

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
EVALUATION OF THE EFFECT OF HETEROMETALLIC COORDINATION COMPOUNDS OF Ba (II), Sr(II), Ca(II) with Co(II) AND POLYDENTATE LIGAND ON THE BIOSYNTHESIS OF AMYLASES IN THE FUNGAL STRAIN *Aspergillus niger* CNMN FD 06

Ciloci Alexandra, *doctor, conferențiar cercetător*, Clapco Steliana, *doctor, conferențiar cercetător*, Condruș Viorica, Labluc Svetlana, Dvornina Elena, *UTM*, Ureche Dumitru, *doctorand, USM*, Bulhac Ion, *doctor habilitat, USM*.

Expanding of the spectrum of transition metal coordination complexes and their application as regulators of the biosynthetic process in fungi allows highlighting the compounds with important biological properties able to increase the amylases synthesis. The influence of some heterometallic coordination compounds of Ba(II), Sr(II), Ca(II) with Co(II) and polydentate ligand on the amylolytic activity of the fungal strain *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - producer of amylases was evaluated. The stimulatory effect of the coordination compounds of Ba(II) and Sr(II) in the concentration of 5 mg/L and the reduction of the cultivation cycle by 24 hours (from 6 to 5 days) were established. Thus, the coordination compound of barium [Ba(L)₃-μ-(NCS)₂-Co(NCS)₂] in the optimal concentration intensified the biosynthesis of exocellular amylases in the micromycete *Aspergillus niger* CNMN FD 06, the enzymatic activity on 5th day of cultivation being by 35.6% higher than maximal value of the control established in the 6th day of cultivation (100.50 u/ml, compared to 73.77 u/ml in the control). The compound [Sr(L)₃] [Co(SCN)₄] showed a similar effect, the amylolytic activity exceeding the maximal value of the control by 51.0% (111.42 u/ml compared to 73.77 u/ml).

Key-words: amylases, *Aspergillus niger*, biosynthesis, coordination compounds.

INTRODUCERE

Enzimele fungice sunt produse compatibile, eficiente și adecvate pentru multe aplicații în medicina umană și veterinară, procesarea industrială a produselor alimentare (fabricarea berii, brânzeturilor), producția de antibiotice, bioremediere și agricultură. Ele sunt, de asemenea, larg utilizate și în alte domenii, cum ar fi producția de hârtie și de detergenți, industria textilă [3].

Enzimele fungice au o stabilitate relativ înaltă pentru a oferi produselor fabricate o perioadă de valabilitate adecvată, costuri accesibile și cerințe aprobate. Speciile *Aspergillus* sunt producători de o mare varietate de enzime extracelulare, inclusiv α -amilaze care prezintă interes la nivel mondial datorită aplicării largi în industria alimentară, medicină, farmaceutică, textilă și producătoare de hârtie [4, 5]. Grație proprietăților sale unice – capacitatea de a realiza cataliza diferitor procese biochimice în limite largi de pH și temperatură, în prezența sau lipsa cofactorilor, gradul înalt de specificitate ș.a., α -amilazele fungice ocupă un loc de frunte printre enzimele industriale.

Optimizarea condițiilor de cultivare pentru intensificarea biosintezei substanțelor de interes este obligatorie în realizarea unei producții sporite de enzime industriale și include diverși parametri fizici și nutriționali de creștere. Cei mai importanți factori care determină bioprocusul sunt temperatura, pH-ul, aerarea, vârsta și cantitatea de inoculum, perioada de incubație, sursa de carbon și azot [6]. Una dintre căile de sporire a producției de enzime este stimularea sintezei acestora prin introducerea în mediul de cultivare a unor stimulatori chimici. În cercetările noastre anterioare, în calitate de stimulatori ai sintezei de enzime lipolitice la o tulpină de *Aspergillus niger* au fost utilizați compuși coordinați ai Co(III) cu monooxime, iar pentru sinteza sporită a amilazelor la o altă tulpină de *A. niger* au fost folosiți compuși coordinați ai Co(III) cu dioxime. De remarcat, în special, compusul coordinațiv $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{An})_2]_2[\text{TiF}_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$ care a manifestat un efect stimulator esențial asupra biosintezei enzimelor amilolitice, marcându-se sporirea activității cu 23,7-28,9% comparativ cu proba de referință și diminuarea ciclului de cultivare cu 24 ore [3]. Astfel de cercetări pot avea o mare semnificație pentru economisirea resurselor și producția sporită și economic avantajoasă de α -amilaze necesare în numeroase aplicații industriale.

În acest context, prezintă interes și studiul efectului compușilor coordinați ai Ba (II), Sr(II) și Ca(II) cu ligand polidentat (2,6-dicarbonilpiridină diclorură) (L_3) asupra activității amilazelor la tulpina de fungi miceliali *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

În calitate de **obiect de cercetare** a servit tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - sursă de amilaze, depozitată în *Colecția Națională de Microorganisme Neputogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie*, Republica Moldova.

Cultivarea submersă a tulpinii s-a efectuat în retorte Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L cu 100 ml mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă cu 180-200 rot.min⁻¹, pe mediul nutritiv cu următoarea compoziție (g): amidon – 3,0; făină de fasole – 9,0; tărâțe de grâu – 18,0; KH₂PO₄ – 2,0; KCl – 0,5; MgSO₄ – 0,5, apă potabilă până la 1L, pH-ul inițial al mediului nutritiv 6,2. Drept material de inoculare a servit suspensia de spori în cantitate de 10% v/v cu densitatea de $3 \cdot 10^6$ spori/ml, obținută prin spălare cu apă sterilă a culturii de 12–14 zile, crescută pe mediu de malț-agar în coloane oblice. Temperatura de cultivare 28-30°C, durata cultivării 7 zile.

Compușii coordinați în concentrații bine determinate au fost introduși în mediul nutritiv steril odată cu materialul semincer.

Activitatea α -amilazei a fost determinată conform metodei colorimetrice prin reacția amidonului cu soluția de I₂/KI. Amestecul de reacție (15 ml), constituit din 10 ml de soluție tampon (tampon acetat 0,2 M, pH 4,7), soluție de 1% amidon solubil (Sigma) ca substrat și 5 ml probă de enzimă diluată corespunzător, a fost incubat timp de 10 minute la 30°C. Reacția a fost stopată prin adăugarea soluției de iod în raport de 0,5 ml amestec de reacție/50 ml soluție (5 mg iod și 50 mg KI în 100 ml 0,1 N HCl). Analogic s-a procedat și cu proba control, ce conține amidon nehidrolizat. Probele au fost măsurate la 630-670 nm și s-a determinat diferența dintre densitatea optică a probei de control și cea a amidonului nehidrolizat. Se efectuează calculul activității amilazelor în U/ml, conform ecuației elaborate de Graciovă I. și al. [7].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În ultimele decenii, a crescut interesul pentru investigarea unor noi reglatori și stimulatori ai biosintezei microorganismelor - producători de substanțe biologice active valoroase - enzime, vitamine, antibiotice, lipide etc. Lărgirea spectrului complexelor de coordonare a metalelor de tranziție și utilizarea acestora în calitate de reglatori ai procesului de biosinteză la fungi ar permite scoaterea în evidență a compușilor cu proprietăți biologice importante pentru sporirea sintezei de amidon.

Au fost realizate cercetări, privind evaluarea influenței compușilor coordinativi ai elementelor „s” și „d” (bariu, stronțiu, calciu) cu Co(II) și ligandul polidentat 2,6-dicarbonilpiridină diclorură asupra biosintezei amidazelor exocelulare la tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - obiect cu semnificație biotehnologică.

Metalocomplecșii au fost incluși în mediul nutritiv steril în concentrații de 5, 10 și 15 mg/l. Monitorizarea activității enzimatică s-a efectuat pe parcursul zilelor a 5-a, a 6-a și a 7-ea de cultivare, perioadă în care producătorul manifestă activitate maximă de biosinteză enzimatică. În varianta martor activitatea amilolitică a tulpinii a constituit 70,92 u/ml în ziua a 5-a și 73,77 u/ml în ziua a 6-a. În ziua a 7-ea de cultivare activitatea amidazelor în varianta martor a scăzut semnificativ, constituind 48,69 u/ml (Tabelul 1).

Tabelul 1. Modificarea activității amilolitice a tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 06 în cultură submersă sub influența compușilor coordinativi ai „s” și „d” elementelor

	Concentrația, mg/l	Activitatea amilolitică					
		Ziua a 5-a		Ziua a 6-a		Ziua a 7-ea	
		u/ml	%/martor	u/ml	%/martor	u/ml	%/martor
[Ba(L) ₃ -μ-(NCS) ₂ -Co(NCS) ₂]	5	100,50	141,7/ 136,2	127,08	172,3	49,41	101,5
	10	66,54	93,8	56,37	76,4	27,99	57,5
	15	66,54	93,8	44,73	60,6	21,06	43,3
[Sr(L) ₃][Co(SCN) ₄]	5	111,42	157,1/ 151,0	98,01	132,8	50,76	104,3
	10	66,06	93,1	73,77	100,0	13,44	27,6
	15	71,37	100,6/96,7	47,16	63,9	20,37	41,8
[Ca(L) ₃][Co(SCN) ₄]	5	71,37	100,6/96,7	73,77	100,0	50,13	102,9
	10	63,66	89,8	46,71	63,3	36,99	76,0
	15	49,11	69,2	44,73	60,6	21,03	43,2
Ligandul L	5	81,06	114,3/109,2	68,94	93,5	36,30	74,5
	10	61,68	86,9	13,65	18,5	17,61	36,2
	15	58,80	82,9	12,93	17,5	15,51	31,8
Martor	-	70,92	100,0	73,77	100,0	48,69	100,0

p<0,05

Analiza rezultatelor obținute în variantele experimentale marchează influența distinctă a fiecărui complex asupra biosintezei amidazelor de către producător în funcție de atomul generator de complecși. Astfel, compusul coordinativ [Ba(L)₃-μ-(NCS)₂-Co(NCS)₂] în ziua a 5-a de cultivare, în varianta cu concentrația de 5 mg/l, asigură un efect biostimulator asupra activității amilolitice a micromicetei cu un spor de 41,7% față de martorul zilei (100,50 u/ml față de 70,92 u/ml) și 36,2% față de maxima martorului (73,77 u/ml) în ziua a 6-a de cultivare – ziua manifestării biosintezei maxime la cultivarea micromicetei în condiții clasice (martor). În ziua a 6-a de cultivare compusul sporește activitatea enzimatică cu 72,3% față de nivelul maxim al martorului (127 u/ml față de 73,77 u/ml în varianta martor). Cu majorarea concentrației compusului în mediul de cultivare (10mg/l și 15 mg/l) se observă un efect de inhibare, care se intensifică concomitent cu creșterea duratei de cultivare, constituind 6,2% (ziua a 5-a), 23,6 și 39,4% (ziua a 6-a), 42,5 și 56,7% în ziua a 7-ea în raport cu martorul zilei.

Compusul coordinativ al stronțiului [Sr(L)₃][Co(SCN)₄] în ziua a 5-a de cultivare, în varianta cu concentrația de 5 mg/l, asigură efect biostimulator asupra activității amilolitice a micromicetei cu un spor de 57,1% față de martorul zilei și de 51,0% față de maxima martorului din ziua a 6-a de cultivare. În ziua a 6-a de cultivare în varianta cu aceeași concentrație de 5 mg/l compusul coordinativ al stronțiului depășește nivelul maxim al martorului cu 32,8%, activitatea enzimatică, constituind 98,01 u/ml față de martor. Spre deosebire

de compusul coordinativ al bariului, în ziua a 6-a de cultivare, în cazul stronțului se înregistrează diminuarea efectului biostimulator, marcând un spor doar de 32,8% în raport cu maxima martorului, față de sporul de 51,0% în ziua a 5-a de cultivare. Similar variantei cu compusul coordinativ al bariului, cu sporirea concentrației compusului coordinativ al stronțului (10 și 15 mg/l) efectul de inhibare crește odată cu creșterea duratei de cultivare, activitatea amilolitică fiind în ziua a 7-ea cu 72,4% și 58,2% sub nivelul martorului zilei.

Astfel, în concentrații mici (5,0 mg/l) compușii coordinativi ai bariului și stronțului cu ligand polidentat manifestă influență cert stimulatorie și de intensificare a biosintezei amilazelor exocelulare la tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 06. Rezultatele înregistrate sunt în acord cu datele cercetărilor anterioare privind efectul unor compuși coordinativi ai Co(III) și anume dioximați ai Co(III) cu sulfanilamidă asupra producerii de pectinaze la *Penicillium viride* CNMN FD 04 P și amilaze la tulpina *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 [1, 2].

Compusul coordinativ $[Ca(L)_3][Co(SCN)_4]$, indiferent de durata de cultivare, în concentrație de 5,0 mg/l nu influențează (efect neutru) biosinteza amilazelor la producător. În ziua a 5-a de cultivare activitatea amilolitică la această concentrație a constituit 71,37 u/ml, în a 6-a zi 73,77 u/ml și 50,13 u/ml în ziua a 7-ea, ceea ce în raport procentual constituie: 100,6%, 100,0% și 102,9% față de nivelul de 100%, ce corespunde fiecărui martor din ziua respectivă. Creșterea concentrației compusului coordinativ al Ca(II) în mediul de cultivare la 10 mg/l și 15 mg/l ca și în cazurile premergătoare, provoacă efect de inhibare. Astfel inhibarea activitatea amilolitice a producătorului la concentrația de 15 mg/l a constituit 30,8% în ziua a 5-a, 39,4% în ziua a 6-a, 56,8% în ziua a 7-a de cultivare față de nivelul martorului zilei.

Studiul activității biologice a ligandului (2,6-dicarbonilpiridină diclorură) a arătat că în concentrația de 5 mg/l în ziua a 5-a de cultivare a producătorului manifestă efect slab stimulator: 14,3% față de martorul zilei în ziua a 5-a de cultivare, 9,2% în raport cu maxima martorului. În zilele a 6-a și a 7-ea se urmărește scăderea activității amilazelor exocelulare cu 6,5% și 25,5% respectiv în ziua a 6-a și a 7-ea de cultivare. Creșterea concentrației ligandului în mediul de cultivare la 10 mg/L și 15 mg/L provoacă efect semnificativ inhibitor, care se modifică în funcție de durata de cultivare, constituind: 13,1% și 17,1% în ziua a 5-a, 81,5% și 82,5% ziua a 6-a; 63,8% și 68,2% în ziua a 7-a sub nivelul martorului zilei (70,92 u/ml, 73,77 u/ml, 48,69 u/ml).

Reieșind din cele relatate, putem considera că diminuarea activității amilazelor exocelulare la producătorul sub influența compușilor coordinativi ai Ba(II), Sr(II), Ca(II), precum și a ligandului la concentrații mai înalte în mediul de cultivare până la valori de 10 și 15 mg/l este condiționată, în mare parte, de însușirile ligandului din componență. Legătura ligandului cu metalul ar putea fi mai puternică în cazul Ba(II) și Sr(II) și mai slabă în compusul coordinativ al Ca(II), ceea ce se răsfrânge asupra procesului de biosinteză a amilazelor în mod diferit.

CONCLUZII:

1. Compușii coordinativi ai Ba(II) și Sr(II) cu Co(II) și ligand polidentat în concentrații mici (5mg/L) manifestă influență stabil stimulatorie și de intensificare a biosintezei amilazelor exocelulare la tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 06 și modifică termenul de manifestare a maximei de biosinteză.
2. Compusul coordinativ $[Ba(L)_3-\mu-(NCS)_2-Co(NCS)_2]$ în concentrația de 5 mg/L sporește biosinteza amilazelor exocelulare la micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 06, activitatea enzimatică depășind în ziua a 5-a de cultivare cu 36,2% maxima martorului în ziua a 6-a de cultivare (100,50 u/ml față de 73,77 u/ml în varianta martor), ceea ce permite reducerea ciclului tehnologic cu 24 ore. Efectul stimulator se păstrează și în ziua a 6-a de cultivare, activitatea depășind nivelul martorului cu 72,3%.
3. Compusul coordinativ al stronțului $[Sr(L)_3][Co(SCN)_4]$ în concentrație de 5,0 mg/l modifică termenul de manifestare a maximei de biosinteză a amilazelor la micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 06 din a 6-a în ziua a 5-a de cultivare cu reducerea ciclului tehnologic cu 24 ore, activitatea depășind maxima martorului cu 51,0% (111,42 u/ml față de 73,77 u/ml în varianta martor). Efectul stimulator se păstrează și în ziua a 6-a de cultivare, constituind 32,8%.
4. Compusul coordinativ al Ca(II) - $[Ca(L)_3][Co(SCN)_4]$ în concentrație de 5,0 mg/L, indiferent de durata de cultivare, nu influențează biosinteza amilazelor la producător, iar în concentrații de 10 și 15 mg/l, exercită efect inhibitor.

Bibliografie:

1. Coropceanu, E.; Ciloci, A.; Stefirță, A.; Bulhac, I. *Compuși coordinativi oximici în calitate de stimulatori ai proceselor fiziologice la unii fungi și plante de cultură*. În: Modern Technologies in the Food Industry. 2016, p. 360-374.
2. Deseatnic-Ciloci, A.; Coropceanu, E.; Clapco, S. et al. *Efectul dioximaților Co(III) cu sulfanilamidă asupra activității enzimactice a unor micromycete*. În: Buletinul AȘM. Seria științele vieții. 2013, 3 (321), p. 132-138.
3. Deseatnic, A.; Stratan, M.; Coropceanu, E. et al. *Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi Aspergillus niger 33-19 CNMN FD 02*. Brevet de invenție MD 3943. 2009. 07.31.
4. El-Gendi, H.; Saleh, A. K.; Badierah, R.; Redwan, E. M.; El-Maradny, Y.A.; El-Fakharany, E.M. *A Comprehensive insight into fungal enzymes: structure, classification, and their role in mankind's challenges*. In: Journal of Fungi. 2022, 8 (1), p. 23.
5. Prasanna, V.A. *Amylase and their applications*. Afr. In: J. Biotechnol. 2005, 4 (13), pp. 1525-1529.
6. Singh, S.; Singh, S.; Bali, V.; Sharma, L.; Mangla, J. *Production of fungal amylases using cheap, readily available agriresidues, for potential application in textile industry*. In: BioMed Research International. 2014, e:215748. doi: 10.1155/2014/215748. (IF: 2.583)
7. Грачева, И.М.; Грачев, Ю.П.; Мосичев, М.С. *Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов*. Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1982. - С. 57–62.