

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI  
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 582.282+577.152.3

**CONDRUC VIORICA**

**SINTEZA ORIENTATĂ A AMILAZELOR EXOCELULARE  
LA TULPINA DE FUNGI  
*ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 06**

**163.04. MICROBIOLOGIE**

**Rezumatul tezei de doctor în științe biologice**

**CHIȘINĂU, 2024**

Teza a fost elaborată în cadrul **Laboratorului „Enzimologie”** al **Institutului de Microbiologie și Biotehnologie** al Academiei de Științe a Moldovei (actualmente „Biotehnologia fungilor” al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei).

**Conducător științific:**

**CILOCI Alexandra**

dr. șt. biol., conf. cercet.

**Consultant științific:**

**RUDIC Valeriu**

dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad., Om Emerit al Republicii Moldova

**Referenți oficiali:**

**BĂLAN Greta**

dr. hab. șt. med., conf. univ., Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

**ELENCIUC Daniela**

dr. șt. biol., conf. univ., Universitatea de Stat din Moldova

**Componența Consiliului Științific Specializat:**

**Președinte:**

**STURZA Rodica**

dr. hab. șt. tehn., prof. univ., memb.cor., Universitatea Tehnică a Moldovei

**Secretar științific:**

**POSTOLACHI Olga**

dr. șt. biol., conf.cercet., Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei

**Membrii:**

**BURȚEVA Svetlana**

dr. hab. șt. biol., prof. cercet., Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei

**BURDUNIUC Olga**

dr. hab. șt. med., conf. cercet., Agenția Națională pentru Sănătate Publică

**CHIRSANOVA Aurica**

dr. șt. biol., conf. univ., Universitatea Tehnică a Moldovei

Susținerea va avea loc la **28 martie 2024** ora **14.00** în ședința Consiliului Științific Specializat D 163.04-23-93 din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei, adresa or. Chișinău, str. Academiei, 1, et. 2, biroul 253.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Universității Tehnice a Moldovei și pe pagina web a ANACEC ([www.cnaa.md](http://www.cnaa.md)).

Rezumatul a fost expediat la data de **26 februarie 2024**.

Secretar științific al Consiliului Științific Specializat, dr. șt., biol., conf.cercet.

**POSTOLACHI Olga**

Conducător științific, dr. șt. biol., cercet. conf.,

**CILOCI Alexandra**

Consultant științific, academician, prof. univ., Om emerit al Republicii Moldova

**RUDIC Valeriu**

Autor

**CONDRUC Viorica**

©Condruc Viorica, 2024

## CUPRINS

<b>REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII.....</b>	<b>4</b>
<b>CONȚINUTUL TEZEI.....</b>	<b>6</b>
<b>1. ASPECTE GENERALE PRIVIND ENZIMELE AMIOLITICE, PRODUCĂTORII PERSPECTIVI ȘI METODE DE SINTEZĂ ENZIMATICĂ AMELIORATĂ .....</b>	<b>6</b>
<b>2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....</b>	<b>6</b>
2.1. Materiale și obiectul de cercetare.....	6
2.2. Metode de cercetare.....	7
<b>3. STABILIREA PARTICULARITĂȚILOR MORFO-CULTURALE ȘI FIZIOLOGO-BIOCHIMICE ALE TULPINII <i>A. NIGER</i> CNMN FD 06.....</b>	<b>7</b>
3.1. Evaluarea comparativă a capacității de sinteză a amilazelor exocelulare și selectarea mediului optim de cultivare a tulpinii <i>A.niger</i> CNMN FD 06.....	7
3.2. Aspecte morfo-culturale și fiziologo-biochimice ale micromicetei în studiu.....	10
3.3. Stabilirea dependenței biosintezei amilolitice de valorile de t <sup>0</sup> C și durata de cultivare a micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06.....	11
3.4. Concluzii la capitolul 3.....	11
<b>4. AMELIORAREA POTENȚIALULUI DE BIOSINTEZĂ A COMPLEXULUI AMIOLITIC DE CĂTRE TULPINA DE FUNGII <i>A. NIGER</i> CNMN FD 06.....</b>	<b>12</b>
4.1. Influența undelor milimetrice de intensitate joasă asupra biosintezei enzimelor amilolitice la tulpina de micromicete <i>A. niger</i> CNMN FD 06.....	12
4.2. Influența compușilor coordinați ai metalelor de tranziție asupra procesului de biosinteză a amilazelor de către tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06.....	14
4.3. Influența nanooxizilor metalici asupra activității enzimatică la tulpina în studiu	16
4.4. Validarea pilot a biotehnologiilor avansate de obținere a preparatelor enzimatică amilolitice sintetizate de tulpina în studiu.....	17
4.5. Concluzii la capitolul 4.....	18
<b>5. PROCEDEE TEHNOLOGICE INOVATIVE DE OBȚINERE A PREPARATELOR ENZIMATICE AMIOLITICE LA CULTIVAREA AVANSATĂ A TULPINII DE MICROMICETE <i>A. NIGER</i> CNMN FD 06.....</b>	<b>19</b>
5.1. Selectarea condițiilor de separare a complexului enzimatic amilolitic din lichidul cultural al tulpinii <i>A. niger</i> CNMN FD 06.....	19
5.2. Studiarea particularităților de acid-stabilitate a amilazelor sintetizate de producător și de implimentare a preparatului amilazic ca ameliorator în panificație	21
5.3. Concluzii la capitolul 5.....	22
<b>CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....</b>	<b>23</b>
<b>BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....</b>	<b>26</b>
<b>LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI.....</b>	<b>28</b>
<b>ADNOTĂRI (română, rusă, engleză).....</b>	<b>32</b>

## REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

**Actualitatea și importanța temei abordate.** În biotehnologiile moderne cele mai largi utilizări cunosc enzimele din clasa hidrolazelor. Marcate prin particularitatea specifică de a degrada polimerii naturali (amidonul, celuloza, pectina, lipidele) în substanțe mai simple, hidrolazele constituie baza multor tehnologii în diverse domenii.

Piața globală a enzimelor, evaluată în 2021 la peste 11 miliarde USD, rămâne a fi dominată de hidrolaze, în particular de proteaze, amilaze, lipaze și celulaze. Printre acestea, amilazele, catalizatori ai reacției de scindare a amidonului în zaharuri cu masă moleculară mică, prezintă cea mai importantă grupă de enzime utilizată în biotehnologiile performante. Conform datelor din literatura de specialitate ele constituie 30% din volumul total al enzimelor produse la scară industrială. Consumatori al amilazelor sunt industria alimentară, textilă, chimică, medicina, agricultura etc. [9, 10, 13, 14, 16, 20].

Amilazele de origine microbiană prezintă avantaje considerabile față de cele de origine vegetală și animală, datorită productivității înalte a microorganismelor, accesibilității și prețului redus al materiei prime microbiologice [10, 13]. Dintre microorganisme, performanți producători ai complexului amilolitic ( $\alpha$ - și  $\beta$ -amilaza, glucoamilaza) sunt recunoscuți fungii miceliali, îndeosebi reprezentanții genului *Aspergillus* [1, 2, 6, 20]. Avantajul fungilor, ca producători al complexului amilolitic, față de alte microorganisme, o constituie capacitatea lor de a secreta enzimele în mediul de nutriție, simplificând mult tehnicile de recuperare a fermenților din filtratele de cultură [19].

În Republica Moldova enzimele amilolitice sunt antrenate în majoritatea ramurilor tradiționale ale economiei: la fabricarea pâinii și produselor de patiserie, producerea glucozei cristaline și a alcoolului, producerea conservelor și sucurilor din fructe și legume, în vinificație, în producerea berii, în zootehnie, în medicina umană și veterinară, în procesarea amidonului și a materialelor amidonoase. Remarcabil este faptul că preparate enzimatică în Republica Moldova nu se produc, iar necesitățile industriilor în enzime se acoperă prin import.

Elaborarea tehnologiilor de producere a preparatelor enzimatică prin sinteză orientată cu tulpini selectate de fungi în calitate de producători de enzime, stabilirea căilor de dirijare calitativă și cantitativă a potențialului biosintetic, crearea procedeelelor economic avantajoase, ecologic inofensive de reglare și control ale proceselor microbiene sunt actuale, oportune, corespund tendințelor mondiale de dezvoltare a științelor biologice și ale societății.

**Scopul lucrării:** Elaborarea procedeelelor inovative de sinteză orientată a amilazelor extracelulare la cultivarea submersă a tulpinii fungice *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

### **Obiectivele cercetării:**

1. Stabilirea exigențelor nutritive, particularităților morfo-culturale și condițiilor optime de cultivare a tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 06 ca obiect cu potențial biotehnologic;
2. Optimizarea condițiilor de sinteză orientată a enzimelor amilolitice de către tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 06, utilizând ca stimulatori și reglatori de creștere influența iradierii electromagnetice de intensitate joasă în diapazon milimetric, compușii coordinativi ai metalelor și nanoparticulele;
3. Stabilirea parametrilor optimi de separare a preparatului enzimatic amilolitic din lichidul cultural al tulpinii în studiu.

**Ipoteza de cercetare:** Capacitatea de biosinteză orientată a amilazelor exocelulare la tulpina de fungi miceliali *Aspergillus niger* CNMN FD 06, selectată destinat ca producător de enzime amilolitice, valorificată prin evidențierea și argumentarea perspectivei utilizării compușilor coordinativi ai metalelor de tipul „s” și „d”, a compușilor Co (III) cu anioni fluorurați din clasa dioximelor, a nanoparticulelor metalelor Ti, Fe, Cu, Zn și iradierii electromagnetice în diapazon milimetric, asigură creșterea capacității de sinteză microbiană orientată a producătorului și elaborarea strategiilor de sporire a performanțelor tehnologice în cultivarea fungilor miceliali.

### **Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese:**

În conformitate cu scopul și obiectivele trasate, în vederea demonstrării ipotezelor de cercetare înaintate, au fost aplicate metode clasice și moderne de studiu, inclusiv:

- metode microbiologice de identificare a particularităților morfo-culturale și fiziologo-biochimice a culturilor, de cultivare și păstrare a tulpinilor biologice-potențiali producători de produse biologice active;
- metode fizico-chimice (gravimetrice, fotocolorimetrice, spectrofotometrice, potențiometrice) și biochimice clasice și moderne de apreciere a parametrilor tulpinii în studiu, al activității și calității compușilor biologici sintetizați;
- metode standardizate, conform reglementărilor normative de obținere și evaluare a calității enzimelor amilolitice obținute;
- metode de valorificare a cercetărilor la nivel de stație pilot;
- metode matematice de planificare a experimentelor, de analiză comparativă și de evaluare statistică a rentabilității preparatelor amilolitice obținute și tehnologiilor elaborate.

## CONȚINUTUL TEZEI:

### **1. ASPECTE GENERALE PRIVIND ENZIMELE AMILOLITICE, PRODUCĂTORII PERSPECTIVI ȘI METODE DE SINTEZĂ ENZIMATICĂ AMELIORATĂ (Reviul literaturii)**

Studiul analitic al literaturii de specialitate și sinteza celor mai relevante și de ultimă oră cercetări în domeniul tehnologiilor microbiologice, valorificării potențialului de biosinteză enzimatică a microorganismelor ca producători efectivi și de perspectivă a complexelor enzimatică, argumentează actualitatea cercetărilor efectuate, importanța teoretică și practică a investigațiilor de valorificare al potențialului de sinteză orientată a enzimelor amilolitice, detectarea unor noi metode de intensificare a capacității biosintetice a producătorului, elaborarea procedeeelor, tehnologiilor rentabile și efective de sinteză microbiană orientată a enzimelor amilolitice.

Actualitatea și necesitatea obținerii de noi preparate amilolitice, datorită utilizării cu succes a acestora în industriile farmaceutice și alimentare, valorificarea potențialului de sinteză a amilazelor de către micromiceta *A. niger* CNMN FD 06, care rămâne în continuare o sursă promițătoare de compuși biologic activi, este elucidată în sinteza literaturii prezentată în acest capitol și oferă un suport teoretic important pentru cercetările reflectate în capitolele experimentale.

### **2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE**

#### **2.1. Materiale și obiectul de cercetare**

*Obiect de studiu* a servit tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - producătoare de amilaze, păstrată în colecția laboratorului Biotehnologia fungilor și Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie (CNMN).

La etapa de screening al tulpinilor de micromicete din colecția laboratorului, după capacitatea de a sintetiza enzime amilolitice, în cercetare au fost utilizate 37 de tulpini de microorganisme din genurile: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, precum și 14 tulpini izolate din solurile din zona centrală a Republicii Moldova.

Studiile de ameliorare a potențialului biosintetic al tulpinii *A.niger* CNMN FD 06 au fost efectuate în două direcții: cu utilizarea biostimulatorilor de natură chimică (compuși coordinativi ai metalelor de tranziție cu diverși liganzi și nanocompozite) [8] și aplicarea undelor milimetrice de intensitate joasă (UMM). În calitate de sursă de UMM de intensitate joasă a servit generatorul

Iavi-1, cu lungimea de undă ( $\lambda$ ) 5,6-7,1 nm, frecvența 8 și 16 Hz, emise în regim periodic și continuu.

Pentru evidențierea influenței biostimulatorilor de natură chimică asupra sintezei amilazelor la tulpina în studiu au fost testați 32 de *compuși coordinativi* (CC), structurați în 6 grupe: CC ai Zn (II) cu aminoacizi în diferite forme (11 compuși); CC ai Cu (II) cu acetil acetona și picolinați (5 compuși); CC ai Co (II)-ului și Cr (II)-ului (5 compuși); dioximați ai Co (III) cu F (I) (2 compuși); CC ai Co (III) cu liganzi oximici și F (5 compuși); CC heterometalici ai elementelor „s” (4 compuși).

Pentru stabilirea acțiunii *nanooxidilor metalici* asupra dezvoltării tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 și sintezei orientate a enzimelor amilolitice, precum și în vederea verificării parametrilor optimi de aplicare a nanoparticulelor (NP) în diferite concentrații au fost utilizate NP anorganice în special în baza oxidurilor metalice: *nanoparticule de titan*: dioxid de titan ( $\text{TiO}_2$ ), nanopulberi, cu dimensiuni inițiale de 21 nm;  $\text{TiSiO}_4 < 50$  nm și  $\text{TiO}_2 < 100$  nm; *nanoparticule de cupru*: oxid de (CuO) nanopulbere, cu dimensiuni  $< 50$  nm și Cu metalic (99,5%) cu dimensiuni  $< 60-80$  nm; *nanoparticulele oxidului de zinc*: oxid de Zn (II) ( $\text{ZnO} \leq 50$  nm), nanopulbere și *nanoparticulele oxidului de fier*: Fe (II, III) oxid ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  cu dimensiuni de 50 - 100 nm) nanopulbere, oferite de Institutul de Inginerie Electronică și Nanotehnologii „D. Ghițu” și procurate ca reagenți (firma Aldrich).

## **2.2. Metode de cercetare**

Au fost utilizate metode și tehnici adaptate pentru aplicare în investigațiile microbiologice a proceselor de enzimogeneză la micromicete. Studiul particularităților morfologice s-a efectuat pe mediile agarizate Czapek, Reistrich, malț-agar, malț-agar +1% amidon. Optimizarea mediului de cultivare s-a efectuat prin testarea unor rețete de medii nutritive, recomandate în literatură [1, 19], ca optimale pentru cultivarea fungilor.

Cultivarea tulpinii în studiu s-a efectuat în fermentatorul BIOSTAT<sup>R</sup> A plus (*Sartorius*, Germania) cu capacitate de 6,6 L, volumul de lucru 0,6-5 L, viteza de aerare, (L/min.) - 1,3-13,0 viteza de agitare (rpm) 20-100. Dozarea activității enzimelor amilolitice s-a efectuat prin metoda colorimetrică cu iod [19]. Prelucrarea matematică a datelor experimentale și interpretarea grafică a rezultatelor a fost efectuată cu ajutorul programului MS Office (Excel).

## **3. STABILIREA PARTICULARITĂȚILOR MORFO-CULTURALE ȘI FIZIOLOGO-BIOCHIMICE ALE TULPINII *A. NIGER* CNMN FD 06**

### **3.1. Evaluarea comparativă a capacității de sinteză a amilazelor exocelulare și selectarea mediului optim de cultivare a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06**

Compartimentul prezintă rezultatele obținute la identificarea producătorului, cu capacitate maximă de sinteză a amidazelor exocelulare. În acest scop trierilor au fost supuse 51 de tulpini de micromicete din genurile *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, precum și tulpini izolate din solurile din zona centrală a Republicii Moldova. Ca rezultat al screening-ului (realizat în câteva etape) au fost stocate în colecția laboratorului Enzimologie, ca perspectivi producători de amidaze, cu capacitate stabilă de biosinteză, 6 tulpini de micromicete care, în condițiile experimentului (sinteza enzimatică la valori de pH 4,7 și în condiții de aciditate sporită, pH 2,5), au manifestat activitate amidolitică superioară: *A.niger* 412 (49,99 - 97,79 U/mL), *A. niger* 33 (79,63 - 114,14 U/mL), *T. harzianum* (64,40 - 124,09 U/mL), *P. funiculosum* (53,44 - 83,74 U/mL), *P. chrysogenum* (45,59 - 76,63 U/mL), tulpinile nr. 77 (46,16 - 76,11 U/mL), nr. 209 (57,89 - 95,70 U/mL) și tulpina nr. 222 (64,40 - 124,09 U/mL) (Tabelul 3.1.).

**Tabelul 3.1. Evaluarea comparativă a unor tulpini de fungi miceliali după criteriul de sinteză a amidazelor exocelulare pe mediul ce conține inductor (0,3% amidon)**

Nr. crt	Tulpina	Activitatea amidolitică, U/mL					
		pH 4,7			pH 2,5		
		4 zile	6 zile	7 zile	4 zile	6 zile	7 zile
1	<i>Alternaria alternata</i>	8,66	1,89	0,69	19,84	8,32	2,15
2	<i>Aspergillus terreus</i> 65	8,50	14,39	13,98	0,00	16,18	4,89
3	<i>Aspergillus flavus</i> 76	5,058	4,34	6,14	0,00	8,52	8,69
4	<i>Aspergillus flavus</i> 76 (miceliu)	0,00	19,95	36,02	0,00	36,18	83,76
5	<i>Aspergillus niger</i> 33	21,65	49,99	<b>79,63</b>	39,68	94,16	<b>114,14</b>
6	<i>Aspergillus niger</i> 412	10,62	<b>49,99</b>	6,9	61,47	<b>97,79</b>	10,62
7	<i>Aspergillus</i> sp.	7,13	46,16	20,15	30,73	76,11	43,05
8	<i>Aspergillus niger</i> USA MV (RO)	10,50	17,37	19,95	34,28	49,18	48,79
9	<i>Rhizopus arrhizus</i>	1,79	1,89	12,14	0,00	6,14	48,89
10	<i>Rhizopus orizae</i>	6,29	9,48	32,16	2,12	7,29	29,77
11	<i>Penicillium chrysogenum</i>	21,52	25,99	<b>45,59</b>	<b>76,63</b>	54,21	65,94
12	<i>Penicillium funiculosum</i>	9,98	15,75	<b>53,44</b>	43,05	48,13	<b>83,74</b>
13	<i>Trichoderma koningii</i>	7,16	5,74	6,87	0,00	6,87	6,87
14	<i>Trichoderma harzianum</i>	17,89	<b>64,40</b>	20,12	85,26	<b>124,09</b>	43,36
15	<i>Trichoderma lignorum</i>	9,05	25,85	7,60	0,00	2,87	8,52
16	Nr. 77	7,13	<b>46,16</b>	20,15	30,73	<b>76,11</b>	43,05
17	Nr. 209	21,52	15,75	<b>57,89</b>	65,10	72,37	<b>95,70</b>
18	Nr. 222	17,89	<b>64,40</b>	20,12	85,26	<b>124,09</b>	43,36
19	Nr. 228	6,48	18,34	10,84	19,84	30,55	18,84

Astfel, în rezultatul cercetărilor de triere a capacității de sinteză al enzimelor amidolitice, micromiceta *A. niger* 33, care a manifestat rezultate mai stabile, confirmând potențialul superior de activitate amidolitică, inclusiv în condițiile de aciditate sporită (pH 2,5), a fost utilizată în cercetările ulterioare.



În scopul identificării compoziției și abundenței mediului nutritiv, care poate modifica intensitatea proceselor biologice, influențând dezvoltarea și activitatea biosintetică a celulei microbiene și biosinteza enzimelor amilolitice, au fost utilizate la cultivarea submersă a producătorului șase medii nutritive (nr. 1 - nr. 6), recomandate de Graciouva I.M., (1989) [19] care conțin 2% de amidon sau făină de porumb (3%) în diverse combinații cu malț (1%), boabe de soia (1%) sau extract de porumb (1%). Partea minerală al acestor medii conține sărurile de  $MgSO_4$ ,  $KCl$  și  $CaCl_2$ . De importanță este conținutul  $(NH_4)_2HPO_4$  în aceste medii, astfel cum, în conformitate cu datele din literatura de specialitate [14, 16, 19, 20], utilizarea acestor substanțe în calitate de sursă de azot intensifică semnificativ biosinteza compușilor biologici. Mediile nutritive (nr.7 și nr.8), recomandate ca optimale pentru obținerea de amilaze de A. Anghel și col., (1988) [1] conțin făină de fasole sau făină de porumb, amidon, tărațe de grâu și aceleași săruri minerale ca și mediile menționate anterior. În calitate de martor a servit mediul Czapek modificat, care conține în calitate de inductor amidon (3%). Rezultatele (Tabelul 3.2.) arată că mediile testate nr. 1, 4 și 8 sunt foarte favorabile pentru tulpina *A. niger* CNMN FD 06, activitatea amilolitică constituind, respectiv 77,60 U/mL, 88,30 U/mL, și 143,40 U/mL.

**Tabelul 3.2. Activitatea amilolitică a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 pe medii nutritive cu diferite surse de amidon**

Numărul și compoziția mediului de cultură, (g/L)	Activitatea amilolitică	
	U/mL	% față de martor
<b>Nr.1.</b> amidon - 4; extract de porumb - 10; $MgSO_4$ - 0,5; $KCl$ - 1,5; $CaCl_2$ - 0,1; $(NH_4)_2HPO_4$ - 9,0	<b>88,30 ±0,11</b>	<b>961,87</b>
<b>Nr.2.</b> amidon - 4,0; malț - 2,0; $MgSO_4$ - 0,5; $KCl$ - 1,5; $CaCl_2$ - 0,1; $(NH_4)_2HPO_4$ - 9,0	21,10±0,07	229,84
<b>Nr.3.</b> amidon - 4,0; făină soia - 2,0; $MgSO_4$ - 0,5; $KCl$ - 1,5; $CaCl_2$ - 0,1; $(NH_4)_2HPO_4$ - 9,0	13,67±0,01	148,91
<b>Nr.4.</b> făină de porumb - 6,0; extract de porumb - 10,0; $MgSO_4$ - 0,5; $KCl$ - 1,5; $CaCl_2$ - 0,1; $(NH_4)_2HPO_4$ - 9,0	<b>77,60±0,15</b>	<b>845,31</b>
<b>Nr.5.</b> făină de porumb - 6,0; malț - 2,0; $MgSO_4$ - 0,5; $KCl$ - 1,5; $CaCl_2$ - 0,1; $(NH_4)_2HPO_4$ - 9,0	13,85±0,35	148,91
<b>Nr.6.</b> făină de porumb - 6,0; boabe de soia - 2,0; $MgSO_4$ - 0,5; $KCl$ - 1,5; $CaCl_2$ - 0,1; $(NH_4)_2HPO_4$ - 9,0	10,40±0,02	113,28
<b>Nr. 7.</b> făină de porumb - 4,0; făină de fasole - 0,6; tărațe de grâu - 1,4; $KH_2PO_4$ - 0,5; $CaCl_2$ - 0,5	6,33±0,41	68,95
<b>Nr.8.</b> amidon - 0,6; făină de fasole - 1,8; tărațe de grâu - 3,6; $MgSO_4$ - 0,4875; $KCl$ - 0,4875; $KH_2PO_4$ - 1,05	<b>143,40±0,07</b>	<b>1562,09</b>
<b>Nr.9. control</b> , mediul Czapek îmbogățit cu amidon - 3,0; $NaNO_3$ - 0,9; $FeSO_4$ - 0,001; $KH_2PO_4$ - 0,1; $MgSO_4$ - 0,05; $KCl$ - 0,09; apă din robinet.	9,18±0,19	100

Astfel, a fost confirmat experimental că, pentru obținerea complexului amilolitic, optimale sunt mediile de cultură care includ în compoziția lor diverse raporturi - făină și extract de porumb, amidon, făină de fasole și tărațe de grâu. Orice schimbare a compoziției mediului de

cultură, care reduce consumul de materie primă sau energie, utilizarea în calitate de materie primă a deșeurilor și valorificarea acestora este considerată mai ecologică și mai de perspectivă pentru biotehnologie și economiile sustenabile.

### 3.2. Aspecte morfo-culturale și fiziologo-biochimice ale micromicetei în studiu

Particularitățile morfologice de bază ale coloniilor micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 au fost studiate pe diferite medii nutritive: mediul Reistrich, extract de malț agarizat, mediul Czapek agarizat, dar cea mai favorabilă creștere a fost urmărită la cultivarea micromicetei pe medii nutritive ce conțin extract de *malț-agar* suplimentat cu 1% de amidon. Totodată, deoarece variabilitatea naturală poate duce la pierderea proprietăților biosintetice prețioase, la degenerarea tulpinii, dar și la apariția în populație a unor variante cu proprietăți sintetice superioare [2, 4], proces condiționat de adaptarea organismului la condițiile de mediu, s-au efectuat cercetări în vederea identificării, selectării, separării și studierii capacității de hidroliză enzimatică ale diferitor variante morfo-coloniale identificate la tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06.

Cultivarea tulpinii în studiu pe mediul Czapek agarizat, suplimentat cu 1% de amidon, a permis identificarea coloniilor morfologic distincte, notate simbolic prin A, B, C, D. Pentru a stabili dacă aspectele morfologice și capacitățile de enzimogeneză a complexului amilolitic ale fiecărui tip de colonie identificat se mențin în timp a fost efectuată testarea activității amilolitice în trei etape. În calitate de martor a servit tulpina inițială *A.niger* 33.

În toate etapele de testare (Tab 3.3.), capacitatea mai sporită de enzimogeneză amilolitică a fost remarcată la varianta **A**, care a manifestat potențial înalt și stabil de sinteză a enzimelor amilolitice la ambele valori de pH, înregistrând o creștere, față de martor, cu 88,35 U/mL pentru hidroliza la pH 4,7 și cu 124,67 U/mL (*etapa III*) la hidroliza amilazelor acid-stabile (pH 2,5).

**Tab.3.3. Dinamica activității amilolitice (U/mL), manifestată la variantele separate la tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06**

Variantele modificate	Etapa I		Etapa II		Etapa III	
	pH 2,5	pH 4,7	pH 2,5	pH 4,7	pH 2,5	pH 4,7
<b>A</b>	190,44±0,03	110,60 ±0,05	180,47±0,07	169,58 ±0,03	<b>243,53±0,04</b>	<b>197,04 ±0,02</b>
<b>B</b>	165,22±0,01	78,05±0,02	141,25±0,01	147,78±0,01	206,62±0,01	149,96±0,04
<b>C</b>	152,14±0,02	62,02±0,01	129, 58±0,10	97,66±0,05	123,22±0,08	96,52±0,01
<b>D</b>	178,29±0,07	56,26±0,05	156,50±0,14	139,07±0,05	184,83±0,07	160,86±0,04
<b>Martor</b>	96,01±0,01	86,77±0,01	115,09±0,01	97,66±0,02	118,86±0,01	108,69±0,02

Astfel studiul variabilității naturale a tulpinii în studiu a permis segregarea culturii în variante morfologice distincte, identificarea și izolarea variantei morfologice cu cel mai înalt

potențial de sinteză enzimatică, manifestat pentru ambele tipuri de amilaze acid-labile (197,04 U/mL) și acid-stabile (243,53 U/mL). Varianta selectată a fost depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene cu cifrul atribuit CNMN FD 06 și a fost selectată ca potențial producător de enzime amilolitice (*Brevet MD 2836. BOPI. Nr.8. 2005*).

### 3.3. Stabilirea dependenței biosintezei amilolitice de valorile de $t^{\circ}\text{C}$ și durata de cultivare a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06

Determinarea temperaturii optime de cultivare, care favorizează sinteza maximală a amilazelor extracelulare s-a realizat prin cultivarea tulpinii la trei regimuri de temperatură ( $20^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$  și  $40^{\circ}\text{C}$ ) fiind determinate, pe parcursul a 2-9 zile de cultivare, valoarea pH-ului lichidului de cultivare și activitatea amilolitică la două valori de pH 2,5 și 4,7. A fost stabilit că la temperaturi mai scăzute ( $20^{\circ}\text{C}$ ) procesele de biosinteză sunt lente. Prima manifestare a activității amilazelor se înregistrează în a șasea zi de cultivare. Totodată, putem remarca că, în procesul de cultivare submersă, pH-ul lichidului cultural al micromicetei în studiu deviază pe parcursul cultivării de la valoarea inițială 5,00, oscilând în limitele 3,62-6,15 la  $t=20^{\circ}\text{C}$ , 4,55-7,03 la  $t=30^{\circ}\text{C}$  și 4,6-6,11 la  $t=40^{\circ}\text{C}$ . În acest mod am constatat că, micromiceta își ajustează pH-ul mediului de cultură în funcție de temperatura de cultivare și intensitatea procesului de enzimogeneză.

Mărirea temperaturii de cultivare a micromicetei cu  $10^{\circ}\text{C}$  (de la  $20^{\circ}\text{C}$  la  $30^{\circ}\text{C}$ ) indică maxime mai pronunțate de activitate în ziua a 6-a de cultivare - 97,07 U/mL pentru amilazele acidlabile (pH 4,7) și 114,5 U/mL pentru amilazele acidstabile (pH 2,5). Rezultatele cercetărilor confirmă faptul că, valoarea optimă de cultivare a tulpinii este temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  (Tab. 3.4.).

**Tabelul 3.4. Biosinteza amilazelor extracelulare la tulpina *A. niger* CNMN FD 06 la diferite valori de temperatură ( $20^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$  și  $40^{\circ}\text{C}$ )**

Activitatea amilolitică a tulpinii în studiu (U/mL), în funcție de durata cultivării (zile)						
Valorile de $t^{\circ}\text{C}$	$20^{\circ}\text{C}$		$30^{\circ}\text{C}$		$40^{\circ}\text{C}$	
	pH 2,5	pH 4,7	pH 2,5	pH 4,7	pH 2,5	pH 4,7
II-ua	0	0	0	1,86±0,02	44,90±0,0	0
III-ea	1,43±0,10	0	55,79±0,10	32,55±0,08	42,72±0,10	26,02±0,09
IV-a	10,72±0,05	5,64±0,08	95,62±0,00	76,73±0,09	31,80±0,11	18,03±0,08
V-ea	11,16±0,09	6,37±0,10	99,98±0,03	76,73±0,06	29,65±0,01	13,67±0,10
VI-a	49,13±0,01	34,60±0,06	<b>114,50±0,02</b>	<b>97,07±0,08</b>	62,34±0,06	41,27±0,05
VII-a	75,28±0,04	63,66±0,07	102,88±0,08	76,73±0,07	18,75±0,00	40,22±0,03
VIII-a	76,73±0,12	65,11±0,07	85,45±0,11	59,29±0,10	57,98±0,10	30,37±0,14
IX-ua	110,15±0,05	91,26±0,07	99,98±0,08	99,98±0,08	99,36±0,01	62,47±0,10

### **Concluzii la capitolul 3**

1. Au fost selectate și incluse în colecția laboratorului Enzimologie ca perspective producători de amilaze exocelulare cu capacitate înaltă și stabilă de biosinteză al amilazelor exocelulare 6 tulpini de micromicetre, care, în condițiile experimentului, au manifestat activitate amilolitică superioară: *A. niger* 412 (49,99 - 97,79 U/mL), *A. niger* 33 (79,63 - 114,14 U/mL), *T.harzianum* (64,40 - 124,09 U/mL), tulpinile nr. 77 (46,16 - 76,11 U/mL), nr. 209 (57,89 - 95,70 U/mL), nr. 222 (64,40 - 124,09 U/mL).

2. Studiarea variabilității naturale a tulpinii în studiu, a relevat varianta **A** ca fiind cea mai productivă din punct de vedere al sintezei enzimelor amilolitice, atât în condiții standard (pH 4,7), cât și în condiții mai acide (pH 2,5), depășind martorul cu 14,23-97,42% respectiv. Varianta distinctă a tulpinii a fost depozitată în CNMN ca *A. niger* CNMN FD 06 și utilizată în cercetările ulterioare;

3. Au fost identificate 3 medii de cultură favorabile pentru creșterea și biosineza amilazelor de către tulpina *A. niger* CNMN FD 06.

## **4. AMELIORAREA POTENȚIALULUI DE BIOSINTEZĂ A COMPLEXULUI AMILOLITIC DE CĂTRE TULPINA DE FUNGII *A. NIGER* CNMN FD 06**

### **4.1. Influența undelor milimetrice de intensitate joasă asupra biosintezei enzimelor amilolitice la tulpina de micromicete *A. niger* CNMN FD 06.**

Cercetările de evaluare a influenței undelor milimetrice (UMM) de intensitate joasă în diferite regimuri asupra tulpinii în studiu au urmărit determinarea atât a efectului general al UMM asupra sistemului enzimatic amilolitic, sintetizat de producător, cât și efectul asupra însușirii de stabilitate a enzimelor. Unii cercetători Deveatcov N.D, Betskii O.V., (1994) [3], Betskii O.V., ș.a. (2004) [17], Бурцева S.A. ș.a. (2007) [18], Ciloci A.A. ș.a., (2011) [7], Lin Pey-Jin ș.a. (2023) [11] susțin că iradierea cu UMM a culturilor de microorganisme eucariote intensifică creșterea celulelor, micșorează lag-faza, stimulează sinteza compușilor biologic activi și pot influența metabolismul celulei microbiene. Influența benefică a UMM de intensitate mică a fost expusă de un șir de autori [17, 21, 22], care susțin că, în urma acțiunii undelor milimetrice are loc modificarea funcției de transport a membranelor celulare intensificându-se metabolismul celular, urmat de sporirea vitezei de transport a substanțelor nutritive și stimularea proceselor de formare a produselor metabolice, respectiv de sinteză a substanțelor bioactive.

Efectului produs de UMM asupra activității enzimatice a culturii în studiu, în funcție de durata tratării și regimul de emiterie sunt prezentate în Tab. 4.1. Rezultatele obținute marchează sporirea activității amilazelor față de martor (ziua a 6-a de cultivare) în toate variantele

experimentului cu 13,0 - 65,01%, efectul variind în funcție de durata tratării și regimul de emiterie. Rezultate remarcabile au fost înregistrate în variantele de emiterie de impulsuri cu frecvența de 16 Hz, durata tratării de 15-20 de minute (cu un spor de 45,53- 65,01%), precum și în regim continuu, respectiv la durata de tratare de 20-30 de minute (cu un spor de 60,71- 63,59%).

**Tabelul 4.1. Modificarea activității amilolitice a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06, în funcție de influența UMM de intensitate joasă, în diferite regimuri de emiterie (pH 4,7)**

Regimul	Durata iradierii (min)	Activitatea amilolitică					
		a 5-ea zi		a 6-a zi		a 7-a zi	
		U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%
8 Hz	10	132,91±0,01	96,10	175,87±0,02	107,58	165,94±0,08	144,98
	15	152,80±0,12	110,49	184,68±0,07	113,00	166,20±0,07	145,21
	20	162,34±0,08	<b>117,39</b>	211,78±0,08	<b>129,58</b>	179,65±0,03	156,96
	30	159,22±0,03	115,13	198,07±0,01	121,17	173,75±0,12	151,81
16 Hz	10	155,33±0,06	112,32	196,97±0,01	120,51	183,15±0,04	160,02
	15	194,67±0,10	140,76	237,86±0,09	145,53	184,21±0,04	160,95
	20	199,67±0,11	<b>144,38</b>	269,70±0,06	<b>165,01</b>	184,15±0,03	160,89
	30	173,02±0,08	125,11	193,09±0,08	118,14	182,12±0,01	159,12
Fracționat	10	143,03±0,09	103,42	179,49±0,10	109,82	147,85±0,02	129,18
	15	172,20±0,02	124,52	189,59±0,12	116,00	180,56±0,03	157,76
	20	240,11±0,05	<b>173,62</b>	255,61±0,11	<b>156,39</b>	202,38±0,01	176,82
	30	233,54±0,11	168,87	234,29±0,03	143,34	177,27±0,08	154,88
Continuu	10	192,15±0,01	138,94	211,69±0,04	129,52	173,03±0,10	151,18
	15	216,26±0,08	156,38	229,43±0,07	140,37	207,83±0,00	181,59
	20	246,23±0,12	<b>178,05</b>	267,37±0,05	<b>163,59</b>	219,60±0,02	191,87
	30	223,05±0,00	161,29	262,67±0,12	160,71	216,36±0,03	189,04
Martor	0	138,29±0,02	100	163,44±0,08	100	114,45±0,01	100

Dozarea activității amilazelor, în condiții standard de hidroliză (pH 4,7) și în condiții de aciditate sportită (pH 2,5), atestă că UMM nu modifică însușirea de acid-stabilitate prin care se distinge tulpina *A. niger* CNMN FD 06 (Tab.4.1).

**Tabelul 4.2. Influența UMM de intensitate joasă asupra acidstabilității amilazelor sintetizate de tulpina *A.niger* CNMN FD 06**

Regimul de iradiere	Durata de iradiere, min	Activitatea amilolitică			
		pH 4,7		pH 2,5	
		U/mL	%	U/mL	%
16 Hz	10	196,97±0,01	120,51	178,31±0,07	104,82
	15	237,86±0,02	145,53	206,62±0,01	121,46
	20	<b>269,70±0,08</b>	<b>165,01</b>	<b>253,12±0,04</b>	<b>148,79</b>
	30	193,09±0,02	118,14	180,47±0,03	106,09
Continuu	10	211,69±0,03	129,52	<b>189,59±0,10</b>	111,45
	15	229,43±0,10	140,37	236,10±0,11	138,79
	20	<b>267,37±0,05</b>	<b>163,58</b>	<b>243,53±0,08</b>	<b>143,16</b>
	30	262,67±0,07	160,71	221,18±0,03	130,02
Martor	0	163,44±0,04	100	170,11±0,02	100

S-a stabilit că, la acțiunea UMM cu impulsuri de 16Hz, activitatea amilazică la valoarea pH-ului 4,7 variază în limitele 196,97-267,37 U/mL, iar la pH-ul 2,5 se marchează valori de 178,31-253,12 U/mL, în funcție de durata iradierii (tabelul 4.2.). Similar se urmărește în varianta de emiterie a UMM în regim continuu – activitatea amilazelor la pH 4,7 a fost de 211,69-267,37 U/mL comparativ cu 189,59-243,53 U/mL la pH 2,5.

Astfel a fost stabilită influența benefică a UMM atermice asupra biosintezei amilazelor la tulpina *A. niger* CNMN FD 06 și stabilită corelația de manifestare a efectului biologic în funcție de regimul de emiterie a undelor și durata tratării.

#### 4.2. Influența compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție asupra procesului de biosinteză a amilazelor de către tulpina *A. niger* CNMN FD 06

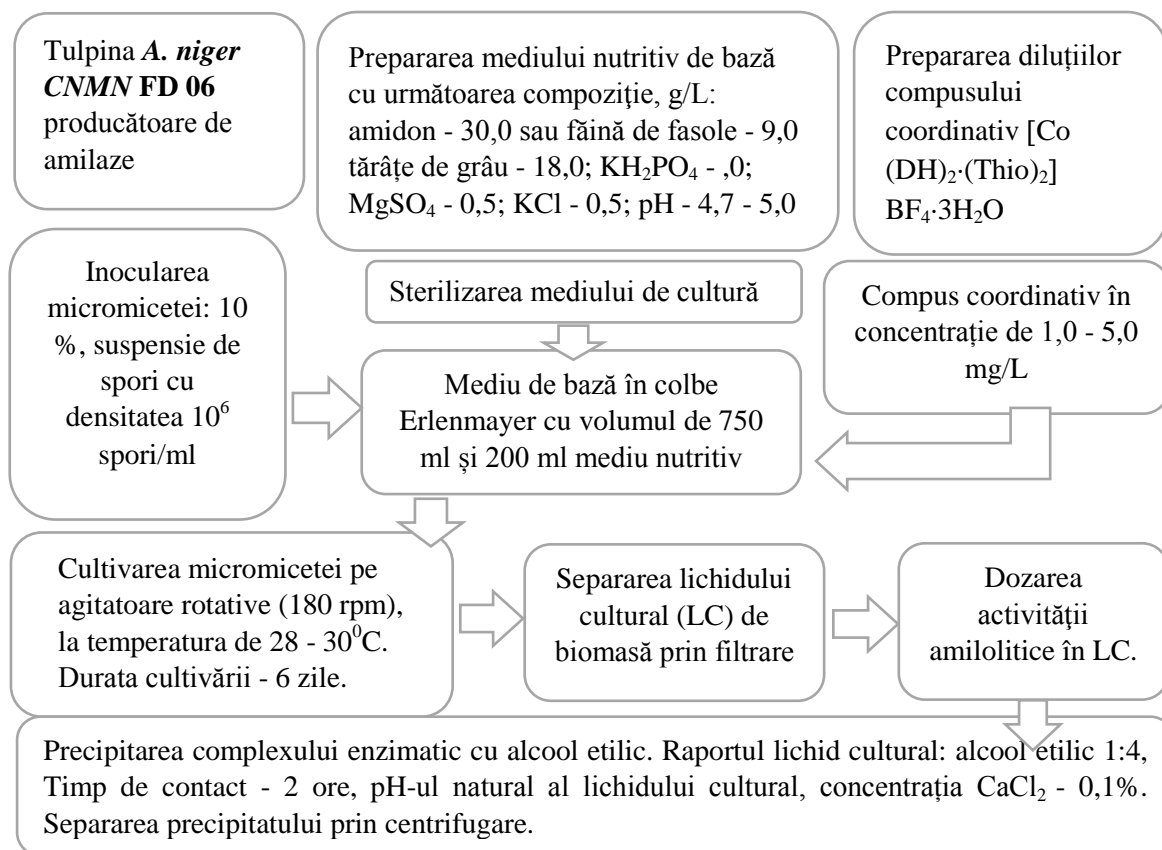
Biosinteza compușilor biologic activi de către microorganisme poate fi reglată și orientată prin selectarea condițiilor favorabile de cultivare, optimizarea compoziției mediului nutritiv cu utilizarea compușilor coordinativi și nanooxidilor metalici [5, 8, 12, 15]. Stabilirea influenței compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție asupra capacității biosintetice a tulpinii fungice *A. niger* CNMN FD 06 s-a realizat prin testarea a 32 de compuși coordinativi. Rezultate remarcabile au prezentat *compușii coordinativi ai Co (III)* (Tabelul 4.3.).

**Tabelul 4.3. Influența dioximaților Co (III) cu F (I) asupra activității enzimatică a micromicetei în studiu**

Compușii coordinativi, (CC)	Concentrația (CC), (mg/L)	<i>A. niger</i> CNMN FD 06	
		Activitatea amilolitică, U/mL	%, față de control
[Co(DH) <sub>2</sub> (Thio) <sub>2</sub> ]3F[SiF <sub>6</sub> ] <sub>x</sub> 1,5H <sub>2</sub> O (I)	1	51,99±0,01	115,79
	5	54,03±0,03	120,33
	10	57,80±0,01	<b>128,73</b>
[Co(DH) <sub>2</sub> (Thio) <sub>2</sub> ]2[SiF <sub>6</sub> ] <sub>x</sub> 3H <sub>2</sub> O (II)	1	52,13±0,01	116,10
	5	53,71±0,02	119,62
	10	56,69±0,06	<b>126,25</b>
[Co(DH) <sub>2</sub> (Thio) <sub>2</sub> ]F 3H <sub>2</sub> O (III)	1	60,1±0,01	133,85
	5	61,5±0,02	136,97
	10	62,3±0,07	<b>138,75</b>
[Co(DH) <sub>2</sub> (Thio) <sub>2</sub> ]BF <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O (IV)	1	61,6±0,02	137,19
	5	<b>63,6±0,03</b>	<b>141,65</b>
	10	58,7±0,15	130,73
[Co(DH) <sub>2</sub> (Py) <sub>2</sub> ]BF <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (V)	1	63,0±0,18	<b>140,31</b>
	5	60,1±0,07	133,85
	10	63,0±0,04	140,31
Control	0	44,9±0,02	100

Sporirea maximă a activității amilolitice în mediul de cultură se remarcă la adăugarea a 5 mg/L de [Co(DH)<sub>2</sub>(Thio)<sub>2</sub>]BF<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O și constituie 41,65% față de martor. Deși compușii

complecși conțin în calitate de atom de coordonare ionul de Co (III), totuși acțiunea lor asupra biosintezei amilazelor variază de la un compus la altul, ceea ce permite să concluzionăm că influența stimulatoră este asigurată de structura compusului și liganzii, care înconjoară atomii de metal. Testarea influenței diferitor compuși coordonativi asupra activității amilolitice a tulpini în studiu, a permis evidențierea acțiunii compusului coordonativ  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2]\text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . În baza acestor rezultate a fost obținut *Brevetul de invenție MD Nr.2833. BOPI. Nr.8. 2005* și elaborat procedeul de sinteză orientată a amilazelor (Fig. 4.1.).

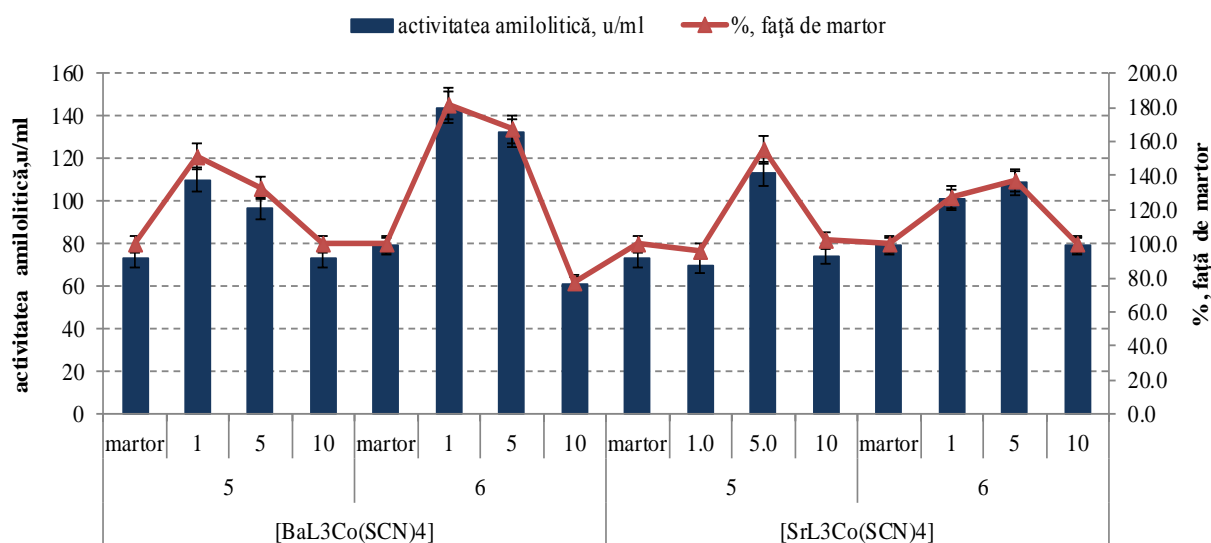


**Fig. 4.1. Schema de realizare a procedeului de cultivare a tulpinii de micromicete *A. niger* CNMN FD 06 în prezența biostimulatorului de origine chimică**

Procedeul elaborat asigură următoarele *avantaje*: sporirea activității amilazelor cu 37,19 - 41,65%, reducerea ciclului de cultivare cu 24 de ore, posibilitatea programării compoziției complexului amilolitic privind raportul amilazelor acid-labile/acid-stabile și se recomandă pentru cultivarea micromicetei producătoare în scopul obținerii preparatelor amilolitice autohtone cu randament sporit și competitive pentru utilizare în biotehnologiile moderne.

Cercetările pentru stabilirea influenței compușilor coordonativi heterometalici ai elementelor „s” asupra biosintezei enzimelor amilolitice la tulpina *A. niger* CNMN FD 06 au fost realizate în baza compușilor coordonativi ai Ba, Sr, Ca, care prezintă compuși heterometalici ai elementelor „s” cu cobalt: s-Co (III), unde „s” este Ba, Sr, Ca și liganzul polidentat L<sup>3</sup> (esterul

dimetilic al acidului 2,6-piridindicarboxilic). În baza rezultatelor (Fig. 4.2.) s-a constatat că compusul Ba, în concentrație de 1mg/L și 5 mg/L, influențează pozitiv acumularea amilazelor la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06 pe parcursul cultivării (ziua a 5-ea și a 6-a), activitatea variind între 96,68 - 110,08 U/mL în ziua a 5-ea și 132,15 - 143,94 U/mL în ziua a 6-a, comparativ cu nivelul de 72,86 și 79,09 U/mL, marcat la proba martor în zilele respective. Sporul activității enzimactice, asigurat de suplimentarea mediului cu compusul Ba, a variat între 32,7 - 82,0% față de martor.



**Fig. 4.2. Influența compușilor coordinați ai Ba și Sr, în diferite concentrații, asupra activității amilolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06**

Deducem că utilizarea heterometalocomplexilor „s” cu liganzi polidentatiți: [BaL<sup>3</sup>][Co(NCS)<sub>4</sub>] și [SrL<sup>3</sup>][Co(NCS)<sub>4</sub>], în concentrații mici (1,0 și 5,0 mg/L), manifestă influență cert stimulatorie și de intensificare a biosintezei amilazelor exocelulare la tulpina în studiu, depășind maxima martorului și asigurând reducerea ciclului tehnologic cu 24 de ore.

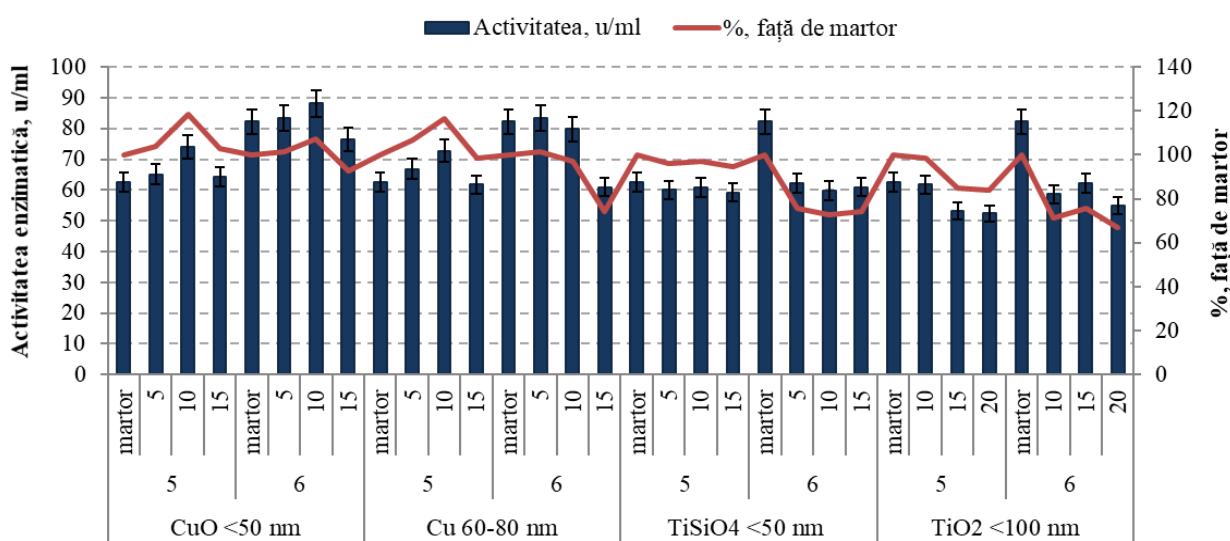
#### 4.3. Influența nanooxidilor metalici asupra activității enzimactice la tulpina în studiu

Cercetările asupra influenței NP anorganice: TiO<sub>2</sub>, TiSiO<sub>4</sub>, CuO, Cu metalic (99,5%), ZnO și NP oxidilor de Fe (II și III), în diferite concentrații, asupra sintezei amilazelor exocelulare la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06, au demonstrat că NP de Cu cu dimensiuni de 60-80 nm, nanooxidii CuO <50 nm, TiO<sub>2</sub> <100 nm și TiSiO<sub>4</sub> <50 nm, stimulează activitatea amilolitică la micromiceta în studiu [8]. Conform datelor din Figura 4.3, maximul activității amilolitice a producătorului se manifestă în ziua a 6-a de cultivare, constituind 82,23 U/mL în proba de referință și 58,61 - 88,14 U/mL în variantele experimentale, față de 62,55 U/mL și, respectiv, 52,38 - 74,00 U/mL marcate în ziua a 5-ea de cultivare. În ziua a 6-a cele mai înalte valori ale



activității enzimatice au fost marcate la probele cultivate în prezența nanooxidului de Cu, activitatea variind între 76,33 - 88,14 U/mL, ceea ce constituie 92,8 - 107,2% față de martor.

Deducem că, utilizarea nanoparticulelor CuO <50 nm și Cu cu dimensiuni de 60-80 nm și NP de Ti de diferite dimensiuni (TiSiO<sub>4</sub> <50 nm, TiO<sub>2</sub><100 nm) în concentrații de 5-10 mg/L, asigură activitatea sporită a amilazelor în ziua a 5-ea de cultivare. Reieșind din tendințele certe de sporire a activității amilolitice și de reducere a duratei de cultivare, remarcăm NP testate ca potențiali biostimulatori ai biosintezei amilazelor exocelulare la micromiceta în studiu.



**Fig. 4.3. Influența nanoparticulelor oxidului de Cu și Ti, în diferite concentrații, asupra activității amilolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06**

#### 4.4. Validarea pilot a biotehnologiilor avansate de obținere a preparatelor enzimatică amilolitice sintetizate de tulpina în studiu

Cercetările de valorificare a biotehnologiilor avansate în vederea validării rezultatelor și stabilirii parametrilor tehnologici principali: concentrația O<sub>2</sub> dizolvat, viteza de agitare, intensitatea de aerare, durata ciclului biologic s-au realizat prin cultivarea submersă a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 în condiții de stație pilot. Activitatea enzimatică s-a evaluat în dinamică pe parcursul a 4 - 6 zile de cultivare.

În condiții de stație pilot s-a constatat că, compusul [Ba(L)<sub>3</sub>][Co(SCN)<sub>4</sub>] exercită efect pozitiv asupra acumulării amilazelor în ziua a 5-ea și a 6-a de cultivare, activitatea constituind 73,85 și, respectiv, 84,33 U/mL, cu un spor de 24,6 și respectiv 14,3% față de control (Tab. 4.4).

Totodată s-a stabilit că, la reducerea numărului de rotații până la 100 rpm, activitatea amilolitică a constituit 113,55 și respectiv 136,08 U/mL, respectiv, în a 5-ea și a 6-a zi de cultivare, sporul activității enzimatice asigurat de suplimentarea mediului cu metalocomplexul bariului fiind 91,6 și 84,4% față de control, probele de referință din aceeași zi.

**Tabelul 4.4. Dinamica activității amilolitice la tulpina de micromicete *A. niger* CNMN FD 06 la cultivare avansată cu aplicarea compusului coordinativ  $[Ba(L)_3][Co(SCN)_4]$ , conc. 1 mg/L, în condiții de stație pilot**

Condiții de agitare	Activitatea amilolitică, U/mL			
	a 5-ea zi	%, față de control	a 6-a zi	%, față de control
<b>180 rpm</b>	73.85± 0.05	124.6	84.33± 0.06	114.3
<b>100 rpm</b>	113.55± 0.05	<b>191.6/ 153.9*</b>	136.08± 0.07	<b>184.4</b>
<b>Control</b>	59.28±0.05	100,0	73.80± 0.12	100,0

\*% față de martorul zilei/față de maxima martorului (ziua a 6-a)

De remarcat că în ziua a 5-ea de cultivare activitatea amilolitică a depășit nivelul maximal al probei control relevat în ziua a 6-a, sporul activității în raport cu acesta constituind 53,9%.

Astfel, în premieră, prin cercetări în condiții de stație pilot, au fost stabiliți parametri tehnologici principali (concentrația  $O_2$  dizolvat, viteza de agitare, durata ciclului biologic) la cultivarea avansată a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 cu aplicarea compuşilor coordinativi ai  $Ba L^3$  și  $Sr L^3$  și nanooxizilor de Cu și Ti, care permit intensificarea procesului de biosinteză a amilazelor, cu reducerea ciclului tehnologic cu 24-48 de ore și sporirea semnificativă al activității amilolitice, comparativ cu activitatea martorului.

#### 4.5. Concluzii la capitolul 4

1. Utilizarea undelor milimetrice de intensitate joasă a demonstrat influență stimuloare asupra procesului de biosinteză a amilazelor la tulpina *A. niger* CNMN FD 06. În funcție de regimul emiterii și durata tratării, iradierea cu UMM atermice stimulează cu 13,0-65,0% biosinteza amilazelor la tulpina *A. niger* CNMN FD 06. Optimal pentru sporirea sintezei amilazelor acid-labile (cu 63,5 - 65,05%) și acid-stabile (cu 48,9 - 43,2%) a fost iradierea cu UMM în regim continuu, frecvența de 16Hz, timp de 20-30 minute.

2. Compușii coordinativi pot acționa diferit asupra procesului de biosinteză a amilazelor, manifestând:

- *efect de inhibare* (sub valorile martorului) la utilizarea DL Serinat Zn (II), L Serinat Zn (II), DL Alaninat Zn (II), L Alaninat Zn (II), D Alaninat Zn (II), DL Alaninat DL Serinat Zn (II), Glicinat L Serinat Zn (II), ai Co (II) și Cr (II). Cea mai semnificativă inhibare a procesului de amilogeneză a fost stabilită la utilizarea L Serinat Zn (II) – doar 13,93% față de martor (100%);

- *efect neutru* sau la nivelul martorului au manifestat compușii coordinativi Glicinat DL Serinat Zn (II), Glicinat D Serinat Zn (II) și  $Zn (PC)_2 \cdot 4H_2O$ ;

- *efect de stimulare* a biosintezei s-a remarcat la adăugarea dioximaților cobaltului cu fluor ( $[Co(DH)_2(Thio)_2] 3F[SiF_6] 1,5H_2O$  și  $[Co(DH)_2(Thio)_2] 2[SiF_6] 3H_2O$ )), compuşilor

coordinativi ai Co (III) ( $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2]\text{F} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2]\text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Py})_2]\text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) și compușilor coordinativi ai Co (III) cu liganzi oximici ( $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2] \cdot 3\text{F}[\text{SiF}_6] \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$  (I),  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2]_2[\text{SiF}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (II)).

- compusul  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  în concentrații de 5,0 mg/L, în condițiile experimentului, asigură activitatea maximală a amilazelor acid-labile, depășind valorile matorului cu 41,65%, fapt valorificat prin brevet de invenție (*Brevet de invenție MD Nr. 2833. BOPI. Nr.8. 2005*);

- *efect stimulator* de 41,1% față de matorul zilei (70,92 U/mL) la aplicarea  $\text{Ba L}^3$  în concentrație de 5 mg/L. Mărirea concentrației până la 10 mg/L și 15 mg/L provoacă *efect de inhibare*, care crește odată cu creșterea duratei de cultivare a producentului, constituind 9,0% (ziua a 5-ea), 23,6% și 39,4% (ziua a 6-a), 42,5 și 56,7% (ziua a 7-a) în raport cu matorul zilei;

- *efect stimulator* s-a remarcat în ziua a 5-ea de cultivare, în mărime de 57,1% față de matorul zilei la adăugarea, în mediul de cultură a 5 mg/L de compus coordinativ al  $\text{Sr L}^3$ .

3. Utilizarea NP dioxidului de titan de diferite dimensiuni ( $\text{TiO}_2$  21 nm;  $\text{TiO}_2 < 100$  nm;  $\text{TiSiO}_4 < 50$  nm) asigură activitate sporită a amilazelor în ziua a 5-ea de cultivare, în toate variantele de concentrații testate. Aplicarea nanoparticulelor de  $\text{TiO}_2 < 100$  nm, sporește activitatea cu 24,06-30,44 U/mL, iar în variantele cu nanoparticule de  $\text{TiSiO}_4$  cu dimensiuni  $< 50$  nm cu 23,27-30,29 U/mL.

4. Aplicarea NP de  $\text{CuO}$  și  $\text{Cu}$ , în concentrație de 10 mg/L asigură obținerea preparatelor enzimactice amilolitice cu activitate înaltă în termeni restrânși (cu 24 ore mai devreme față de mator) și, respectiv, cu cheltuieli reduse.

5. Valorificarea rezultatelor obținute prin transferul tehnologiei avansate de cultivare a micromicetei în studiu în prezența NP de  $\text{TiO}_2$  (100 nm), în condiții de stație pilot, a demonstrat depășirea matorului cu 43,7% în a 5-ea zi de cultivare, fapt ce oferă oportunitatea obținerii preparatelor enzimactice cu activitate amilolitică sporită, cu reducerea ciclului tehnologic de cultivare a producătorului cu 24 de ore.

6. Ajustarea regimului de cultivare a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 prin reducerea vitezei de agitare de la 180 rpm la 100 rpm, utilizarea efectului stimulator a compușilor coordinativi ai  $\text{Ba}$  și  $\text{Sr}$  cu ligand polidentat și nanooxizilor de  $\text{Cu}$  și  $\text{Ti}$ , asigură intensificarea procesului de biosinteză a amilazelor și permite reducerea ciclului tehnologic cu 24 – 48 de ore.

## **5. PROCEDEE INOVATIVE DE OBȚINERE ȘI UTILIZARE A PREPARATELOR ENZIMATICE AMILOLITICE LA CULTIVAREA AVANSATĂ A TULPINII DE MICROMICETE A. NIGER CNMN FD 06.**

### 5.1. Selectarea condițiilor de separare a complexului enzimatic amilolitic din lichidul cultural al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06

Rezultatele cercetărilor asupra procedeelelor de recuperare a enzimelor amilolitice și de selectare a condițiilor optime de separare a complexului enzimatic amilolitic din lichidul cultural al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 au demonstrat că o bună separare a enzimelor se asigură la precipitarea complexului amilolitic cu utilizarea solvenților organici și substanțelor stabilizatoare în diferite concentrații, afirmații susținute de un șir de cercetători [9, 10, 16].

În rezultatul cercetărilor s-a stabilit că coraportul lichidului cultural (LC) cu solventul (S) influențează activitatea amilolitică, astfel la valoarea pH-ului 2,5 se remarcă sporirea activității amilolitice de la 123,96 U/g raportul (1:2) până la 375,80 U/g (2 ore), marcând o scădere destul de semnificativă cu 104,25 U/g la utilizarea coraportului (LC:S) 1:5. Concentrația optimală a solventului (S), care asigură cel mai înalt randament de unități enzimatică per 1 L lichid cultural (LC), prezintă raportul LC:S 1:4 pentru amilazele acid-stabile (pH 2,5) și respectiv 1:5 pentru amilazele acid-labile (pH 4,7) (Tab. 5.1).

**Tabelul 5.1. Activitatea amilazelor produse de micromiceta *A.niger* CNMN FD 06 în funcție de concentrația solventului și durata de contact (U/g)**

Valoarea pH	Durata precipitării (ore)	Concentrația solventului și activitatea amilolitică, U/g			
		1:2	1:3	1:4	1:5
4,7	2	153,8± 0.02	<b>277,2± 0.01</b>	263,1± 0.04	269,7± 0.02
	24	161,8± 0.01	213,6± 0.02	212,8± 0.01	225,9± 0.01
2,5	2	123,96± 0.03	132,75± 0.03	<b>375,80± 0.02</b>	271,55± 0.03
	24	119,39± 0.02	146,41± 0.03	<b>306,26± 0.01</b>	<b>298,30± 0.01</b>

Activitatea amilazelor acid-labile (pH 4,7) la durata contactului de 2 ore, raportul LC:S de 1:3, atinge valoarea de 277,2 U/g, extinderea duratei de contact pînă la 24 ore micșorează activitatea enzimatică cu 63,6 U/g. Pentru amilazele acid-stabile (pH 2,5) constatăm activitate amilolitică sporită (375,80 U/g) la aplicarea raportului LC:S de 1:4 și durata de interacțiune a lichidului de cultură cu solventul de 2 ore. Menținerea contactului timp de 24 ore, ca și în cazul amilazelor acid-labile, duce la scăderea activității amilazelor cu 69,54 U/g.

Determinarea activității enzimatice la valorile de pH 4,7 și 2,5, în șarjele de precipitat obținute la diferite concentrații ale solventului și duratei de precipitare, a permis următoarele constatări:

1. La durata de precipitare de 2 ore activitatea amilolitică maximală se manifestă la concentrația alcoolului etilic în raport de 1:3 pentru amilazele acid-labile (pH 4,7).

2. Mărirea concentrației alcoolului etilic (AE) (variante LC:S 1:4) influențează considerabil activitatea enzimatică al amilazelor acid-stabile (pH 2,5) acesta înregistrând valorile maxime de 375,80 U/g la durata de contact de 2 ore, pe când amilazele acid-labile sunt la nivelul valorilor înregistrate la utilizarea raportului LC:AE de 1:3, de aceea putem susține că, raportul optim de separare a amilazelor din lichidul cultural este LC: AE 1:4.

3. Pentru durata de precipitare de 24 de ore activitatea maximală se manifestă în variantele cu concentrația precipitantului 1:4 pentru amilazele acid-stabile și, respectiv, 1:5 pentru amilazele acid-labile, constituind corespunzător **306,26 U/g** și **225,9 U/g**.

## 5.2. Studiarea particularităților de acid-stabilitate a amilazelor sintetizate de producător și de implimentare a preparatului amilazic ca ameliorator în panificație

Datele din literatură [19, 20] indică asupra faptului că tulpinile de mucegaiuri sintetizează două tipuri de amilaze, convențional divizate în acid-stabile și acid-labile. Diferența de bază în însușirile acestor amilaze constă în faptul că,  $\alpha$ -amilazele acid-labile, la valoarea de pH 2,5 a mediului, pe parcurs a 30 de minute total și ireversibil pierd capacitatea de catalizator, pe când, în aceleași condiții  $\alpha$ -amilazele acid-stabile păstrează 90% și mai mult din activitatea inițială [19]. În plan practic, la realizarea proceselor durabile de lichefiere a materialelor bogate în amidon, de importanță sunt amilazele acid-stabile ale ciupercilor microscopice, fapt care reduce semnificativ pericolul contaminării mediului de reacție cu microfloră de altă natură.

Sub acest aspect au fost realizate cercetări în vederea determinării influenței mediului de cultură și gradului de stabilitate acidă a complexelor amilazice, sintetizate de tulpina selectată ca producător perspectiv de amilaze exocelulare, ca un criteriu de caracterizare a însușirilor tehnologice ale preparatelor enzimice (Tab. 5.2.).

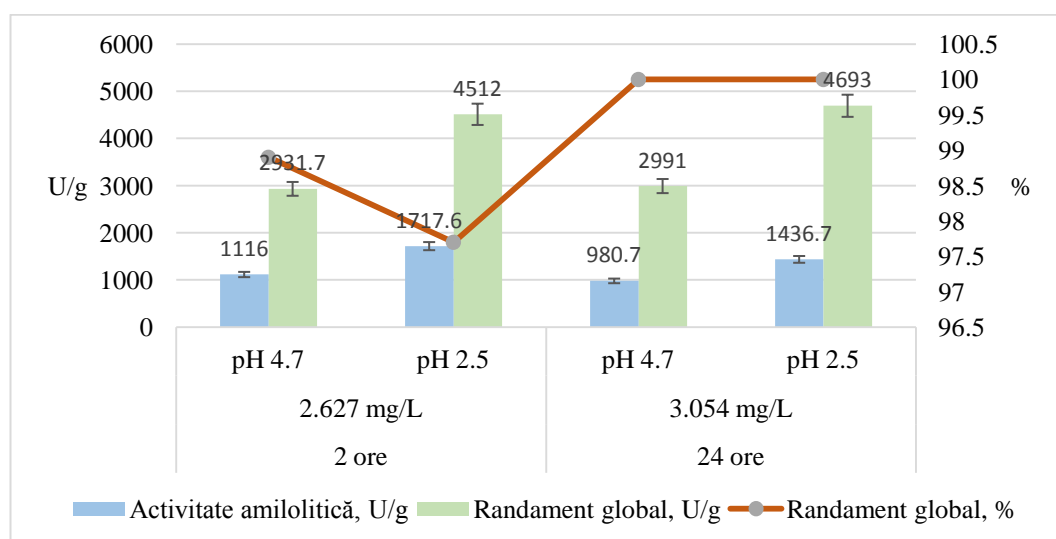
**Tabelul 5.2. Randamentul (g/L) și activitatea amilazelor (U/g) micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 în funcție de pH-ul lichidului de cultură**

Valorile de pH a lichidului de cultură	Activitatea amilolitică, U/g		Randamentul, g/L
	pH 4,7	pH 2,5	
2,0	93,00± 0.03	2,68± 0.01	1,34
2,5	<b>376,38± 0.01</b>	<b>469,40± 0.04</b>	1,15
3,0	223,84± 0.03	87,39± 0.03	1,14
4,0	379,40± 0.02	300,00± 0.02	<b>1,55</b>
5,0	28,22± 0.01	244,29± 0.01	1,04
6,0	<b>557,99± 0.01</b>	<b>839,44± 0.03</b>	<b>2,80</b>
7,0	485,35± 0.02	810,89± 0.02	2,89

Astfel, la amidazele din lichidul cultural al tulpinii în studiu, separate prin sedimentare cu alcool etilic ( $C_2H_5OH$ , 96<sup>0</sup>) în raport de 1:5, a fost testată activitatea amidolitică la valoarea pH 4,7 și pH 2,5 în conformitate cu metodele de testare a stabilității acide a complexelor amidolitice.

Conform datelor obținute remarcăm activitatea amidolitică sporită la pH-ul lichidului de cultură 2,5, care constituie 376,38 U/g pentru amidazele acid-stabile (pH 4,7) și 469,40 U/g pentru amidazele acid-labile (pH 2,5). Valorile slab-acide (pH 6,0) și neutre (pH 7,0) ale lichidului de cultură asigură sporirea activității amidolitice, valoarea maximă pentru amidazele acid-labile fiind 839,44 U/g, iar pentru amidazele acid-stabile 557,99 U/g.

Randamentul amidazelor - la pH 4,0, pH 6,0 și pH 7,0, a constituit respectiv 1,55 g/L, 2,80 g/L și 2,89 g/L. În al 2-lea maximum randamentul amidazelor este aproximativ de 2 ori mai superior. Cercetările de verificare a influenței timpului de contact al LC cu AE s-au realizat prin testarea a 2 valori temporale de 2 ore și respectiv de 24 de ore și au asigurat obținerea a 2 preparate amidolitice. Rezultatele obținute sunt prezentate în Fig. 5.1.



**Fig. 5.1. Randamentul global a unităților enzimice din 1L de lichid cultural, al micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 în coraport cu durata de precipitare**

Valorificarea preparatelor enzimice amidolitice, extrase din lichidul cultural al tulpinii *A.niger* CNMN FD 06 și stabilirea efectului acestora asupra calității pâinii s-a realizat în cadrul Laboratorului Central de Control al Asociațiilor Fabricilor de Pâine al S.A. „Franzeluța” în procesul de coacere a pâinii (*Act experimental*). A fost stabilit că preparatul enzimatic cu acțiune amidolitică îmbunătățește calitatea pâinii, reduce durata fermentării cu 10 - 15 minute, sporește procesul de creștere a aluatului, pâinea este mai stabilă ca formă la modelare.

### 5.3. Concluzii la capitolul 5

1. Separarea complexului amilolitic din lichidul cultural al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 prin sedimentare cu 4 volume de alcool (96%), durata sedimentării o oră, temperatura amestecului de reacție 5<sup>0</sup>C și pH-ul natural, în prezența ionilor de Ca<sup>2+</sup> în concentrație de 0,2%, asigură recuperarea maximă a amilazelor;

2. Activitatea amilolitică la pH 2,5 depășește martorul cu 3,49 %, (constituind 322,58 U/mL) și se menține pe parcursul următoarelor 7 zile (168 de ore) de expunere în condiții extremal acide, micșorându-se doar cu 21,79 U/g, astfel poziționând amilazele sintetizate ca perspective din punct de vedere al acid-stabilității;

3. Preparatul enzimatic cu acțiune amilazică, testat în Laboratorul Central de Control al Asociațiilor Fabricilor de Pâine S.A. „Franzeluța”, îmbunătățește calitatea pâinii, reduce durata fermentării cu 10 - 15 minute, sporește procesul de creștere a aluatului, pâinea este mai înaltă cu 19,5 mm și mai stabilă ca formă la modelare;

4. Tehnologia de obținere prin sinteză orientată a complexului amilolitic cu aplicarea stimulatoarelor chimici (compuși complecși și nanooxizi), asigură randamente crescute de preparate amilolitice. Preparatele obținute conțin două tipuri de amilaze: amilaze care hidrolizează amidonul solubil în condiții moderate de aciditate (pH 4,7), posedând în aceste condiții o activitate de 1384,0 U/g și amilaze acid-stabile, care realizează hidroliza amidonului în condiții de aciditate sporită (pH 2,5) și posedă o activitate de 1399,0 U/g.

### CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Rezultatele obținute în raport cu scopul și obiectivele formulate în cadrul tezei de doctorat „**Sinteza orientată a amilazelor exocelulare la tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 06**” au condus la formularea următoarelor concluzii generale:

1. Screeningul micromicetelor din colecția laboratorului Enzimologie, în vederea evaluării capacității de sinteză a enzimelor amilolitice, a relevat tulpina *A. niger* CNMN FD 06 potențial producător de enzime amilolitice (*Brevet MD 2836. BOPI. Nr.8. 2005*) cu activitate și stabilitate superioară.
2. Studiul variabilității naturale a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06, a permis identificarea și izolarea variantei morfologice cu cel mai înalt potențial de sinteză enzimatică, manifestat pentru ambele tipuri de amilaze acid-labile (197,04 U/mL) și acid-stabile (243,53 U/mL), înregistrând o creștere procentuală față de martor cu 81,28% pentru valoarea pH-lui 4,7 și cu 104,88 % la valoarea de pH 2,5.

3. Activitatea enzimelor amilolitice, atât constitutive cât și de inducere, produse de micromiceta *A. niger* CNMN FD 06 este maximal sporită (de 1,30-3,19 ori față de martor) prin adăugarea în mediul de cultivare a amidonului ca inductor și a făinii de fasole și tăraței de grâu, utilizarea cărora poate avea impact pozitiv prin valorificarea deșeurilor industriilor alimentare, precum și prin asigurarea condițiilor optime de cultivare (28-30°C, pH inițial 5,0, durata de cultivare – 6 zile).
4. În funcție de regimul emiterii și durata tratării, iradierea cu UMM atermice stimulează cu 13,0-65,0% biosinteza amilazelor la tulpina *A. niger* CNMN FD 06. Optimal pentru sporirea sintezei amilazelor acid-labile (cu 63,5 - 65,05%) și acid-stabile (cu 48,9 - 43,2%) a fost iradierea cu UMM în regim continuu, frecvența de 16Hz, timp de 20-30 minute.
5. Dintre 32 de compuși coordinațivi testați, în premieră, a fost stabilită eficiența aplicării compușilor coordinațivi ai Co (III) cu liganzi oxalici și anioni fluorurați, cu compoziție diferită (BF<sub>4</sub>, SiF<sub>6</sub>, F[SiF<sub>6</sub>]) în sfera externă, ca stimulatori, reglatori și stabilizatori ai activității amilolitice la tulpina *A. niger* CNMN FD 06.
6. Utilizarea heterometalocomplecșilor „s” cu liganzi polidentăți [BaL<sup>3</sup>][Co(NCS)<sub>4</sub>] și [SrL<sup>3</sup>][Co(NCS)<sub>4</sub>], unde L<sup>3</sup> prezintă esterul dimetilic al acidului 2,6-piridindincarboxilic, în concentrații mici (5,0 mg/L) manifestă influență cert stimulatorie și de intensificare a biosintezei amilazelor exocelulare la tulpina în studiu, depășind maxima martorului cu 91,6% (ziua a 5-a) și 84,4% (ziua a 6-a) și asigurând reducerea ciclului tehnologic cu 24 de ore.
7. Utilizarea NP dioxidului de titan de diferite dimensiuni (TiO<sub>2</sub> 21 nm; TiO<sub>2</sub><100 nm, TiSiO<sub>4</sub> <50 nm) și NP de Cu (CuO <50 nm și Cu 60-80 nm), în concentrații de 5-10 mg/L, sporește activitatea amilazelor cu 15,4% și reduce durata de cultivare cu 24 de ore, fapt care permite considerarea nanoparticulele testate ca potențiali biostimulatori ai biosintezei amilazelor exocelulare la micromiceta în studiu.
8. Au fost stabiliți parametrii tehnologici principali (concentrația O<sub>2</sub> dizolvat, viteza de agitare, durata ciclului biologic) la cultivarea avansată cu aplicarea compușilor coordinațivi ai Ba L<sup>3</sup> și Sr L<sup>3</sup> și nanooxidilor de Cu și Ti, în condiții de stație pilot, care permit intensificarea procesului de biosinteză a amilazelor, reducerea ciclului tehnologic cu 24-48 de ore și sporirea semnificativă al activității amilolitice, comparativ cu activitatea martorului.
9. Complexul enzimatic amilolitic, obținut prin aplicarea parametrilor regimurilor tehnologice optime (raportul LC:AE – 1:4; durata de sedimentare - 2 ore; pH-ul



lichidului cultural 5,0; t<sup>0</sup>C precipitării 5<sup>0</sup>C,) are un grad de puritate 10x, activitate amilolitică de 1116,0 U/mL la valorile de pH 4,7 și de 1717,6 U/mL la pH 2,5, demonstrând însușiri acid-stabile înalte, prezintă un avantaj în utilizarea acestuia în biotehnologiile moderne.

**Problema științifică importantă soluționată în lucrare** constă în *fundamentarea științifică* a utilizării tulpinii de fungi miceliali *Aspergillus niger* CNMN FD 06 ca *sursă nouă* de enzime amilolitice cu semnificație biotehnologică, prin optimizarea condițiilor de sinteză orientată a enzimelor cu ajutorul compușilor coordinativi ai metalelor de tipul „s” și „d”, nanoparticulelor și iradierii electromagnetice în diapazon milimetric, *fapt ce a permis* elaborarea unor tehnologii avansate cu randamente crescute de obținere a preparatelor enzimactice amilolitice cu activitate și însușiri tehnologice înalte.

**Implementarea rezultatelor științifice.** Tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 06 a fost depozitată ca producător perspectiv de amilaze exocelulare cu semnificație biotehnologică în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene (Adeverință de depozitare), fiind utilizată ca obiect biologic în cercetările de evidențiere și argumentare a perspectivei de aplicare a compușilor coordinativi ai metalelor „s” și „d”, nanocompozitelor și iradierii electromagnetice în diapazon milimetric pentru sporirea capacității de sinteză a hidrolazelor la producătorii de origine fungică, inclusiv în cercetările de scalare, la nivel de stație pilot, a tehnologiilor de cultivare clasică și avansată cu aplicarea compușilor coordinativi ai metalelor „s” și „d”, nanocompozitelor și iradierii electromagnetice în diapazon milimetric. Preparatele amilolitice obținute în baza tulpinii au fost testate în Laboratorul Central de Control al Asociațiilor Fabricilor de Pâine al S.A. „Franzeluța” în procesul de coacere a pâinii (Act experimental).

**Aportul personal:** Lucrarea a fost realizată în cadrul Laboratorului „Enzimologie” (actualmente „Biotehnologia fungilor”) al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie în conformitate cu direcțiile și planurile de cercetare și pregătire a cadrelor de profil ale laboratorului sub conducerea dr. șt. biologice, conferențiar cercetător Alexandra Ciloci (Deseatnic). Rezultatele experimentale aparțin autoarei.

## RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Tulpina nouă de micromicete – *A. niger* CNMN FD 06 se recomandă industriei microbiologice în calitate de sursă de preparate amilolitice cu multiple domenii de aplicare (Brevet de invenție MD Nr. 2836. BOPI. Nr.8. 2005).

2. Pentru cultivarea tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 se recomandă două variante de medii nutritive, ce conțin stimulatori de origine chimică și asigură eficiențe economice esențiale - majorarea randamentului de amilaze și reducerea ciclului tehnologic (Brevet de invenție MD Nr.2833. BOPI. Nr.8. 2005, MD Nr.4847 BOPI Nr.2.2023).

3. Preparatul enzimatic amilolitic, obținut din lichidul cultural al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06, se recomandă spre aplicare în panificație (Act de experimentare).

### **Sugestii privind cercetări de perspectivă:**

1. Cercetarea, dar și partea tehnologică în special, asupra influenței NP și compușilor complecși, care a demonstrat o eficacitate și o perspectivă de aplicare în calitate de stimulatori ai sintezei enzimatică poate fi continuată cu detalizarea unor mecanisme de acumulare și de biotransformare a acestor compuși în celulele altor tulpini de micromicete de interes tehnologic.

2. Dezvoltarea în continuare a direcției de cercetare științifico-practică în vederea identificării noilor tulpini de microorganisme cu capacitate înaltă de sinteză a compușilor biologici activi și diversificării spectrului de materii prime disponibile și eficiente pentru fabricarea preparatelor enzimatică solicitate de economia circulară.

### **BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ**

1. ANGHEL, A., KAYCKA, A., DATAREY, E. Selecționarea de tulpini cu randament ridicat în obținerea de enzime amilolitice. In: *Microbiologie industrială și biotehnologie*. Iași, 1988, p. 211-216.
2. BEHAILU, A., ABEBE, G. Isolation, production and characterization of amylase enzyme using the isolate *Aspergillus niger* FAB-211. In: *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*. 2008, vol. 9(2), pp. 7-14.
3. Biological aspects of low intensity Millimeter Waves. Eds.: N. D. Devyatkov, O.V. Betskii. Moscow: Seven plus, 1994. 336 p.
4. BURȚEVA, S., USATÎI, A., TODERAȘ, A. Variabilitatea formelor spontane a tulpinii *Streptomyces sp.* 36 producătoare de substanțe bioactive. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei*. Științe biologice și chimice. 1996, nr. 1, pp. 27-32.
5. CILOCI (DESEATNIC), A., COROPCEANU, E., CLAPCO, S., RIJA, A., TIURINA, J., BIVOL C., BOLOGA, O., BULHAC, I. Influența compușilor coordinativi ai Co (III), Cu (II) și Zn (II) cu liganzi oximici asupra biosintezei hidrolazelor exocelulare la fungii miceliali. In: *Studia Universitas Moldaviae*, 2014, p. 57-70.
6. CHAKRABORTY, M.B. et al. Production, assay and optimisation of amylase by submerged fermentation using *Aspergillus niger*. In: *Annals of Plant Sciences* [online]. 2018, vol. 7(6), pp. 2357-2360.
7. CHILOCHI, A.A., TURINA, Z.N.P., KLAPCO, S.F., STRATAN, N.V., LABLYUK, S.V., DVORNINA, E.G., KONDRUK, V.F. Effect of millimeter - range electromagnetic

- radiation of the biosynthesis of extracellular hydrolytic enzymes in *Aspergillus* and *Penicillium* Micromycetes. In: *Surface Engineering and Applied Electrochemistry*. 2011, vol. 47(6), pp. 558-564. ISSN 1068-3755.
8. **CONDRUC, V., CILOCI, A., BULHAC, I., CLAPCO, S., COCU, M., BOUROSH, P., DVORNINA, E., LABLIUC, S., URECHE, D.** Influența compușilor coordinativi ai bariului și stronțului asupra biosintezei amidazelor extracelulare la micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 06. In: *9th edition International Scientific-Practical Conference "Training by research for a prosperous society"*, Chișinău 2022, vol. II Chimie, p. 95-102.
  9. **KUDDUS, M.** Introduction to Food Enzymes. Enzymes in food biotechnology, production, application, and future prospects [online]. 2018. ISBN 9780128132807. [viewed 02.07.2023]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/357335538>.
  10. **KUMAR, P., SHARMA, S.M.** Enzymes in Green Chemistry: The Need for Environment and Sustainability. In: *International Journal of Advanced Research (IJAR)*. 2016, vol. 2, pp. 337-341.
  11. **LIN, P.-J., KRULL, R.** Influence of the volumetric power input on morphology and productivity of *Aspergillus niger*. In: *ResearchGate* [online]. 2023. [viewed 08.07.2023]. Available: "[https://www.researchgate.net/figure/Morphological-characteristics-of-Aspergillus-niger-volumetric-power-input-100-W-m-3\\_fig1\\_268427977](https://www.researchgate.net/figure/Morphological-characteristics-of-Aspergillus-niger-volumetric-power-input-100-W-m-3_fig1_268427977)".
  12. **RUDIC, V., CEPOI, L., RUDI, L., MISCU, V., CHIRIAC, T., COJOCARI, A., LOZAN, V., COROPCEANU, E., BOLOGA, O.** Acțiunea compușilor coordinativi ai cobaltului cu dioximinele asupra unor procese biosintetice la alga roșie *Porphyridium cruentum*. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2012, nr. 1 (316), pp. 144-151. ISSN 1857-064X.
  13. **SINDHU, R. et al.** Applications of microbial enzymes in food industry. In: *Food Technology and Biotechnology*. 2018, vol. 56(1), pp. 16-30.
  14. **SINGH, R., KUMAR, M., MITTAL, A., MEHTA, P.K.** Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. In: *Biotech*. 2016, vol. 6(2), pp. 1-15.
  15. **USATÎI, A., CHISELIȚA, N., BEȘLIU, A., EFREMOVA, N., BEJENARU, L., BATÎR, L., DADU, C., TANASE, A.** Perspectiva biotehologică privind aplicarea nano-oxizilor metalici la cultivarea levurilor de interes biotehologic. In: *Studia Universitatis Moldaviae*. 2019, vol. 121, nr. 1, pp. 103-111. ISBN 1814-3237.
  16. **ZARNEA, G., MENCINICOPSCII, Gh., BRAGAREA, Șt.** *Bioingineria preparatelor enzimatic microbiene*. București: Editura Tehnică, 1980. 420 p.
  17. **БЕЦКИЙ, О.В., КИСЛОВА, В.В., ЛЕБЕДЕВА, Н.Н.** Миллиметровые волны и живые системы. Москва: «Сайнс пресс», 2004. 271 с. ISBN 5-94818-024-7.
  18. **БУРЦЕВА, С.А., МАСЛОБРОД, С.Н., ГАРАЕВА, С.Н., БРАТУХИНА, А.А., ПОСТОЛАКИЙ О.М.** Биологический эффект электромагнитных волн слабого напряжения в миллиметровом диапазоне на стрептомицеты. В: *Миллиметровые волны в медицине и биологии*. Сборник трудов 14-го Рос Симпозиума с международным участием. Москва, 2007, с. 308-312.
  19. **ГРАЧЕВА, И.М.** *Технология ферментных препаратов*. 2-е изд., перераб. и доп. Москва: Агропромиздат, 1989. 335 с.

20. КВЕСИТАДЗЕ, Г.И. *Грибные и бактериальные амилазы*. Тбилиси: Мецниереба, 1984. 154 с.
21. КЛАПКО, С., ПАША, Л., **КОНДРУК, В.**, ДЕСЯТНИК, А., ТЮРИНА, Ж., СТРАТАН, М. Влияние миллиметровых волн низкой интенсивности на энзиматическую активность некоторых штаммов микроскопических грибов. В: *II-я Международная научная конференция посвященная 140-летию Одесского Национального Университета им. И.И. Мечникова*, Одесса, 28.03-01.04.2005. Одесса, 2005, с. 128.
22. ЧИЛОЧИ, А.А., ТЮРИНА, Ж.П., КЛАПКО, С.Ф., СТРАТАН, М.В., ЛАБЛЮК, С.В., ДВОРНИНА, Е.Г., **КОНДРУК, В.Ф.** Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на биосинтез внеклеточных гидролитических ферментов микромицетов из родов *Aspergillus* и *Penicillium*. В: *Электронная обработка материалов*. 2011, т. 47 (6), с. 87-93. ISSN 0013-5739.

## LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI

### 1. Articole în reviste științifice

#### 1.1. în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS

1. CHILOCHI, A.A., TURINA, ZN. P., KLAPCO, S. F., STRATAN, M.V., LABLYUK, S. V., DVORNINA, E. G., **KONDRUK, V. F.** Effect of millimeter-range electromagnetic radiation of the biosynthesis of extracellular hydrolytic enzymes in *Aspergillus* and *Penicillium* micromycetes. In: *Surface Engineering and Applied Electrochemistry*. 2011, Vol.47, No. 6, pp. 558-564. ISSN 1068-3755; DOI: 10.3103/S106837551106007X (IF 0,333), Disponibil online 29 November, 2013.

#### 1.2 în reviste din străinătate recunoscute

2. **КОНДРУК, В.Ф.**, ЧИЛОЧИ, А. А., КЛАПКО, С.Ф., ДВОРНИНА, Е. Г., ЛАБЛЮК, С.В. Влияние наночастиц меди и титана на биосинтез внеклеточных амилаз микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 06. В: *Успехи медицинской микологии*. 2023., Т. 25., М.: Национальная академия микологии., стр. 272-277. ISBN 978-5-901578-37-7. ISSN: 2310-9467 (Print).

3. DESEATNIC, A., TIURIN, J., LABLIUC, S., **ROTARU, V.** Selection and study of new strains of micromicete with amilolitic activity. *Roumanian Biotechnological Letters*. 1999, vol.4, nr. 2, Bucharest, p. 157-162. ISSN: 1224-5984.

#### 1.3. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil (cu indicarea categoriei)

##### Categoria A

4. ЧИЛОЧИ, А., ТЮРИНА, Ж., КЛАПКО, С., ЛАБЛЮК, С., ДВОРНИНА, Е., **КОНДРУК В.** Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на биосинтез внеклеточных гидролитических ферментов микромицетов из родов *Aspergillus* и *Penicillium*. В: *Электронная обработка материалов*. 2011, nr. 6(47), pp. 87-93. ISSN 0013-5739.

#### 1.4. în alte reviste științifice

5. COROPCEANU, E., CILOCI (DESEATNIC), A., RIJA, A., BOLOGA, O., TIURINA, J., LABLIUC, S., CLAPCO, S., **CONDRUC, V.**, STRATAN-BINZARI, M., BULHAC, I. Studiu comparativ al proprietăților biostimulatoare ale unor dimetilglioximați ai Co (III) cu anioni polifluorurați. In: *Studia Universitatis Moldaviae* (Seria Științe Reale și ale Naturii). 2008, nr. 2(12), pp. 212-216. ISSN 1814-3237.

6. **CONDRUC, V.** Selectarea condițiilor de separare a complexului enzimatic amilolitic

din lichidul cultural al tulpinii *Aspergillus niger* 33. In: *Analele Științifice ale USM, Seria „Științe chimico-biologice”*. 2005, p. 237-240. ISSN 1811-2617. (CZU: 54=57=378.4 (478) (082) A 48.)

7. **CONDRUC, V.** Studiarea condițiilor de cultivare a unor tulpini de *Aspergillus* – producători de amilaze. In: *Analele științifice ale USM, seria Științe chimico-biologice*. 2004, p. 90-94. ISSN 1811-2617, (CZU: 54=57=378.4 (478) (082) A48).

8. ДЕСЯТНИК, А., ТЮРИНА, Ж., ТУРТА, К., ЛАБЛЮК, С., **КОНДРУК, В.**, СЫРБУ, Т., ДЪЯКОН, И., ЧАПУРИНА, О. Использование комплекса меди (3) с серином и треонином в качестве биостимулятора ферментов активности штампов *Aspergillus niger* 33 *CNMN FD 06* и *Rhizopus arrhizus* (F67) *CMNN FD 03*. In: *Buletinul AȘM. Științe biologice și chimice*. 2004, Nr. 3, p.74-79.

## 2. Articole în culegeri științifice

### 2.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

9. GARBĂLĂU, N., DESEATNIC A., COROPCEANU E., BOLOGA O., TIURIN J., **CONDRUC V.**, LABLIUC S., MALINOVSKY S. Tetrafluoroborate containing Co (III) dioxymates: synthesis, structure and properties. In: *XIV Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*. Vol.1, 22-24 september, Bucharest, Romania, 2005, pag. 54-57.

### 2.2. în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

10. **CONDRUC, V.** CILOCI, A., BULHAC, I., CLAPCO, S., COCU, M., BOUROSH, P., DVORNINA, E., LABLIUC, S., URECHE, D. Influența compușilor coordinativi ai bariului și stronțului asupra biosintezei amilazelor extracelulare la micromiceta *Aspergillus CNMN FD 06*. In: *Conferința științifico-practică Internațională „Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă”, ediția a IX-a. UST*, 19-20 martie 2022, Chișinău, Republica Moldova, vol. 2, p. 95-102. ISBN 978-9975-76-389-9. [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/152632](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/152632). (CZU: 664.664.5:547.1+669.892/.3: 577.151.5), Disponibil online 28 March, 2022.

11. **CONDRUC, V.** Studiu privind acțiunea preparatului amilazic extras din lichidul cultural al tulpinii *Aspergillus niger* 33 *FD 06* asupra calității produselor de panificație. In: *Simpozionul Științific Internațional „Sectorul agroalimentar – realizări și perspective”*, 19-20 noiembrie 2021, Chișinău, Republica Moldova, vol. 56, p. 64-68. ISBN 978-9975-64-329-0. (CZU.:664.61).

### 2.3. în lucrările conferințelor științifice naționale

12. CILOCI (DESEATNIC), A., CLAPCO, S., **CONDRUC, V.**, LABLIUC, S., DVORNINA, E., URECHE, D., BULHAC, I. Evaluarea efectului compușilor coordinativi heterometalici ai ba (ii), Sr(II), Ca(II) cu Co(II) și ligand polidentat asupra biosintezei amilazelor la tulpina de fungi *Aspergillus niger CNMN FD 06*. In: *Conferința națională „Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective”*. 19-20 mai 2023, Bălți. Republic of Moldova: Bons Offices, Ediția 7, pp. 279-283. ISBN 978-9975-81-128-6.

13. CILOCI (DESEATNIC), A., CLAPCO, S., **CONDRUC, V.**, LABLIUC, S., DVORNINA, E., URECHE, D., BULHAC, I. Sinteza orientată a proteazelor la micromiceta *Fusarium gibbosum CNMN Fd 12* sub influența compușilor coordinativi ai Ba(II), Sr(II), Ca(II) cu Co(II) și ligand polidentat. In: *Conferința națională „Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective”*. 19-20 mai 2023, Bălți. Republic of Moldova: Bons Offices, 2023, Ediția 7, pp. 274-279. ISBN 978-9975-81-128-6.

14. DESEATNIC, A., TIURIN, J., **ROTARU, V.**, NARTEA, E., COROPCENU, E., RUDIC, V. Procedee avansate de sinteză orientată a enzimelor hidrolitice microbiene. In:

*Conferința științifico-practică Tehnologiile avansate în pragul secolului 21, Secția Biotehnologie, 5 octombrie, Chișinău, 2000, p. 121-123.*

**15. ДЕСЯТНИК, А., ТЮРИНА, Ж., КЛАПКО, С., КОНДРУК, В., ПАША, Л., ЛАБЛЮК, С., ГЭРБЭЛЭУ, Н., БОЛОГА, О., ЧАПУРИНА, Л., СЫРБУ, Т., СТРАТАН, М., ДРУЦЭ, В.** Способы повышения биосинтетических способностей микроскопических грибов продуцентов гидролаз. In: *Congresul al-8-lea al Societății Științifice a Geneticienelor și Amelioratorilor din Republica Moldova „Genetica și ameliorarea plantelor, animalelor și microorganismelor”*, 29-30 septembrie 2005, Chișinău, p. 490-495. ISSN 9975-78-427. (CZU: 58+636.082 (082) (082)).

**16. ROTARU, V.** Cu privire la activitatea amilolitică a unor tulpini din genul *Aspergillus* în dependență de componența mediului nutritiv. In: *Congresul al-7-lea (jubiliar) al Societății Științifice a Geneticienelor și Amelioratorilor din Republica Moldova*, 23-24 septembrie 1999, Chișinău, p. 790-792. ISSN 9975-78-427. (CZU: 58+636.082 (082)(082)).

### **3. Teze în culegeri științifice**

#### **3.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)**

**17. КЛАПКО, С., ПАША, Л., КОНДРУК, В., ДЕСЯТНИК, А., ТЮРИН, Ж., СТРАТАН, М.** Влияние миллиметровых волн низкой интенсивности на энзиматическую активность некоторых штаммов микроскопических грибов. В: *II-я Международная научная конференция посвященная 140-летию Одесского Национального Университета им. И.И. Мечникова*, 28.03-01.04.2005, Одесса, 2005., с.128.

**18. DESEATNIC, A., CONDRUC, V., TIURIN, J., BOLOGA, O., COROPCEANU, E., GĂRBĂLĂU, N., LABLIUC, S., LĂZĂRESCU, A.** [Co (DH)<sub>2</sub> (Thio)<sub>2</sub>]BF<sub>4</sub>3H<sub>2</sub>O-stimulator al biosintezei amilazelor de către fungi. In: *Conferința a XXVIII-a Națională de Chimie*, 6-8 octombrie, 2004, Călimănești-Căciulata, Vâlcea, România. p.107. ISBN 973-8488-74-5.

**19. ДЕСЕАТНИК, А., ТЮРИН, Ж., ЛАБЛЮК, С., КОНДРУК В., СЫРБУ Т.** Биосинтез экзоферментов некоторых микромицетов родов *Aspergillus* и *Rhizopus* и возможности его регуляции. В: *Тези доповідей X 3'їзда товариства мікробіологів України*, 15-17 вересня, 2004, Одеса, Астрпринт, с.45. УДК 579.8: 061.3(477.7)063) ISBN 996-318-190-7.

**20. ROTARU, V., DESEATNIC, A.** Selection of microbial producers of amilase. In: The VI<sup>th</sup> National Simposium „Diversity of organisms`development – source of biotechnological and social valorisations” Bucharest (Romania), November 26-29, 1997, *Roumanian Journal of Biological Science*, vol. 1, Nr. 5-6, p. 11. ISSN 1453-5106.

**21. ROTARU, V., DESEATNIC, A.,** New strains of amylase producing mycroomycetes. In: *Lucrările Congresului al XXII-lea al Academiei Româno-Americane de Știință și Arte (ARA)*, 26-29 iunie 1997, Tîrgoviște, România, p.30.

#### **3.2. în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)**

**22. CONDRUC, V.** Methods for oriented synthesis of exocellular amylases using fungal strain *Aspergillus niger* CNMN 06. In: *XI<sup>th</sup> International congress of geneticists and breeders from the Republic of Moldova. Abstract book*. 15-16 June, 2021, Chișinău, Republic of Moldova, p.152., ISBN 978-9975-152-13-6.

**23. CONDRUC, V., DESYATNIK, A., CLAPCO, S., DVORNINA, E, LABLYUK, S.** The influence of some metal nanooxides on the exocellular amylase activity of *Aspergillus niger* CNMN FD 06 mycelial fungal strain. In: *International Scientific Conference “Microbial Biotechnology”*, Ed. 5, 12-13 octombrie 2022, Chișinău, Republica Moldova p. 103. ISBN 978-9975-3555-6-8. DOI: 10.52757/imb22.70.

**24. DESEATNIC, A., VEREJAN, A., TIURIN, J., CLAPCO, S., BOLOGA, O., LABLIUC, S., STRATAN, M., CONDRUC, V., BULHAC, I.** The dihidrazides if some transision metals and their biological properties. In: *The II<sup>nd</sup> International Conference of the*

### 3.3. 2în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională

25. **CONDRUC, V., DESEATNIC-CILOCI, A., LABLIUC, S.** Particularitățile morfoculturale ale tulpinii *Aspergillus niger* 33 CNMN FD 06 A – producătoare de amilaze. In: *Problemele actuale ale Microbiologiei și Biotehnologiei: Conferința științifică națională cu participare internațională consacrată celei de-a 50-ea aniversare de la fondarea Secției de Microbiologie*, 5-6 octombrie 2009, Chișinău, Republica Moldova., p.146-147. CZU 579+60(082)=135.1+111+161.1. ISBN 978-9975-106-41-2.

26. **ROTARU V., DESEATNIC A.** Particularitățile biosintetice ale unor tulpini de micromicetă. In: *Lucrarile a 3-a Conferință Națională cu participare internațională consacrată 50 de ani ai AȘM*, 26, 27 septembrie 1996, Chișinău, p. 9-10.

### 4. Brevete de invenții și alte obiecte de proprietate intelectuală (OPI)

1. **DESEATNIC Alexandra, MD; CONDRUC Viorica, MD; BOLOGA Olga, MD; TIURIN Jana, MD; GĂRBĂLĂU Nicolae, MD; LABLIUC Svetlana, MD; STRATAN Maria, MD (54)** *Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi Aspergillus niger 33 CNMN FD 06a (57)*. Brevet de invenție MD 2836. G2 2005.08.31 Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova. Nr. depozit a 2004 0226. Data depozit 16.09.2004. Publicat 31.08.2005. In: BOPI 2005, nr. 8, p. 34.

2. **GĂRBĂLĂU Nicolae, MD; SIMONOV Yurie, MD; BOUROȘ Paulina, MD; DESEATNIC Alexandra, MD; BOLOGA Olga, MD; COROPCEANU Eduard, MD; CONDRUC Viorica, MD; CLAPCO Steliana, MD (54)** *Fluorură de hexafluorofosfat-bis[di(tiocarbamidă)bis(dimetilglioximato)cobalt(III)] care posedă proprietăți de stimulator al creșterii microorganismelor (57)*. Brevet de invenție MD 2833. G2 2005.08.31 Institutul de Chimie al Academiei de Științe a Republicii Moldova. Nr. depozit a 2004 0152. Data depozit 21.06.2004. Publicat 31.08.2005. In: BOPI 2005, nr. 8, p. 31.

3. **BULHAC Ion, MD; URECHE Dumitru, MD; BOUROȘ Paulina, MD; COCU Maria, MD; CILOCI Alexandra, MD; CONDRUC Viorica, MD; DVORNINA Elena, MD (74) JOVMIR Tudor (54)** *Tris (2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)- di-μ-(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato2kN)bariu(II)cobalt(II) cu proprietăți de stimulator al sintezei principiilor biologice active la fungi (57)*. Brevet de invenție MD 4847. G2 2005.08.31 Institutul de Chimie.MD; Institutul de Fizică Aplicată MD; Institutul de Microbiologie și Biotehnologie MD. Nr. depozit a 2021 0059. Data depozit 09.09.2021. Publicat 28.02.2023. In: BOPI 2023, nr. 2, p. 62.

## ADNOTARE

Condruș Viorica „Sinteza orientată a amidazelor exocelulare la tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 06”, teza de doctor în științe biologice, Chișinău, 2024.

**Structura tezei:** introducere, cinci capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia din 223 de titluri, 22 de anexe, 123 pagini de text de bază, 23 de figuri, 32 de tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 29 de lucrări științifice.

**Cuvinte-cheie:** micromicete, enzime hidrolitice/enzime amidolitice extracelulare, activitate amidolitică, medii nutritive, sinteză enzimatică, *Aspergillus niger* CNMN FD 06, compuși coordinațivi, unde milimetrice, nanoparticule.

**Scopul lucrării:** elaborarea procedeelelor inovative de sinteză orientată a amidazelor extracelulare la cultivarea submersă a tulpinii fungice *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

**Obiectivele cercetării:** stabilirea exigențelor nutritive, particularităților morfoculturale și condițiilor optime de cultivare a tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 06 ca obiect cu potențial biotehnologic; optimizarea condițiilor de sinteză orientată a amidazelor amidolitice de către tulpina producătoare, utilizând ca stimulatori și reglatori de creștere influența iradierii electromagnetice de intensitate joasă în diapazon milimetric, compușilor coordinațivi ai metalelor și nanoparticulelor; stabilirea parametrilor optimi de separare a preparatului enzimatic amidolitic din lichidul cultural al tulpinii în studiu.

**Noutatea și originalitatea științifică:** industriei microbiologice se propune o tulpină nouă de fungi - *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - cu potențial înalt de sinteză a amidazelor amidolitice exocelulare. Se recomandă o variantă nouă de mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a producătorului ce conține stimulator de origine chimică și asigură eficiența economică esențială prin majorarea randamentului de amidaze și reducerea duratei de cultivare (**Brevet de invenție MD Nr. 2836. BOPI. Nr.8. 2005**). A fost stabilită influența compușilor coordinațivi în calitate de stimulatori ai sintezei microbiene la tulpina fungică în studiu (**Brevet de invenție MD Nr. 2833. BOPI. Nr.8. 2005**). A fost demonstrată influența nanocompozitelor în scopul sporirii biosintezei amidazelor (**Brevet de invenție MD Nr. 4847 BOPI Nr.2.2023**). A fost obținut un preparat enzimatic amidolitic cu activitate înaltă necesar în diverse ramuri ale economiei naționale (**Act de experimentare**).

**Problema științifică soluționată:** fundamentarea științifică a capacității de sinteză orientată a amidazelor amidolitice de către tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 06 și de ameliorare a potențialului de biosinteză enzimatică prin aplicarea efectului biostimulator al undelor milimetrice, utilizarea selectivă a compușilor coordinațivi ai metalelor și a nanocompozitelor în calitate de stimulatori al sintezei principiilor biologice active, ceea ce a condus la sporirea activității amidazelor acid-stabile (pH 2,5) și acid-labile (pH 4,7) sintetizate de producător și la elaborarea unor procedee noi de sinteză ameliorată în cadrul unui singur flux tehnologic pentru obținerea preparatelor enzimatice noi de importanță biotehnologică.

**Semnificația teoretică:** rezultatele obținute contribuie la elucidarea mecanismelor de stimulare a procesului de sinteză microbiologică a amidazelor amidolitice și posibilitatea utilizării radiației electromagnetice în diapazon milimetric, compușilor coordinațivi și nanoparticulelor ca factor de sporire a biosintezei amidazelor la tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 06 care asigură capacități sporite de sinteză enzimatică.

**Valoarea aplicativă:** au fost elaborate trei tehnologii de sinteză orientată a amidazelor amidolitice de către tulpina fungică *Aspergillus niger* CNMN FD 06 cu potențial înalt de sinteză a amidazelor amidolitice exocelulare. A fost stabilită schema tehnologică de obținere a preparatelor enzimatice cu activitate amidolitică la cultivarea submersă a micromicetei *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

**Implementarea rezultatelor științifice:** capacitatea de sinteză orientată a amidazelor amidolitice de către *Aspergillus niger* CNMN FD 06, la nivel de laborator, a fost testată în Laboratorul de Enzimologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie și în cadrul Laboratorului Central de Control al Asociațiilor Fabricilor de Pâine al S.A. „Franzeluța”.



## АННОТАЦИЯ

**Кондрук Виорика «Направленный синтез внеклеточных амилаз штаммом грибов *Aspergillus niger* CNMN FD 06», докторская диссертация по биологии, Кишинев, 2024.**

**Структура диссертации:** введение, пять глав, общие выводы и рекомендации, библиография из 223 наименований, 22 приложения, 123 страницы основного текста, 23 рисунка, 32 таблицы. Полученные результаты опубликованы в 29 научных работах.

**Ключевые слова:** микромицеты, гидролитические ферменты/внеклеточные амилазы, амилолитические ферменты, амилолитическая активность, питательные среды, синтез ферментов, *Aspergillus niger* CNMN FD 06, координационные соединения, миллиметровые волны, наночастицы.

**Цель работы:** разработка инновационных методов направленного синтеза внеклеточных амилаз при глубинном культивировании штамма *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

**Задачи исследования:** установление питательных потребностей, морфокультуральных особенностей и оптимальных условий культивирования штамма *Aspergillus niger* CNMN FD 06 как объекта с биотехнологическим потенциалом; оптимизация условий направленного синтеза амилолитических ферментов штаммом-продуцентом; использование в качестве стимуляторов роста и регуляторов воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона, координационных соединений металлов и наночастиц; установление оптимальных параметров выделения амилолитического ферментного препарата из культуральной жидкости исследуемого штамма.

**Научная новизна и оригинальность:** микробиологической промышленности предложен новый штамм грибов - *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - с высоким потенциалом синтеза внеклеточных амилолитических ферментов. Для глубинного культивирования продуцента рекомендован новый вариант питательной среды, содержащий стимулятор химического происхождения и обеспечивающий существенную экономическую эффективность за счет увеличения выхода амилаз и сокращения сроков культивирования (Патент на изобретение МД № 2836. БОПИ. 8. 2005). Установлено влияние координационных соединений как стимуляторов микробного синтеза исследуемым штаммом гриба (Патент на изобретение МД № 2833. БОПИ. № 8. 2005 г.). Показано влияние нанокмполитов на усиление биосинтеза ферментов (Патент на изобретение МД № 4847 ВОПИ № 2.2023). Получен амилолитический ферментный препарат высокой активности, необходимый в различных отраслях народного хозяйства (Акт экспериментирования).

**Решенная научная задача:** научное обоснование возможности направленного синтеза амилолитических ферментов штаммом *Aspergillus niger* CNMN FD 06 и повышения потенциала биосинтеза ферментов за счет применения биостимулирующего воздействия миллиметровых волн, избирательного использования координационных соединений металлов и нанокмполитов в качестве стимуляторов синтеза биологически активных веществ, что привело к повышению активности кислотоустойчивых (рН 2,5) и кислотолабильных (рН 4,7) амилаз, синтезируемых производителем и разработке новых усовершенствованных методик синтеза в едином технологическом потоке для получения новых ферментных препаратов биологического и практического значения.

**Теоретическая значимость:** полученные результаты способствуют выяснению механизмов стимуляции процесса микробиологического синтеза амилолитических ферментов и возможности использования электромагнитного излучения миллиметрового диапазона, координационных соединений и наночастиц в качестве фактора повышения биосинтеза амилаз у штамма *Aspergillus niger* CNMN FD 06, обеспечивающий повышенные возможности синтеза ферментов.

**Практическое значение:** разработаны три технологии направленного синтеза амилолитических ферментов штаммом грибов *Aspergillus niger* CNMN FD 06. Разработана технологическая схема получения ферментных препаратов с амилолитической активностью при глубинном культивировании микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

**Внедрение научных результатов:** способность к направленному синтезу амилолитических ферментов штаммом *Aspergillus niger* CNMN FD 06 на лабораторном уровне была проверена в Лаборатории энзимологии Института микробиологии и биотехнологии и в Центральной контрольной лаборатории Ассоциации производителей хлеба А.О. «Franzeļu».

## ANNOTATION

**Condruș Viorica "Directed synthesis of exocellular amylases from the stem of micromycete *Aspergillus niger* CNMN FD 06", doctoral thesis in biology, Chisinau, 2024.**

**Structure of the thesis:** introduction, five chapters, general conclusions and recommendations, bibliography of 223 titles, 22 appendices, 123 pages of basic text, 23 figures, 32 tables. The obtained results are published in 29 scientific works.

**Key words:** micromycetes, hydrolytic enzymes/extracellular amylolytic enzymes, amylolytic activity, nutrient media, enzyme synthesis, *Aspergillus niger* CNMN FD 06, coordination compounds, millimeter waves, nanoparticles.

**The aim of the work:** the development of innovative procedures for oriented synthesis of extracellular amylases in the submerged cultivation of the fungal strain *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

**The objectives of the research:** establishing the nutritional requirements, the morphocultural peculiarities and the optimal cultivation conditions of the strain *Aspergillus niger* CNMN FD 06 as an object with biotechnological potential; optimizing the conditions for the oriented synthesis of amylolytic enzymes by the producing strain, using as growth stimulators and regulators the influence of low-intensity electromagnetic radiation in the millimeter range, coordinating compounds of metals and nanoparticles; establishing the optimal parameters for separating the amylolytic enzyme preparation from the culture liquid of the strain under study.

**Scientific novelty and originality:** a new strain of fungi - *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - with high potential for the synthesis of exocellular amylolytic enzymes is proposed to the microbiological industry. A new variant of nutrient medium is recommended for the submerged cultivation of the producer, which contains a stimulator of chemical origin and ensures essential economic efficiency by increasing the yield of amylases and reducing the duration of cultivation (**Invention Patent MD No. 2836. BOPI. No. 8. 2005**). The influence of coordinating compounds as stimulators of microbial synthesis in the fungal strain under study was established (**Invention Patent MD No. 2833. BOPI. No. 8. 2005**). The influence of nanocomposites in order to increase the biosynthesis of enzymes was demonstrated (**Invention Patent MD No. 4847 BOPI No. 2.2023**). An amylolytic enzyme preparation with high activity needed in various branches of the national economy was obtained (**Act of experimentation**).

**The scientific problem solved:** scientific substantiation of the ability of the directed synthesis of amylolytic enzymes by the *Aspergillus niger* CNMN FD 06 strain and of improving the enzyme biosynthesis potential by applying the biostimulatory effect of millimeter waves, the selective use of coordinating metal compounds and nanocomposites as synthesis stimulators of biologically active principles, which led to increased activity of acid-stable (pH 2.5) and acid-labile (pH 4.7) amylases synthesized by the producer and the development of new improved synthesis procedures within a single technological flow to obtain new enzyme preparations of biotechnological importance.

**Theoretical significance:** the obtained results contribute to the elucidation of the mechanisms of stimulation of the process of microbiological synthesis of amylolytic enzymes and the possibility of using electromagnetic radiation in the millimeter range, coordinating compounds and nanoparticles as a factor to increase the biosynthesis of amylases by the *Aspergillus niger* CNMN FD 06 strain that ensures increased capacities of enzyme synthesis.

**Application value:** three technologies were developed for the directed synthesis of amylolytic enzymes by the fungal strain *Aspergillus niger* CNMN FD 06 with high potential for the synthesis of exocellular amylolytic enzymes. The technological scheme for obtaining enzyme preparations with amylolytic activity during submerged cultivation of the micromycete *Aspergillus niger* CNMN FD 06 was established.

**Implementation of scientific results:** the directed synthesis capacity of the amylolytic enzymes of *Aspergillus niger* CNMN FD 06, at the laboratory level, was tested in the Enzymology Laboratory, the Institute of Microbiology and Biotechnology and in the Central Control Laboratory of the Bread Manufacturers' Associations of S.A. „Franzeluța”.

**CONDRUC VIORICA**

**SINTEZA ORIENTATĂ A AMILAZELOR EXOCELULARE**

**LA TULPINA DE FUNGI**

***ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 06**

**163.04. MICROBIOLOGIE**

**Rezumatul tezei de doctor în științe biologice**

Aprobat spre tipar: <b>D.163.04 –23-93</b> <b>(13.02.2024)</b> Hârtie ofset. Tipar digital Coli de tipar: 4	Formatul hârtiei 60x84 1/16 Tiraj 100 ex Comanda nr.240938
--	--

Tipografia Artpoligraf S.R.L.

[info@artpoligraf.md](mailto:info@artpoligraf.md)

str. Henri Coanda,7

tel: 022221190