

PROCEDEE INOVATIVE DE CULTIVARE A MICROMICETELOR *FUSARIUM GIBBOSUM* CNMN FD 12 ȘI *RHIZOPUS ARRHZUS* CNMN FD 03 – PRODUCĂTORI DE HIDROLAZE EXOCELULARE

DOI: <https://doi.org/10.52673/18570461.23.2-69.05>

CZU:57.087:546.6:579.6

Doctor în biologie **Alexandra CILOCI**E-mail: alexandra.ciloci@gmail.comOPCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3888-7869>Doctor în biologie **Steliana CLAPCO**E-mail: steliana.clapco@imb.utm.mdORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7147-2740>**Elena DVORNINA**E-mail: elena.dvornina@imb.utm.mdORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0015-6131>**Svetlana LABLIUC**E-mail: svetlana.labliuc@imb.utm.mdOPCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5692-5649>

Universitatea Tehnică a Moldovei

INNOVATIVE PROCESSES FOR THE CULTIVATION OF MYCROMYCETE *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 and *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 – PRODUCERS OF EXOCELLULAR HYDROLASES

Summary. The optimal concentrations of the heterometallic compounds of “s” and “d” elements Sr, Ca and Fe with polydentate ligands based on 2,6-pyridinedicarboxyl chloride and the Schiff base -2,6-diacetylpyridine bis(picolinoyl-hydrazone) that increase the synthesis of exocellular proteases and lipases in micromycete *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 and *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 were established. The obtained results were used in the development of 3 optimized mycelial fungal culture procedures (with alternative variants) that ensure enhanced proteolytic and lipolytic enzyme biosynthesis and shortened culture cycle, which provides opportunities for obtaining indigenous enzyme preparations based on local producing strains characterized by enhanced activity with predicted composition in short periods of time.

Keywords: coordination compounds, micromycete, *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, proteases, lipases.

Rezumat. Au fost stabilite concentrațiile optime de aplicare a compușilor heterometalici ai elementelor „s” și „d” Sr, Ca și Fe cu liganzi polidentati în bază de 2,6-piridinădicarboxilclorură și a bazei Schiff -2,6-diacetilpiridină bis(picolinolil-hidrazona) în calitate de biostimulatori ai sintezei proteazelor și lipazelor exocelulare la micromicetele producătoare *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 și *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03. Rezultatele obținute au fost valorificate prin elaborarea a trei procedee optimizate de cultivare a fungilor (cu variante alternative) ce asigură intensificarea biosintezei enzimelor proteolitice și lipolitice și diminuarea ciclului de cultivare, fapt ce oferă oportunități pentru obținerea preparatelor enzimatic autohtone, în bază de tulpini producătoare locale, caracterizate prin activitate sporită, cu compoziție prognoată, în perioade reduse de timp.

Cuvinte-cheie: compuși coordinativi, micromicete, *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, proteaze, lipaze.

INTRODUCERE

Hidrolazele microbiene sunt enzime industriale deosebit de importante, ponderea acestora printre enzimele utilizate în diverse procese tehnologice constituind cca 75 %. Lipazele, proteazele și carbohidrazele

domină piața enzimelor, reprezentând peste 70 % dintre toate vânzările de enzime. Printre sectoarele industriale dependente de hidrolaze se numără producerea de detergenți, piele, textile, alimente (inclusiv lactate), furaje, biocombustibili, industria de tratare a deșeurilor și cea farmaceutică [1-3].

Proteazele sunt al doilea grup ca mărime, fiind întrebuințate pe larg în industria alimentară (fabricarea produselor lactate și de panificație, obținerea hidrolizatorilor din soia, a berii, alimentelor fermentate, la frăgezirea cărnii etc.), textilă (prelucrarea pieilor), agricultură (aditivi alimentari în hrana animalelor), farmaceutică (preparate medicamentoase cu componente enzimice pentru tratarea afecțiunilor tractului gastro-intestinal), precum și în procesele de bioremediere, producerea detergenților biodegradabili [4-6].

Lipazele derivate din fungi sunt implicate în diferite procese industriale și științifice care necesită hidroliză, esterificare, transesterificare și alcooliză [7; 8]. Datorită specificității față de substrat acestea sunt folosite la fabricarea de alimente, produse farmaceutice, cosmetice, detergenți și hârtie [9; 10].

Drept surse biotehnologice de enzime relevante din punct de vedere industrial sunt explorate, în special, bacteriile și micromicetele, ultimele fiind folosite pentru producerea a peste 50 % din necesarul de enzime. În comparație cu alte microorganisme, fungii se consideră siguri (*Generally Recognized as Safe*) satisfăcând cerințele industriale, cum ar fi creșterea eficiență pe medii de cultură ieftine, durata scurtă de cultivare și furnizarea continuă a produselor dorite [11]. Aceștia se evidențiază inclusiv prin capacitatea de a produce o gamă largă de hidrolaze exocelulare (proteaze acide, neutre, alcaline, pectinaze, lipaze, celuloaze, amilaze etc.), care pot fi separate din lichidul de cultură folosind metode simple de purificare. Hidrolazele fungice se disting prin specificitate largă de substrat, activitate înaltă și stabilitate într-un diapazon extins al pH-ului și temperaturii [12].

O metodă eficientă de manipulare și dirijare a proceselor biosintetice este aplicarea compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție în calitate de stimulatori. Astfel, la cultivarea microorganismelor din diverse grupe taxonomice, inclusiv microalge [13], cianobacterii [14], levuri [15], fungi [16; 17] în prezența compușilor coordinativi a fost constatată intensificarea sintezei diferitelor principii bioactive și reducerea ciclului tehnologic.

Ținând cont de cele menționate, scopul cercetărilor prezentate a constat în elaborarea unor procedee inovative de cultivare a micromicetelor din genurile *Fusarium* și *Rhizopus* – producători de enzime hidrolitice cu utilizarea compușilor coordinativi ai metalelor de tip „s” și „d” în calitate de stimulatori și reglatori, care ar oferi oportunități de obținere a unor preparate enzimice autohtone solicitate în diverse ramuri ale economiei naționale.

MATERIALE ȘI METODE

În calitate de obiect de studiu au servit tulpinile de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 (I) și *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 (II), producători de enzime proteolitice și, respectiv, lipolitice. Cultivarea submersă a tulpinilor producătoare de hidrolaze exocelulare s-a realizat la temperatura de 28-30 °C, pe agitatoare rotative (180-200 rot/min.), în retorte Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L, ce conțineau 0,1 L mediu nutritiv cu compoziție optimă, g/L:

- pentru *F. gibbosum*, făină de porumb – 20,0; făină de soia – 10,0; CaCO_3 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; apă potabilă până la 1 L; pH-ul inițial al mediului – 6,25;

- pentru *Rh. arrhizus*, făină de soia – 35,0; KH_2PO_4 – 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; apă potabilă până la 1 L; pH-ul inițial al mediului – 8,0;

Drept material de inoculare a servit suspensia de spori cu densitatea 3×10^6 spori/ml, obținută prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii de 14-30 de zile (în funcție de tulpină), crescută pe coloane oblice de malț-agar. Concentrația inoculului a constituit 10 % V/V. În scopul stabilirii influenței compușilor coordinativi incluși în studiul asupra ciclului de dezvoltare a micromicetelor investigațiile au fost realizate în dinamică pe parcursul a 4-6 (*F. gibbosum*) și, respectiv, 1-2 zile (*Rh. arrhizus*) – durate optime de cultivare submersă a micromicetelor producătoare ce asigură biosinteza enzimelor de interes la cote înalte.

A fost evaluat efectul compușilor coordinativi bi-metalici ai metalelor „s” și „d” Sr, Fe și Ca cu liganzi polidentati, după cum urmează:

- tetra(izotiocianat)cobaltat(II) de tris(dimetil-piridin-2,6-dicarboxilat)stronțiu cu formula $[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$, unde L reprezintă esterul dimetilic al acidului 2,6-piridinădicarboxilic;

- nitrat de 2,6-diacetilpiridin-bis(picolinoilhidrazon)-bis(aqua)fier(III)-hidrat(1/2,5) cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, unde H_2L – bis(picolinoilhidrazona) 2,6-diacetilpiridinei;

- tetra(izotiocianat)cobaltat(II) de tris(dimetil-piridin-2,6-dicarboxilat)calciu cu formula $[\text{CaL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$, unde L reprezintă esterul dimetilic al acidului 2,6-piridinădicarboxilic.

Ținând cont de rezultatele unor studii preliminare, diapazonul de concentrații testate a constituit 1-20 mg/L în funcție de compus și tulpina producătoare. Compușii au fost adionați la mediul de cultivare cu compoziție optimă concomitent cu inoculul. Activitatea prezentată de probele cultivate în absența compușilor coordinativi a fost utilizată drept referință.

La finele procesului de cultivare, biomasa a fost separată de lichidul de cultură prin filtrare. În lichi-

dul filtrat a fost determinată activitatea hidrolazelor exocelulare prin metode acceptate în enzimologie. Proteazele acide (pH 3,6), neutre (pH 7,4) și alcaline (pH 9,0) au fost dozate prin metoda Willstatter, cu utilizarea gelatinei în calitate de substrat. Activitatea lipolitică a fost determinată prin metoda modificată Otto-Yamad, bazată pe hidroliza uleiului de măsline în soluție de alcool polivinilic [18].

Prelucrarea statistică a rezultatelor obținute s-a efectuat conform metodei propuse de B. Dospehov, în baza programului computerizat Excel [19].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

O multitudine de compuși coordinativi cu structură diferită se remarcă prin influența unică asupra proceselor biosintetice la microorganisme, prezentând instrumente eficiente în manipularea acestora și intensificarea sintezei substanțelor bioactive de interes. Astfel, s-a determinat efectul pozitiv al unor dioximați de cobalt(III) care conțin fluor asupra proceselor fiziologice la microalga *Porphyridium cruentum*, productivitatea microalgei și biosinteza lipidelor, acestea sporind cu 20 % și cu 17 %, corespunzător [13]. Un șir de compuși coordinativi ai cobaltului, cuprului și zincului în bază de liganzi oximici s-au distins prin acțiune stimulatorie asupra biosintezei proteazelor acide și neutre la micromiceta *Trichoderma koningii*, determinând sporul activității enzimatică cu 37,1-122,0 % și, în unele cazuri, reducerea duratei de cultivare cu 24 h [16]. Dioximatul Co(III) cu sulfanilamidă $[\text{Co}(\text{NioxH})_2(\text{Sam})_2]_2 [\text{TiF}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a fost relevat ca inductor al activității amilolitice la tulpina *Aspergillus niger* 33-19, asigurând un spor de 40,47-164,08 % și 33,9-148,15 % respectiv pentru amilazele acid labile

și acid stabile, precum și accelerarea manifestării maxime de biosinteză a enzimelor cu 24 de ore comparativ cu martorul [20]. Compușii penta- și mononucleari ai cobaltului au fost recomandați ca biostimulatori ai sintezei enzimelor lipolitice la micromiceta *Rhizopus arrhizus* CNMN 03, efectul acestora variind între 15,5-78,3 %, în funcție de compus, concentrația aplicată și durata de cultivare a microorganismului [21].

În baza unor studii preliminare, a fost evaluat efectul diferitelor concentrații ale compușilor coordinativi ai Sr și Fe cu liganzi polidentati asupra activității complexului de enzime proteolitice (acide (pH 3,6), neutre (pH 7,4) și alcaline (pH 9,0)) la micromiceta producătoare *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12. Concentrațiile testate au fost de 1-15 mg/L pentru primul compus și 5-20 mg pentru al doilea, respectiv. Conform datelor prezentate în tabelul 1, se constată că în cazul stronțului cea mai benefică concentrație este de 10 mg/L. Aceasta contribuie la intensificarea procesului de sinteză a enzimelor, astfel că deja la a 4-a zi de cultivare activitatea este prezentată prin valori înalte (1,18 u/mL), depășind cu 40 % nivelul martorului din aceeași zi și constituind cca 70 % din valoarea maximă a activității probei de referință (1,67 u/mL) marcată în ziua a 5-a. În cazul celorlalte concentrații evaluate, activitatea proteazelor acide se plasează sub nivelul probei de referință, printr-un efect inhibitor maxim distingându-se concentrația maximă testată (15 mg/L).

În ceea ce privește compusul fier-component, s-a observat că activitatea maximă (2,06 u/mL) este înregistrat la cultivarea micromicetei timp de cinci zile pe mediul ce conține complexul metalic în concentrație de 5 mg/L, sporul constituind 23,2 %. Varianta dată s-a re-

Tabelul 1

Influența compușilor coordinativi ai Sr și Fe(III) cu liganzi polidentati asupra activității proteazelor acide (pH-3,6) la micromiceta *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12

Compuși coordinativi	Concentrația, mg/L	Ziua a 4-a		Ziua a 5-a		Ziua a 6-a	
		Activitatea, u/mL	%, față de martor	Activitatea, u/mL	%, față de martor	Activitatea, u/mL	%, față de martor
$[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$	1	0,74±0,04	88,3	1,33±0,02	79,6	1,26±0,18	94,0
	5	0,76±0,11	90,0	1,05±0,04	62,9	1,20±0,04	89,9
	10	1,18±0,13	140,0	1,44±0,15	86,3	1,29±0,07	96,1
	15	0,59±0,00	70,0	0,92±0,09	55,3	0,98±0,10	73,1
$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$	5	0,39±0,12	46,7	2,06±0,09	123,2	1,51±0,06	112,8
	10	0,57±0,04	68,3	1,67±0,01	99,8	1,18±0,12	87,76
	15	1,26±0,00	150,0	1,51±0,06	90,5	1,06±0,09	79,40
	20	0,59±0,14	70,0	0,59±0,14	35,2	0,73±0,07	54,33
Martor	-	0,84±0,00	100,0	1,67±0,03	100,0	1,34±0,12	100,0

Tabelul 2

Influența compușilor coordinativi ai Sr și Fe (III) cu liganzi polidentati asupra activității proteazelor neutre (pH-7,4) la micromiceta *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12

Compuși coordinativi	Concentrația, mg/L	Ziua a 4-a		Ziua a 5-a		Ziua a 6-a	
		Activitatea, u/mL	%, față de martor	Activitatea, u/mL	%, față de martor	Activitatea, u/mL	%, față de martor
[SrL ₃][Co(NCS) ₄]	1	0,97±0,05	92,0	2,23±0,13	99,4	1,85±0,09	90,6
	5	1,11±0,02	105,3	1,64±0,18	73,1	2,58±0,05	126,3/115,2*
	10	1,99±0,05	189,3	2,14±0,10	95,6	2,46±0,11	120,8/109,8*
	15	0,85±0,13	81,3	1,26±0,06	56,3	2,21±0,02	108,4
[Fe(H ₂ L)(H ₂ O) ₂](NO ₃) ₃ ·2,5H ₂ O	5	1,61±0,38	153,3	1,68±0,09	75,0	2,24±0,09	109,8
	10	1,78±0,02	169,3	1,97±0,24	88,1	2,74±0,02	134,5/122,3*
	15	1,23±0,24	117,3	1,81±0,26	80,6	2,49±0,04	122,2/111,2*
	20	0,35±0,07	33,3	1,30±0,03	58,1	1,90±0,02	93,3
Martor	-	1,05±0,12	100,0	2,24±0,22	100,0	2,04±0,17	100,0

Notă: *, față de valoarea maximă a martorului înregistrată în ziua a 5-a.

marcat prin cel mai înalt nivel al activității (1,51 u/mL), inclusiv în a 6-a zi de cultivare.

Un efect stimulator mai pronunțat s-a stabilit în cazul proteazelor neutre, o parte dintre care, după cum se cunoaște, aparțin grupei metaloproteazelor și necesită ioni metalici divalenți pentru activitatea lor [22]. Conform rezultatelor evaluării (tabelul 2), compusul Sr adăugat la mediul de cultivare a tulpinii *F. gibbosum* în concentrație de 10 mg/L asigură intensificarea sintezei enzimice, în a 4-a zi de cultivare, sporul activității fiind de 89,3 % față de martorul din aceeași zi. Comparând valoarea dată (1,99 u/mL) cu activitatea maximă (2,24 u/mL) manifestată de proba de referință în a 5-a zi, se constată că aceasta este doar cu 12 % mai joasă, respectiv compusul ar putea fi inclus în biotehnologii microbiene de obținere a proteazelor neu-

tre cu activitate similară celei marcate la cultivarea în condiții clasice (fără aplicarea biostimulatorilor chimici), însă în termeni mai restrânși.

Valorile maxime ale activității proteazelor neutre în variantele experimentale s-au înregistrat în a 6-a zi de cultivare la concentrația de 5 mg/L și 10 mg/L, fiind cu 26,3 și respectiv 20,8 % mai mari față de martorul din aceeași zi.

Compusul fierului asigură un nivel înalt al activității proteazelor neutre în toate concentrațiile testate, excepție constituind doar concentrația maximă. Cele mai înalte valori ale activității (2,74 și 2,49 u/mL) se remarcă la cultivarea micromicetei, timp de 6 zile, în prezența Fe(III)·L¹ în concentrație de 10 și 15 mg/L, fiind cu 34,5 % și respectiv cu 22,2 % superioară martorului. Valori ale activității (1,61 și 1,78 u/mL) supe-

Tabelul 3

Influența compușilor coordinativi ai Sr și Fe(III) cu liganzi polidentati asupra activității proteazelor alcaline (pH-9,0) la micromiceta *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12

Compuși coordinativi	Conc., mg/L	Ziua a 4-a		Ziua a 5-a		Ziua a 6-a	
		Activitatea, u/mL	%, față de martor	Activitatea, u/mL	%, față de martor	Activitatea, u/mL	%, față de martor
[SrL ₃][Co(NCS) ₄]	1	0,92	82,5	1,26	96,9	0,98	99,6
	5	1,02	91,3	2,37	182,0	1,54	155,6
	10	1,06	95,0	2,32	178,8	1,67	168,3
	15	1,27	113,8	1,83	141,1	0,92	93,3
[Fe(H ₂ L)(H ₂ O) ₂](NO ₃) ₃ ·2,5H ₂ O	5	1,11	98,8	1,05	80,8	0,92	93,3
	10	0,97	86,3	1,30	100,2	1,29	130,1
	15	0,85	76,3	2,38	183,1	1,89	192,9
	20	0,56	50,0	0,56	43,1	1,82	185,7
Martor	-	1,12	100,0	1,30	100,0	0,99	100,0

rioare matorului (cu 53,3 și 69,3%) au fost relevate și în ziua a 4-a, la concentrațiile de 5 și 10 mg/L.

În cazul proteazelor alcaline (tabelul 3), la probele cultivate în prezența compusului Fe influența benefică s-a relevat preferențial la concentrația de 15 mg/L, sporul activității constituind 83,1 % (a 5-a zi) și (92,9 %) (a 6-a zi), față de variantele mator din zilele corespunzătoare. În cazul celorlalte concentrații, efectul este neutru sau inhibitor. Spre deosebire de complexul metalic cu fier, compusul stronțului prezintă o gamă mai largă de concentrații ce exercită efect pozitiv. Astfel, în ziua a 5-a – durata optimă de cultivare a micromicetei – activitatea proteolitică a probelor cultivate în prezența $[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ variază între 1,26-2,37 u/mL, depășind matorul cu 41,1-82,0 %, influență pozitivă exercitând toate concentrațiile testate, cu excepția concentrației de 1 mg/L.

Generalizând datele obținute, s-a determinat că ambii compuși evaluați exercită influență benefică preponderent asupra proteazelor alcaline sintetizate de micromiceta *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, sporul maxim al activității constituind cca 80 %. Subliniem că compusul stronțului în concentrație de 10 mg/L intensifică sinteza proteazelor acide și neutre, activitatea enzimatică în a 4-a zi de cultivare prezentând valori similare activității maxime a matorului marcată în a 5-a zi și poate fi folosit pentru obținerea preparatelor enzimactice în termen redus. Similar, compusul fierului în concentrație de 15 mg/L poate fi folosit pentru obținerea preparatelor enzimactice ce conțin în special proteaze acide.

Drept potențiali stimulatori ai activității lipolitice la micromiceta *Rh. arrhizus* CNMN FD 03 au fost examinați compușii calciului și al fierului cu liganzi

polidentati, aplicați în concentrații de 5-20 și, respectiv, 1-15 mg/L. Potrivit rezultatelor obținute (tabelul 4) complexul metalic cu calciul asigură valori superioare ale activității lipolitice față de proba de referință pe toată durata de cultivare, practic în toate concentrațiile testate, cu excepția celei maxime (20 mg/L), sporul activității variind între 10,2-93,5 % în prima zi de cultivare și 26,8-73,2 % în a 2-a zi.

Menționăm că în prima zi de cultivare activitatea enzimatică prezintă valori mai înalte față de nivelul superior al probei mator marcat în a 2-a zi, sporul constituind 34,0-78,4 %. Concentrația optimă a compusului calciului ce asigură sporul maxim al activității enzimactice, precum și scurtarea cu 24 de ore a ciclului tehnologic de cultivare a micromicetei producătoare este de 10 mg/L.

Rezultate similare au fost obținute și cu referire la compusul fierului. Astfel, activitatea probelor cultivate în prezența compusului fierului în concentrație de 5-15 mg/L variază între 35 000-57 458 u/mL în prima zi de cultivare și 39 167-45 000 u/mL – în a 2-a zi, sporul constituind 11,1-82,4 % și respectiv 14,6-31,7 % față de matorul din aceeași zi. S-a constatat inclusiv faptul că activitatea variantelor experimentale deja în prima zi de cultivare prezintă valori ale activității superioare nivelului maxim al probei de referință (a 2-a zi). Cea mai favorabilă concentrație a compusului coordinativ este cea de 5 mg/L care asigură în prima zi de cultivare un spor al activității lipolitice cu 82,4 % față de matorul din aceeași zi și 68,2 % față de valoarea maximă relevată la proba mator.

Așadar, după cum s-a constatat, concentrațiile optime ale compușilor coordinativi ai Ca și Fe cu liganzi polidentati care asigură sporul maxim (78,4 și 82,4 %

Tabelul 4

Influența diferitelor concentrații ale compușilor coordinativi ai Ca și Fe asupra activității lipolitice a micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03

Compuși coordinativi	Conc., mg/L	Ziua 1-a		Ziua a 2-a	
		Activitatea, u/mL	%, față de mator	Activitatea, u/mL	%, față de mator
$[\text{CaL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$	5	34708	110,2/101,6*	43333	126,8
	10	60958	193,5/178,4*	51667	151,2
	15	45792	145,4/134,0*	59167	173,2
	20	22458	71,3	27500	80,5
$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$	1	30625	97,2	35833	104,9
	5	57458	182,4/168,2*	45000	131,7
	10	40541	128,7/118,7*	41667	122,0
	15	35000	111,1/102,4*	39167	114,6
Mator	-	31500	100,0	34167	100,0

Notă: *% față de matorul zilei/față de maxima matorului (ziua a 2-a).

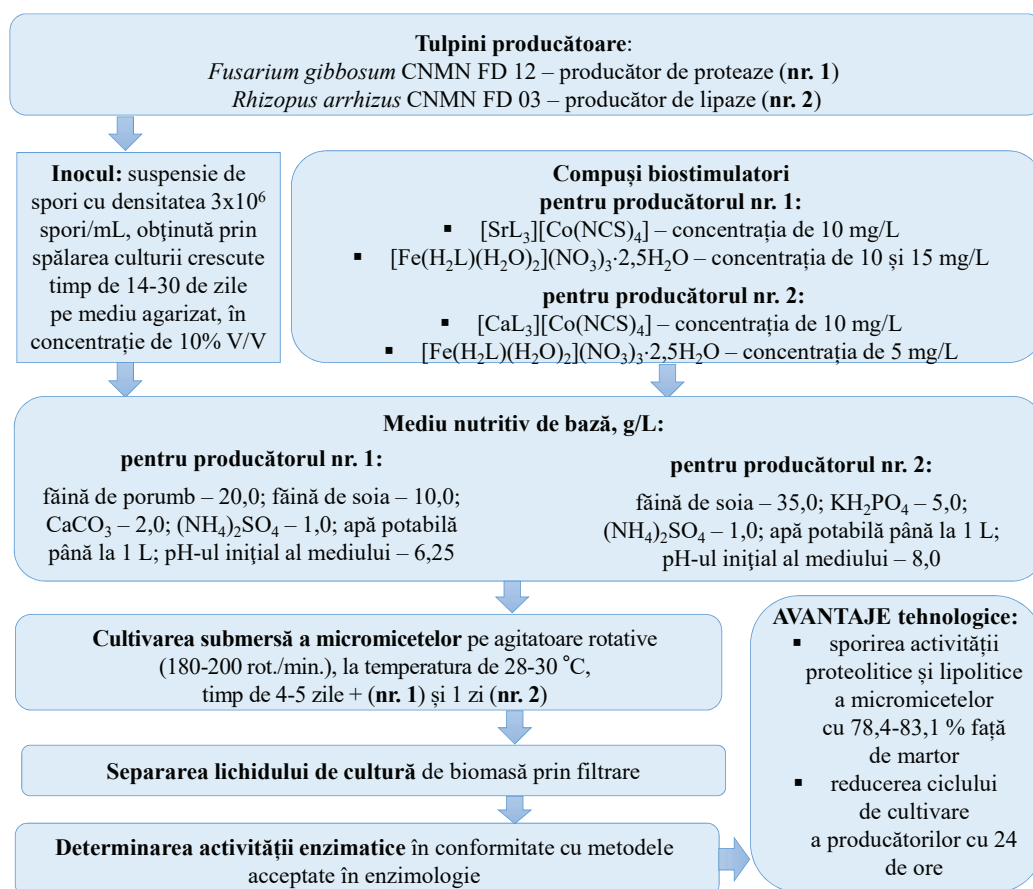


Figura 1. Schema de cultivare a micromicetelor *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 și *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 conform procedelor propuse.

față de martor) al activității enzimelor lipolitice la micromiceta *Rh. arrhizus* și scurtarea ciclului tehnologic cu 24 de ore este de 10 și, respectiv, 5 mg/L. Datele obținute au constituit baza elaborării unor procedee de sinteză orientată a proteazelor și lipazelor, conform schemei (figura 1).

Pentru fiecare dintre tulpinile producătoare au fost elaborate procedee distincte, cu variante alternative, esența cărora constă în aplicarea în calitate de biostimulatori ai sintezei hidrolazelor exocelulare a compușilor metalelor de tipul „s” și „d” (3d, 4d) Sr, Ca, Fe(III) cu liganzi polidentati în bază de 2,6-piridinădicarboxilclorură și a bazei Schiff -2,6-diacetilpiridină bis(picolinoil-hidrazona), în concentrații bine determinate.

Ținând cont de influența distinctă a compușilor coordinativi asupra activității enzimelor din componența complexului proteolitic sintetizat de micromiceta *F. gibbosum*, procedeele de cultivare elaborate pot fi folosite pentru obținerea preparatelor enzimatice proteolitice cu diferite proprietăți, în funcție de domeniul de aplicare, și anume: preparate îmbogățite cu proteaze alcaline (i), proteaze acide și/ sau neutre în timp redus (ii), compuși cu efect similar servind drept alternativă.

Procedeu I de cultivare a micromicetei *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – producătoare de proteaze: Tulpina *F. gibbosum* CNMN FD 12 se cultivă timp de cinci zile pe mediul nutritiv de bază, g/L: făină de porumb – 20,0; făină de soia – 10,0; CaCO_3 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; pH – 6,25; suplimentat cu unul dintre compușii coordinativi, după cum urmează:

$[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$, în concentrație de 10,0 mg/L;
 $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, în concentrație de 15,0 mg/L.

Avantajul procedurii propus constă în sporirea activității proteazelor alcaline cu 78,8 % și respectiv 83,1 %, totodată, activitatea celorlalte tipuri de proteaze se menține practic la nivelul martorului.

Procedeu II de cultivare a micromicetei *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – producătoare de proteaze: Tulpina *F. gibbosum* CNMN FD 12 se cultivă timp de patru zile pe mediul nutritiv de bază, g/L: făină de porumb – 20,0; făină de soia – 10,0; CaCO_3 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; pH – 6,25; suplimentat cu unul dintre compușii coordinativi, după cum urmează:

$[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$, în concentrație de 10,0 mg/L;
 $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, în concentrație de 10-15,0 mg/L.

Avantajul procedurii propus constă în intensificarea biosintezei enzimatică și oferă posibilitatea obținerii preparatelor cu profil de activitate preponderent în domeniu de pH acid și/sau neutru în termen redus (cu 24 de ore), ceea ce asigură beneficii economice.

Procedeu de cultivare a micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 – producătoare de lipaze:

Tulpina *Rh. arrhizus* CNMN FD 03 se cultivă timp de o zi pe mediul nutritiv de bază, g/L: făină de soia – 35,0; KH_2PO_4 – 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; apă potabilă până la 1 L; pH-ul inițial al mediului – 8,0; suplimentat cu unul dintre compușii coordinativi, după cum urmează:

$[\text{CaL}][\text{Co}(\text{NCS})_4]$, în concentrație de 10,0 mg/L; $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, în concentrație de 5 mg/L.

Avantajul procedurii propus constă în sporirea activității enzimelor lipolitice cu 78,4 și 82,4 % față de martor și reducerea ciclului tehnologic cu 24 de ore.

CONCLUZII

Au fost stabilite concentrațiile optime de aplicare a compușilor coordinativi bimetalici ai metalelor „s” și „d” Sr, Ca și Fe cu liganzi polidentati în bază de 2,6-piridinădicarboxilclorură și a bazei Schiff -2,6-diacetilpiridină bis(picolinoil-hidrazonă) pentru sporirea potențialului biosintetic al micromicetelor de semnificație biotehnologică *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – producătoare de proteaze și *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 – producătoare de lipaze.

■ Pentru tulpina *F. gibbosum* CNMN FD 12 s-a determinat că ambii compuși selectați ca biostimulatori cu perspectivă ai proteazelor – tetra(izotiocianat) cobaltat(II) de tris(dimetilpiridin-2,6-dicarboxilat) stronțiu și al Fe(III)-nitrat de 2,6-diacetilpiridină-bis-(picolinoilhidrazonă)-bis-(aqua) fier(III), apă (1/2,5) – exercită influență benefică preferențial asupra proteazelor alcaline sintetizate de micromicetă. Concentrațiile optime care asigură un nivel înalt al activității proteazelor alcaline (spor – cca 80 %), totodată menținând practic la nivelul martorului activitatea celorlalte tipuri de proteaze sunt: 10 mg/L – pentru compusul $[\text{SrL}][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ și 15 mg/L – pentru $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{NO}_3)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$.

■ Concentrațiile optime ale compușilor coordinativi ai Ca și Fe cu liganzi polidentati care asigură sporul maxim (78,4 și 82,4 % față de martor) al activității enzimelor lipolitice la micromiceta *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 și reducerea ciclului tehnologic cu 24 de ore sunt de 10 și, respectiv, 5 mg/L.

■ Rezultatele obținute au fost valorificate prin elaborarea a trei procedee optimizate de cultivare a micromicetelor (fiecare cu două variante alterna-

tive) ce asigură intensificarea biosintezei enzimelor proteolitice și lipolitice și diminuarea ciclului de cultivare. Aceasta oferă oportunități pentru obținerea preparatelor enzimatic autohtone, în bază de tulpini producătoare locale, caracterizate prin activitate sporită, cu compoziție dirijată în perioade reduse de timp.

BIBLIOGRAFIE

1. Li S., Yang X., Yang S., Zhu M., Wang X. Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. In: Computational and Structural Biotechnology Journal, 2012, vol. 9, nr. 2, e201209017.
2. Shimizu K, Morse DE. Silicatein: A unique silica-synthesizing catalytic triad hydrolase from marine sponge skeletons and its multiple applications. In: Moore BS, editor. Methods in Enzymology. Vol. 605. Massachusetts, US: Academic Press, 2018, 429-455.
3. Shukla E., Bendre A. D., Gaikwad M. Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes. Hydrolases. IntechOpen. 2022, doi:10.5772/intechopen.102350
4. Benyon R. J., Bond J. S. Proteolytic enzymes: a practical approach, Eds. 1994, 241-249.
5. Merheb-Dini C., Cabral H., Leite R.S.R. et al. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. In: J. Agric. Food Chem. 2009, vol. 57, 9210-9217.
6. Saxena R., Singh R. Metal ion and pH stable protease production using agro-industrial waste. In: Journal of Eco-biotechnology, 2010, vol. 2, nr. 4, 1-5.
7. Coradi G.V. et al. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. In: Ann. Microbiol., 2013, nr. 63, 533-540.
8. Živković I.L.T. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia. In: Biochem. Eng. J., 2015, nr. 93, 73-83.
9. Colla L.M. et al. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. In: Bioresour. Technol., 2010, nr. 101, 8308-8314.
10. Boratyński F., Szczepańska E., Grudniewska A., Gniłka R., Olejniczak T. Improving of hydrolases biosynthesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. In: Sci Rep. 2018, vol. 8, nr. 1, e:10157.
11. Singh N., Gaur S. Fungi in Sustainable Food Production. Springer; Cham, Switzerland: 2021. GRAS Fungi: A New Horizon in Safer Food Product, 27-37.
12. Saleem A., Mohsen K.H. Ebrahim Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. In: Journal of Taibah University for Science, 2014, vol. 8, nr. 2, 90-97.
13. Coropceanu E., Rudic V., Cepoi L. et al. Synthesis and Crystal Structure of $[\text{Co}(\text{DmgH})_2(\text{Thio})_2]_2 \text{F}[\text{PF}_6]$. The Effect of Fluorine-Containing Co(III) Dioximates on the Physiological Processes of the Microalga *Porphyridium cruentum*. In: Russian Journal of Coordination Chemistry, 2019, nr. 3(45), 200-207.

14. Valuță A., Codreanu L., Cepoi L., Rudi L., Codreanu S. Metal complexes with different ligands in cultivation of cyanobacterium *Nostoc linckia*. In: Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community. 21-22 octombrie 2019, Chișinău, Republica Moldova, Tipogr. „Biotehdesign”, 2019, 183-184.

15. Usatii A., Chiselita O., Rudic V. et al. The Effects Of Some Compounds Of Mn(II) And Zn(II) On The Multiplication Of Wine Yeast And Biosynthesis Of Carbohydrates. In: The Biomass, Analele Universității din Oradea – Fascicula Biologie, Tom. XVII, Issue: 2, 2010, 306-312.

16. Ciloci (Deseatnic) A., Coropceanu E., Clapco S., Rija A., Tiurina J., Bivol C., Bologa O., Bulhac I. Influența compușilor coordinațivi ai Co(III), Cu(II) și Zn(II) cu liganzi oximici asupra biosintezei hidrolazelor exocelulare la fungii miceliali. In: Studia Universitatis Moldaviae (Seria Științe Reale și ale Naturii). 2014, nr. 6(76), 57-70.

17. Bivol C., Ciloci (Deseatnic) A., Tiurina J., Clapco S., Labliuc S., Dvornina E., Lazarescu A., Reva V. Impact of thiosemicarbazone $[Cu(H_2L)Cl]$ coordination compound on acid and neutral proteases from *Trichoderma koningii* CNMN FD 15 strain. In: Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie. 2020, nr. 1(27), 64-70.

18. Grachova I.M., Grachov YU.P., Mosichev M. S. i dr. Laboratornyy praktikum po tekhnologii fermentnykh preparatov, Moskva, Legkaya i pish. prom., 1982. 240 s.

19. Dospekhov B. Planirovaniye polevogo opyta i statisticheskaya obrabotka dannykh. Moskva, Kolos, 1985, 192-196.

20. Ciloci (Deseatnic) A., Clapco S., Coropceanu E. et al. Efectul dioximaților Co(III) cu sulfanilamidă asupra activității enzimatică a unor micromicete. In: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2013, nr. 3(321), 132-138.

21. Stati D., Kravtsov V., Ciloci (Deseatnic) A. et al. Co (II, III) izobutyrate based on triethanolamine as biostimulators of the microorganism enzymesynthesis. In: Achievements and perspectives of modern chemistry. 9-11 octombrie, 2019, Chișinau, Republic of Moldova, Tipografia AȘM, 2019. 146 p.

22. Yike I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. In: Mycopathologia. 2011, nr. 171, 299-323.

NOTĂ. Cercetările au fost efectuate în cadrul Programului de stat 2020–2023 al Republicii Moldova prin proiectul 20.80009.5007.28 *Elaborarea noilor materiale multifuncționale și tehnologii eficiente pentru agricultură, medicină, tehnică și sistemul educațional în baza complexelor metalelor „s” și „d” cu liganzi polidentati* cu finanțare de către ANCD. Compușii coordinațivi au fost sintetizați și oferiți pentru investigații, conform obiectivelor proiectului, de către echipa-partener din cadrul Institutului de Chimie al Universității de Stat din Moldova, coordonată de dr. hab. Ion Bulhac.



Teodor Buzu. *Interceptare*, 2018, pictură pe mătase, 83 × 87 cm.