolitică maximă în ziua a 6-a de cultivare și constituie 413...425 u·mL⁻¹ de lichid cultural la hidroliza amidonului solubil în condiții standard (pH 4,7) și 346...351 u·mL⁻¹ în condiții acide (pH 2,5).

Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în faptul că mediul nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al tulpinii și biosinteza enzimelor amilolitice nu atinge valoarea maximă.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 care să asigure sporirea capacității și a stabilității biosintetice a producătorului.

Esența invenției constă în aceea că pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 se propune o variantă nouă de mediu nutritiv care, suplimentar la componentele mediului proxim, conține compusul coordinativ al Co(III) cu dioxime și anionul fluorurat [TiF₆]²⁻ în sfera externă: [Co(DH)₂(Anil)₂]₂[TiF₆] în următorul raport cantitativ al elementelor, g·L⁻¹: amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH₂PO₄ – 2,0; KCl – 0,5; MgSO₄ – 0,5; [Co(DH)₂(Anil)₂]₂[TiF₆] – 0,005...0,010, apă potabilă, pH inițial al mediului – 3,0.

Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei enzimelor amilolitice: cu 27,8% activitatea amidazelor ordinare și cu 12,5...23,8% a amidazelor acid stabile față de cea mai apropiată soluție și reducerea duratei de cultivare a producătorului cu 24 ore.

Efectul biostimulator al compușilor coordinativi este cauzat de însușirea microelementelor din componența compusului coordinativ: Co(III), Ti(IV) de a se implica activ la coordonarea și desfășurarea reacțiilor metabolice extrem de fine și complexe.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Tulpina s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L, care conțineau 0,1 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție (g·L⁻¹): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH₂PO₄ – 2,0; KCl – 0,5; MgSO₄ – 0,5; [Co(DH)₂(Anil)₂]₂[TiF₆] – 0,005; apă potabilă până la 1 L; pH 3,0. Cultivarea s-a efectuat timp de 144 ore, la temperatura de 30°C, în condiții de agitare continuă (180 rot. · min⁻¹).

Activitatea amilolitică maximă a micromicetei pe mediul propus determinată în lichidul cultural s-a înregistrat în ziua a 5-a de cultivare constituind 506,4 u·mL⁻¹ pentru amidazele ordinare, și 335,1 u·mL⁻¹ pentru amidazele acid stabile, ceea ce depășește activitatea în varianta martor – cultivarea tulpinii pe mediul proxim respectiv cu 27,8 și 12,5% (ziua a 6-a de cultivare – ziua manifestării maximumului de biosinteză a tulpinii pe mediul conform celei mai apropiate soluții) (tab. 1 și 2).

Exemplul 2

Tulpina *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L, care conțineau 0,1 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție

(g·L⁻¹): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH₂PO₄ – 2,0; KCl – 0,5; MgSO₄ – 0,5; [Co(DH)₂(Anil)₂]₂[TiF₆] – 0,010; apă potabilă până la 1 L; pH 3,0. Cultivarea s-a efectuat timp de 144 ore, la temperatura de 28°C, în condiții de agitare continuă (180 rot. · min⁻¹).

Activitatea amilolitică maximă a micromicetei pe mediul propus determinată în lichidul cultural s-a înregistrat în ziua a 5-a de cultivare, constituind 506,4 u·mL⁻¹ pentru amidazele ordinare și 368,4 u·mL⁻¹ pentru amidazele acid stabile, ceea ce depășește activitatea în varianta martor – cultivarea tulpinii pe mediul proxim respectiv cu 27,8 și 23,7% (ziua a 6-a de cultivare – ziua manifestării maximumului de biosinteză a tulpinii pe mediul conform celei mai apropiate soluții) (tab. 1 și 2).

Sinteza [Co(DH)₂(Anil)₂]₂[TiF₆]

La amestecul cald de 0,33 g (0,001 moli) CoTiF₆·6H₂O în 20 mL de apă și 0,23 g (0,002 moli) dimetilglioximă în 20 mL metanol se adaugă 0,23 mL (0,0025 moli) anilină. Soluția se încălzește în creuzet de grafit la aer ~8...10 min, apoi se filtrează și se lasă pentru evaporarea lentă la temperatura camerei. Din soluție se sedimentează cristalele cafenii în formă de prisme cubice.

Randamentul: ~60%. Substanța este bine solubilă în alcoolii, mai puțin în apă.

Găsit, %: Co 10,23; C 42,93; H 4,26; N 15,02.

Pentru C₄₀H₄₈Co₂F₆N₁₂O₈Ti

Calculat, %: Co 10,59; C 43,18; H 4,35; N 15,11.

Tabelul 1

Modificarea activității amilazelor ordinare (pH 4,7, 30 min) ale micromicetei *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 sub influența complexilor cobaltului (III) cu anioni fluorurați

Compusul coordinativ, mg/L		Activitatea amilolitică						
		Ziua a 4-a		Ziua a 5-a		Ziua a 6-a		
		u/mL	% f/c* z/6	u/mL	% f/c* z/6	u/mL	% f/c* z/6	
[Co(DH) ₂ (Anil) ₂] ₂ [TiF ₆]	1	392,2	99,0	458,9	115,8	382,3	96,5	
	5	392,2	99,0	506,3	127,8	382,3	96,5	
	10	415,2	104,8	506,3	127,8	450,0	113,6	
cea mai apropiată soluție		-	299,6	-	385,6	-	396,2	100

Tabelul 2

Modificarea activității amilazelor ordinare (pH 2,5, 30 min) ale micromicetei *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 sub influența complexilor cobaltului (III) cu anioni fluorurați

Compusul coordinativ, mg/L		Activitatea amilolitică						
		Ziua a 4-a		Ziua a 5-a		Ziua a 6-a		
		u/mL	% f/c* z/6	u/mL	% f/c* z/6	u/mL	% f/c* z/6	
[Co(DH) ₂ (Anil) ₂] ₂ [TiF ₆]	1	252,4	84,7	310,1	104,1	220,4	84,2	
	5	276,6	92,9	335,1	112,5	249,4	95,3	
	10	284,6	95,6	368,4	123,7	292,9	111,9	
cea mai apropiată soluție		-	215,6	-	261,7	-	297,8	100

* - față de cea mai apropiată soluție în ziua manifestării maximei de biosinteză.