

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un mediu de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* (33) CNMN FD 06a și poate fi aplicată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor amilolitice.

Pentru obținerea enzimelor amilolitice în calitate de producători sunt utilizați fungi din genul *Aspergillus*. Un interes deosebit prezintă tulpina *Aspergillus niger* (33) CNMN FD 06a, datorită însușirii de a sintetiza nu numai amilaze tipice, dar și acid stabile, capabile să activeze în mediu cu aciditate sporită (pH – 2,5), fapt care sporește valoarea practică a tulpinii.

Pentru cultivarea tulpinilor fungice – producătoare KCl, K₂HPO₄, NaNO₃, MgSO₄ de amilaze, sunt cunoscute mediile care conțin săruri minerale, amidon, făină de fasole sau porumb, alte substanțe organice [1]. Dezavantajul acestor medii constă în activitatea amilolitică joasă a producătorilor la cultivarea lor pe aceste medii.

Cel mai apropiat după compoziție și rezultatul obținut pentru cultivarea tulpinii *Aspergillus niger* (33) este mediul nutritiv cu următorul raport al ingredientelor (g): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH₂PO₄ – 2,0, KCl – 0,5, MgSO₄ – 0,5, apă potabilă până la 1 L, pH inițial – 5,0 [2]. Activitatea amilolitică la cultivarea tulpinii pe acest mediu constituie 96,4 U/ml în condiții standard de hidroliză (pH – 4,7) și 91,2 U/ml în condiții extremale acide (pH – 2,5).

Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că nu asigură realizarea deplină a capacității biosintetice a tulpinii, activitatea amilolitică rămânând relativ mică.

Problema pe care o soluționează invenția este crearea unui mediu nutritiv nou ce permite sporirea capacității biosintetice a producătorului.

Mediul nutritiv, conform invenției, conține, g/L de apă: 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 thio₂] · BF₄ · 3H₂O – 0,005 ... 0,040, pH-ul inițial al mediului – 5,0.

Rezultatul invenției constă în sporirea activității amilolitice a tulpinii *Aspergillus niger* 33 la cultivarea pe mediul elaborat aproximativ de 2 ori și reducerea duratei cultivării cu 24 ore în comparație cu cea mai apropiată soluție.

Ațiunea stimulatorie este cauzată de însușirea compușilor coordinațivi ai metalelor de a regula metabolismul microorganismelor, cât și de prezența în componența lor a elementelor chimice indispensabile pentru creșterea și dezvoltarea microorganismelor. Un alt avantaj al invenției îl constituie faptul că utilizarea biostimulatorului (CC) face posibilă programarea compoziției complexului amilolitic privind raportul amilaze tipice: amilaze acid stabile.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1.

Se pregătește mediul nutritiv cu următoarea compoziție (g/L): amidon – 3,0, făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH₂PO₄ – 2,0, KCl – 0,5, MgSO₄ – 0,5, [Co(DH)₂thio₂] · BF₄ · 3H₂O – 0,040; apă potabilă până la 1 L; pH-ul inițial al mediului – 5,0. Mediul pregătit se repartizează câte 0,2 L în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 1,0 L și se sterilizează la temperatura de 120°C, presiunea de atm., timp de 1 oră. După răcire până la temperatura camerei (25...28°C) mediul nutritiv în baloane se însămânțează cu suspensie de spori ai tulpinii *Aspergillus niger* 33 în doză de 10 mL cu densitatea de 106 spori/mL.

Cultivarea se efectuează în condiții de agitare continuă (180 rot/min), la temperatura de 30°C/, timp de 5 zile (120 ore). Activitatea amilolitică în lichidul cultural a constituit 224,22 U/mL, în condiții standard de hidroliză a substratului (pH – 4,7) și 149,95 U/mL, în condiții acide de hidroliză (pH – 2,5), ceea ce depășește de 2,2 ori activitatea amilazelor tipice (pH – 4,7) și de 1,9 ori activitatea amilazelor acid stabile fixată la cultivarea tulpinii pe mediul proxim (tab. 1).

Tabelul 1

Influența compusului coordinațiv [Co(DH)₂ · thio₂] · BF₄ · 3H₂O* asupra duratei cultivării micromicetei *Aspergillus niger* (33) CNMN FD 06a (concentrația CC 40 mg/L)

Durata cultivării, zile	PH-ul mediului	Activitatea amilolitică (pH-4,7), Un/ml		Activitatea amilolitică (pH – 2,5), Un/ml	
		martor	experiment	martor	experiment
1	4,8	3,65	5,99	5,61	6,63
2	3,85	3,91	5,78	5,10	6,12
3	5,45	40,33	54,60	20,33	51,70
4	5,9	52,08	120,69	26,60	96,69
5	7,0	80,79	224,22	68,02	149,95
6	7,2	101,42	138,69	79,63	114,83
7	7,5	54,90	10,20	60,15	4,08

*La soluția de 0,34 g (0,001 moli) Co (BF₄)₂ · 6H₂O în 10 ml de apă e adaugă 0,23 g (0,002 moli) dimetilgloximă în 20 mL de metanol și 0,15 g (0,002 moli) tiocarbamidă în 10 mL apă. Amestecul se încălzește la aer timp de 5 min și se lasă pentru evaporare lentă la temperatura camerei.

Se sedimentează cristalele cafenii întunecate sub formă de prisme neregulate, care sunt filtrate și uscate la aer. Randamentul: - 55%. Substanța este solubilă în apă, metanol și etanol.

găsit, %; Co 9,86; C 20,24; H 4,80; N 19,17;

Pentru C₁₀H₂₉CoF₄N₈O₇S₂B

calculat, %: Co 10,12; C 20,63; H 4,85; N 19,25.

Exemplul 2

Se pregătește mediul nutritiv cu următoarea compoziție (g/L): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH_2PO_4 – 2,0, KCl – 0,5, MgSO_4 – 0,5 $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot \text{thio}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; apă potabilă până la 1 L; pH-ul inițial al mediului – 5,0. Mediul pregătit se repartizează câte 0,2 L în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 1,0 L și se sterilizează la temperatura de 120°C, presiunea de atm, timp de 1 oră. După răcirea până la temperatura camerei (25...28°C) mediul nutritiv în baloane se însămânțează cu suspensie de spori ai tulpinii *Aspergillus niger* 33 în doză de 10 mL cu densitatea de 106 spori/mL.

Cultivarea se efectuează în condiții de agitare continuă (180 rot/min), la temperatura de 30°C, timp de 5 zile (120 ore). Activitatea amilolitică în lichidul cultural obținut a constituit 158,09 U/mL, în condiții standard de hidroliză a substratului (pH – 4,7) și 72,78 U/mL, în condiții acide de hidroliză (pH – 2,5), ceea ce depășește respectiv cu 58,07% activitatea amilazelor tipice obținută la cultivarea tulpinii pe mediul din cea mai apropiată soluție și reduce conținutul amilazelor acid stabile (tab. 2).

Tabelul 2

Influența compusului coordinativ $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot \text{thio}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ asupra activității amilolitice a tulpinii fungice *Aspergillus niger* (33) *CNMFN FD 06a* (durata cultivării 5 zile – 120 ore)

Concent CC. Mg/l	Activitatea amilolitică (pH – 4,7)		Activitatea amilolitică (pH – 2,5)	
	Un/mL	% față de martor	Un/mL	% față de martor
1	153,16	137,19	95,29	106,20
5	158,09	141,65	72,78	81,00
10	145,90	130,73	118,08	131,80
40	149,72	134,15	131,27	146,63
martor	111,61	100,00	89,73	100,00