

**INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI Co(III), Cu(II) și Zn(II)  
CU LIGANZI OXIMICI ASUPRA BIOSINTEZEI HIDROLAZELOR  
EXOCELULARE LA FUNGII MICELIALI**

*Alexandra DESEATNIC-CILOCI, Eduard COROPCEANU\*, Steliana CLAPCO,  
Andrei RIJA\*, Jana TIURINA, Cezara BIVOL, Olga BOLOGA\*, Ion BULHAC\**

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM*

*\*Institutul de Chimie al AȘM*

A fost studiată influența unor compuși coordinativi ai cobaltului, cuprului și zincului în baza unor liganzi oximici asupra biosintezei hidrolazelor exocelulare la tulpinile de fungi miceliali *Aspergillus niger* CNMN FD 10 – producător de celulaze și xilanaze, *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 și *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – producătoare de proteaze.

S-a stabilit efectul diferențiat al compușilor testați asupra biosintezei hidrolazelor în dependență de originea și sistemul enzimatic sintetizat al micromicetelor luate în studiu.

**Cuvinte-cheie:** celulaze, xilanaze, proteaze, compuși coordinativi, fungi miceliali, sinteză orientată.

**THE INFLUENCE OF COORDINATION COMPOUNDS OF Co(III), Cu(II), Zn(II) WITH OXIME LIGANDS ON THE BIOSYNTHESIS OF EXOCELLULAR HYDROLASES OF MICROMYCETES**

The influence of coordination compounds of cobalt, copper and zinc with oxime ligands on the biosynthesis of exocellular hydrolases of fungal strains *Aspergillus niger* CNMN FD 10 – producer of cellulases and xylanases, *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 and *Fusarium gibbosum* CNMN 12 – producers of proteases was studied.

The differential effect of tested compounds on the biosynthesis of hydrolases, depending on the origin of micromycetes and the synthesized enzymatic systems was established.

**Keywords:** cellulases, xylanases, proteases, coordination compounds, micromycetes, directed synthesis.

**Introducere**

Enzimele hidrolitice, inclusiv celulazele și proteazele, alăturat rolului important în biologia vieții, prezintă o valoare practică enormă, fiind pe larg utilizate în diverse procese tehnologice, medicină și agricultură, înscriind mari contribuții la dezvoltarea biotehnologiilor moderne.

Se utilizează, cu precădere, enzimele de origine microbială, obținute din bacterii, mușcăiuri, drojdii. Mai pe larg utilizați ca surse de hidrolaze extracelulare sunt funghi miceliali, remarcabili prin spectrul vast de enzime sintetizate. Capacitatea micromicetelor de a secreta enzimele în mediul de cultură le conferă importanță biotehnologică suplimentară.

Principalele probleme cu care se confruntă producerea care utilizează funghi prezintă sporirea și stabilizarea capacității biosintetice a tulpinilor producătoare. În acest aspect importanță prezintă selectarea tulpinilor naturale active, precum și evidențierea de noi căi și mecanisme de sporire și reglare a sintezei enzimatice la nivel celular.

Posibilități multiple confirmate privind stimularea și reglarea biosintezei microbiene prezintă utilizarea compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție. În ultimii ani compușii coordinativi ai metalelor cunosc o aplicare de amploare, datorită implicațiilor teoretice și practice. Este stabilit rolul important al metalocomplexilor pentru obiectele biologice ca agenți de intensificare a dezvoltării și creșterii productivității plantelor, de sporire a rezistenței acestora în condițiile nefaste ale naturii, de fortificare a imunității specifice la animale, de sporire a productivității algelor și cianobacteriilor explorate biotehnologic, a unor reprezentanți din alte grupe taxonomice – bacterii, levuri, micromicete [14,19,24,37- 41,48,61]. Rezultate promițătoare sunt obținute în cercetările privind efectul biostimulator și reglator al acțiunii compușilor coordinativi ai metalelor asupra biosintezei hidrolazelor exocelulare la funghi miceliali, domeniu cu vast potențial inovațional fundamental și aplicativ [2-9,13-17,51-54,64,65].

Cercetările de evaluare a efectului biologic al unui grup extins de compuși coordinativi ai metalelor de tranziție cu liganzi organici din diferite clase chimice – oximele, tiosemicarbazonele, aminoacizii – asupra biosintezei hidrolazelor exocelulare la micromicete au permis evidențierea unor principii de manifestare a efectului în funcție de atomul de metal generator de complexi, de compoziția sferei interne și anionilor din sfera externă,

de natura liganzilor axiali și ecuatoriali etc. [2-6,8,9,13-17, 20-22,29, 35,46,47,57,59]. Rezultatele unor cercetări în biologie demonstrează că efectul maxim exercitat este asigurat de structura complexului integru și nu de una din părțile constituente [39,51].

Diverse proprietăți utile, atât în procesele industriale, cât și biologice, manifestă dioximații metalelor tranziționale. Unii dioximați ai fierului bi- și trivalent manifestă proprietăți bine pronunțate de catalizatori în reacțiile de formare a compozițiilor poliuretanică, destinate lipirii unor piese metalice în industria de construcție a mașinilor și fabricării materialelor plastice decorative [1]. Se realizează studii privind posibilitățile de utilizare a dioximaților metalelor tranziționale în procesele de descompunere a apei în cadrul fotosintezei artificiale [30]. Dioximații cobaltului(III) pot fi utilizați în procesul de obținere electrocatalitică a hidrogenului [12,18,34,42,44,45]. Cobaloximele prezintă una dintre cele mai reușite clase de compuși sintetici ai metalelor tranziționale cunoscute în producerea hidrogenului, care pot fi relativ ușor sintetizate, sunt stabile față de oxigen, se pot cupla în sistemele fotosintetice naturale și artificiale [32,43]. A fost realizată sinteza unei serii de *tris*-dioximați clatratochelați în calitate de potențiale preparate în terapia cancerului. Reacția de autoasamblare a clatratochelaților și interacțiunea lor cu acizii nucleici poate fi utilizată pe larg în imunologie și în biologia moleculară [31,49].

Rezultatele unor serii de cercetări confirmă influență benefică a compușilor coordinativi cu liganzi oximici asupra proceselor fiziologice la microorganisme [9,8,37,46,53]. Sinteza complexelor ce prezintă modele ale compușilor fiziologici naturali și testarea acțiunii lor asupra proceselor metabolice ale microorganismelor prezintă o direcție cu perspectivă de reproducere și dirijare a biosintezei naturale. Unele oxime sunt implicate în procese metabolice importante în organism [33].

Biosinteza enzimelor de către microorganisme este guvernată de condițiile de cultivare care asigură creșterea și dezvoltarea culturii. Rol decisiv în acest proces revine compoziției mediului nutritiv [58]. În pofida generalizării abordărilor în cultivarea producătorilor de metaboliți secundari, acumulate până în prezent, optimizarea condițiilor de biosinteză poartă, în principal, caracter empiric. Temeiul constă în necesitățile diferite ale producătorilor concreți în elemente nutritive și condiții de creștere și biosinteză a metaboliților [56,58]. În acest aspect prezintă interes evaluarea efectului biologic al compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție în funcție de taxonomia fungilor miceliali și sistemele enzimatică sintetizate, ceea ce a constituit scopul cercetărilor prezentate în acest articol.

## Material și metode

### Cercetări chimice

În studiul realizat privind influența compușilor coordinativi asupra proceselor de enzimogeneză la tulpinile de fungi au fost utilizați complecșii:  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Seu})_{7/4}(\text{Se-Seu})_{1/4}]_2[\text{TiF}_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (**1**),  $[\text{Cu}(\text{DSamH}_2)_3]\text{SO}_4$  (**2**),  $[\text{Co}_2(\text{DH})_4\text{Cl}_2\text{bpe}] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$  (**3**),  $[\text{Cu}_2(\text{DH})_4\text{bpe}]$  (**4**),  $[\text{Zn}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{NioxH}_2)_2\text{bpy}(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**5**) (unde DH – anionul dimetilgloximei, Seu – selenocarbamida, Se-Seu – selenselenocarbamida, DSamH<sub>2</sub> – disulfanilamidgloxima, bpe – 1,2-bis(4-piridil)etan, NioxH<sub>2</sub> – 1,2-ciclohexandiondioxima, bpy – 4,4-bipiridil).

Sinteza compușilor coordinativi a fost realizată pe diferite căi: complexul mononuclear al cobaltului (**1**) a fost obținut la interacțiunea hexafluorotitanatului de cobalt cu dimetilgloximă și selenouree [62]; complexul mononuclear al cuprului a fost sintetizat la interacțiunea sulfatului de cupru cu disulfanilamidgloxima [36]; complexul binuclear al cobaltului (**3**) a fost asamblat la interacțiunea blocului de sinteză  $[\text{Co}(\text{DH})_2\text{H}_2\text{OCl}]$  cu bpe în raport de 2:1 [7]; complexul binuclear al cuprului (**4**) a fost obținut la interacțiunea acetatului de cupru cu bpe și dimetilgloximă în raport de 2:1:4 [10], complexul binuclear al zincului (**5**) – la interacțiunea acetatului de zinc cu 1,2-ciclohexandiondioxima și 4,4-bipiridilul [11]. În calitate de solvenți au fost utilizați apa, metanolul și dimetilformamida în diferite proporții. Compoziția și structura compușilor în studiu au fost elucidate în baza metodelor: analiza elementelor, spectroscopia IR (FT-IR Perkin-Elmer „Spectrum 100”), RMN (400 Brucker), difracția cu raze X (Xcalibur CCD “Oxford Diffraction”).

### Cercetări biologice

#### Obiecte de studiu

Obiecte de studiu au servit tulpinile fungice izolate din solurile Moldovei, plante atacate de fuzarioză, selectate anterior ca perspectivi producători de hidrolaze exocelulare:

- ✓ *Aspergillus niger* CNMN FD 10 – producător de celulaze, xilanaze [27];
- ✓ *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 [25];
- ✓ *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – producătoare de proteaze [26].

Tulpinile se păstrează în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

#### Condiții și medii de cultivare:

Cultivarea submersă a producătorilor s-a efectuat în condiții de agitare continuă pe agitatoare rotative cu 180-200 rot./min, în colbe Erlenmayer cu capacitatea de 0,5-1,0 L cu 100-200 ml mediu nutritiv. Temperatura – 28-30°C, durata cultivării 9-10 zile pentru *Aspergillus niger* și *Trichoderma koningii* Oudemans și 6 zile pentru *Fusarium gibbosum*.

Tulpinile au fost cultivate pe mediile de bază (martor) selectate anterior, cu următoarea compoziție:

- ✓ pentru *Aspergillus niger* CNMN FD 10, (g/L): borhot de sfeclă – 20,0; tărațe de grâu – 20,0; partea minerală Getcinson –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1; KCl – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{FeCl}_3$  – 0,01; pH – 5,5-6,0;
- ✓ pentru *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15, (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCO}_3$  – 2,0; tărațe de grâu – 20,0; faină de soia - 10,0, pH – 6,25;
- ✓ pentru *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, (g/L): faină de porumb – 20,0; faină de soia – 10,0;  $\text{CaCO}_3$  – 2,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1,0; pH – 6,25.

În calitate de material de inoculare a servit suspensia de spori cu densitatea  $2,5 \times 10^6$  spori/ml, obținută prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturilor de 12 zile, crescute pe coloane oblice de malț-agar. Concentrația inocului a constituit 10% V/V.

În variantele experimentale mediile de bază au fost suplimentate cu compuși coordinativ sus-enumerati. Concentrația aplicată a constituit 5,0, 10,0 și 15,0 mg/L.

#### Metode utilizate

În investigații au fost aplicate metode biochimice și microbiologice clasice și moderne acceptate în enzimologie.

Biomasa a fost separată de lichidul cultural prin filtrare mecanică.

Activitatea proteazelor exocelulare acide (pH 3,6) și neutre (pH 7,4) s-a determinat după metoda Willstatter [50], bazată pe hidroliza gelatinei până la aminoacizi și polipeptide cu determinarea ulterioară a grupelor carboxilice libere.

Activitatea complexului celulazic și xilanazelor a fost determinată după acțiunea enzimelor asupra substratelor corespunzătoare:  $\beta$ -glucozidazică – asupra 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranozid, endoglucanazică – asupra Na-carboximetilcelulozei, xilanazică – asupra xilanului din ovăz, cu dozarea ulterioară a zaharurilor reducătoare conform metodei colorimetrice Somogy-Nelson [28,63].

Experiențele au fost efectuate în trei repetări, datele prezentate fiind media aritmetică a determinărilor, calculată conform  $p \leq 0,05$ . Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic conform metodei Dospehov, în baza programului computerizat Excel [55].

#### Rezultate și discuții

##### Cercetări chimice

Sinteza noilor compuși coordinativi cu proprietăți de influență favorabilă asupra dezvoltării organismelor vii prezintă interes din perspectiva elaborării noilor tehnologii eficiente în biotehnologia modernă și propunerii soluțiilor cu efect ergonomic pentru sectorul de producere. Conștientizarea mecanismelor de acțiune, depistarea componentelor active, stabilirea rolului metalelor și al liganzilor, precum și a efectului lor cumulativ necesită o serie de investigații pentru a perfecționa metodologia sintezei orientate a substanțelor biologice active cu scopul obținerii compușilor cu proprietăți predictibile. Acest obiectiv poate fi realizat pe calea diversificării naturii generatorului de complex și a liganzilor, fapt ce influențează determinant asupra varietății compoziției și arhitecturii structurale a complexilor asamblați. Pentru investigații au fost selectați compuși coordinativi mononucleari (1,2) și binucleari (3,4,5) ai diferitelor metale (Co, Cu, Zn) cu diferite grade de oxidare (+2, +3), în care se conțin atât dioxime cunoscute ( $\text{DH}_2$ ,  $\text{NiOxH}_2$ ), cât și noi ( $\text{DSamH}_2$ ). Raportul metal:dioximă în complecși poate fi de 1:1 (5), 1:2 (1,3,4) și 1:3 (2). Aceste și alte particularități conferă un grad înalt de diversitate între cei cinci complecși din clasa compușilor coordinativi în baza dioximelor.

În spectrul UV-Vis al complexului 1 în regiunea 200–400 sunt prezente două benzi de absorbție: prima demonstrează prezența dioximei în planul ecuatorial și este condiționată de transferul  $\pi$ - $\pi^*$  în gruparea  $\text{Co}(\text{DioxH})_2$ ; a doua confirmă prezența selenocarbamidei coordonate. În spectrul IR al compusului 1 prezența benzilor de absorbție  $\nu(\text{CN})=1574$ ,  $\nu(\text{NO})=1236$  și 1087,  $\nu(\text{Co-N})=514$  și  $420 \text{ cm}^{-1}$  indică la coordinarea monoanionilor dimetilgloximei la atomul central.

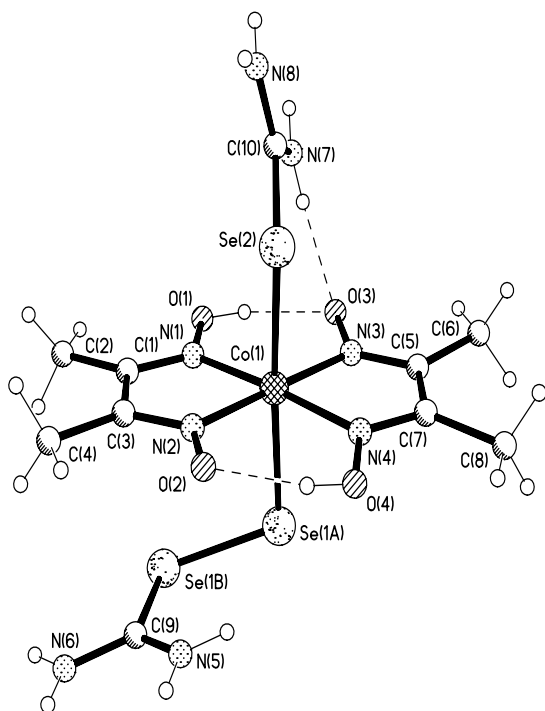


Fig.1. Structura cationului complex  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Seu})(\text{Se-Seu})]^+$  în 1.

Complexul 2 este constituit din cationul complex  $[\text{Cu}(\text{DSamH}_2)_3]^{2+}$ , în care la atomul central coordonează în mod chelat trei molecule de disulfanilamidgloximă, iar în sfera externă sunt prezenți anionii sulfat. În acest complex *tris*-dioximic grupele oximice ale ligandului  $\text{DSamH}_2$  nu se deprotonează. Generatorul de complex manifestă numărul de coordinare 6, caz mai rar caracteristic pentru cupru.

În compusul 3 la atomul central coordonează patru atomi de azot ai grupelor oximice ale ligandului ecuatorial, iar în pozițiile 1,6 se află un atom de clor și un atom de azot piridinic al ligandului 1,2-bis(4-piridil)etan, care joacă rolul de punte și unește atomii generatorului de complex în molecula binucleară.

În spectrul IR al compusului 3 sunt prezente o serie de benzi la 1627, 1619, 1555, 1511, 1433, 1377, 1237, 1214, 1087, 1035, 976, 868, 813, 739  $\text{cm}^{-1}$ . Grupa oximică este caracterizată prin benzile  $\nu(\text{CN})=1555$ ,  $\delta_{\text{as}}(\text{N-O})=1237$  și  $\delta_{\text{s}}(\text{N-O})=1087$   $\text{cm}^{-1}$ . Banda din regiunea 1619  $\text{cm}^{-1}$  poate fi atribuită atât vibrațiilor  $\nu(\text{CC})$ , cât și vibrațiilor  $\nu(\text{C=N})$ . Banda  $\delta(\text{CH})$  din regiunea 739  $\text{cm}^{-1}$ , precum și forma benzilor din această regiune (este forma caracteristică inelului benzenic parasubstituit) este un semnal sigur al prezenței moleculelor ligandului punte în complex. În regiunea 1511  $\text{cm}^{-1}$  este prezentă banda  $\nu_{\text{s}}(\text{C=C})$ . Prezența acestor benzi în spectrul IR al compuşilor studiați confirmă coordonarea ligandului punte bpe la atomul central.

În spectrul RMN  $^1\text{H}$  al complexului 1 semnalele  $\delta(\text{CH}_3)$  se deplasează din regiunea 1,96 ppm în direcția câmpului slab la 2,2 ppm, fapt condiționat de transferul densității electronice de la ligand (dimetilgloximă) spre metal. Prezența singletului în spectrul complexului în regiunea grupelor metilice indică la faptul că aceste grupe sunt echivalente magnetic, iar complexul studiat are configurație *trans*. Semnalele în regiunea 8,10–8,45 ppm corespund grupelor amine ale selenocarbamidei. În spectrul RMN  $^{19}\text{F}$  este prezent semnalul caracteristic anionului din sfera externă ( $[\text{TiF}_6]^{2-}$ ) la 72 ppm. Prezența unui singur semnal în spectru indică la faptul că toți atomii de fluor sunt echivalenți din punct de vedere magnetic și anionii complecși sunt stabili în soluție.

În rezultatul descifrării structurii cristaline [30] s-a stabilit că în 1 se conțin două tipuri de cationi complecși:  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Seu})_2]^+$  și  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Seu})(\text{Se-Seu})]^+$  în raport de 3:1. Considerăm că ligandul Se-Seu se formează în sistem de către selenul elementar, care ulterior se leagă cu molecula de selenocarbamidă.

La atomul central în planul ecuatorial coordonează patru atomi de azot de la doi monoanioni ai dimetilgloximei legați între ei prin legături de hidrogen intramoleculare. În pozițiile 1,6 coordonează atomii de seleniu ai liganzilor axiali. Sfera externă este constituită din anioni  $[\text{TiF}_6]^{2-}$  și molecule de apă.

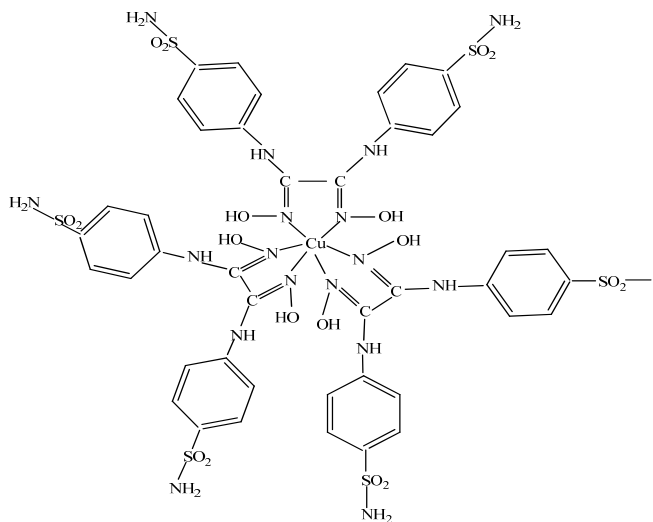


Fig.2. Structura cationului complex  $[\text{Cu}(\text{DSamH}_2)_3]^{2+}$  în 2.

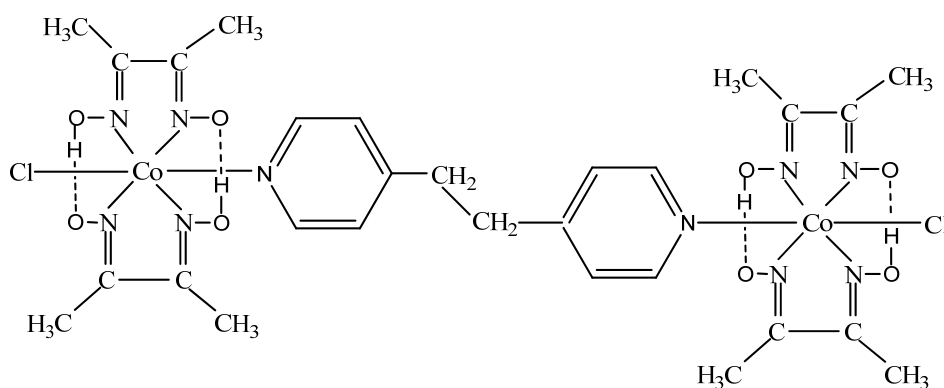


Fig.3. Structura moleculei binucleare  $[\text{Co}_2(\text{DH})_4\text{bpeCl}_2]$ .

În spectrul RMN  $^1\text{H}$  al complexului  $[\text{Co}_2(\text{DH})_4\text{bpeCl}_2] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$  se observă un semnal în regiunea 2,32 ppm ce corespunde grupelor metil ale ligandului  $\text{DH}_2$ . Prezența unui singur semnal dovedește faptul că grupele metil sunt echivalente din punct de vedere magnetic. Semnalul din regiunea 18,45 ppm confirmă prezența în complex a legăturilor de hidrogen intramoleculare.

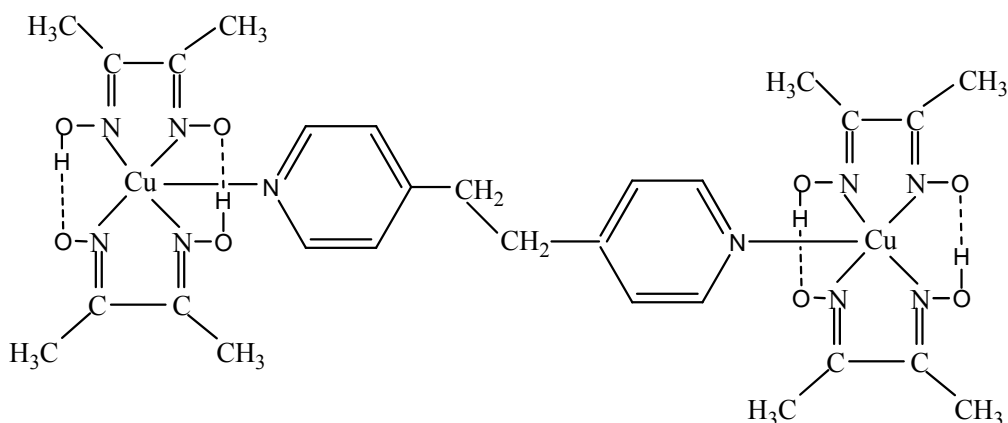


Fig.4. Structura moleculei binucleare  $[\text{Cu}_2(\text{DH})_4\text{bpeCl}_2]$ .

Ligandul axial bpe se manifestă în regiunile 7,33 (2H, d,  $J=6,18$  Hz) ppm și 7,90 (2H, d,  $J=5,91$  Hz) ppm, semnalele respective aparținând protonilor inelelor aromatice și în regiunea 2,79 ppm (4H, s) ce aparține grupelor  $\text{CH}_2$ . Prezența unui singur semnal pentru aceste grupe de asemenea denotă că sunt echivalente din punct de vedere magnetic. La integrarea semnalelor în spectrul RMN  $^1\text{H}$  s-a constatat că raportul dintre liganzii DH și bpe este de 4:1.

În complexul binuclear 4 generatorul de complex manifestă numărul de coordinare 5, la ionul de cupru coordonând patru atomi de azot ai grupelor oximice ale celor doi monoanioni dimetilglioiximici, care sunt uniți prin două legături de hidrogen intramoleculare. În poziția a cincea la cationul de cupru coordonează azotul piridinic al ligandului punte bpe.

În spectrul IR al compusului 4 sunt prezente o serie de benzi: 3047, 2916, 1606, 1560, 1501, 1423, 1219, 1073, 1009, 963, 840, 813, 728, 552, 535, 487  $\text{cm}^{-1}$ .

În complexul 5 fiecare cation  $\text{Zn}^{2+}$  este hexacoordinat din contul a trei atomi de oxigen și trei de azot într-o sferă geometrică octaedrică. Planul bazal al poliedrului de coordinare este alcătuit de către molecula bidentată  $\text{NioxH}_2$  și doi anioni acetat monodentați. Poziția apicală este ocupată de către o moleculă de apă și ligandul bidentat bpy, care îndeplinește funcția de ligand punte. Molecula neutră  $\text{NioxH}_2$  coordonează într-un mod tipic

bidentat, prin intermediul atomilor de azot oximici, formând astfel un ciclu chelat din cinci membri cu generatorul de complex. Doi anioni acetat coordonează în mod monodentat și ocupă celelalte două poziții ale planului bazal.

Spectrul IR al compusului 5 conține benzi caracteristice pentru grupa oximică: oscilațiile de valență  $\nu(\text{O-H})$  caracteristice 1,2-ciclohexandiondioximei au fost înregistrate la  $3192\text{ cm}^{-1}$ ; benzile  $\nu(\text{N-O})$  au fost observate la  $\sim 1259, 1217, 949\text{ cm}^{-1}$ . Banda la  $1600\text{ cm}^{-1}$  poate fi atribuită atât oscilațiilor de valență  $\nu(\text{CC})$ , cât și  $\nu(\text{C=N})$  ale ligandului coordonat bpy. Banda din regiunea  $1491\text{ cm}^{-1}$  corespunde oscilațiilor de valență  $\nu_s(\text{C=C})$  ale ligandului punte. În intervalul  $613\text{-}666\text{ cm}^{-1}$  au fost observate picurile corespunzătoare oscilațiilor de valență  $\gamma(\text{CCC})$  și  $\gamma(\text{CNC})$  ce aparțin ligandului ciclic.

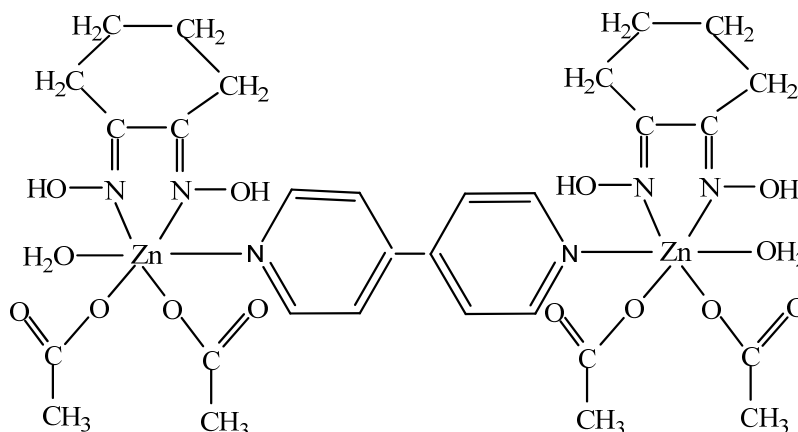


Fig.5. Structura moleculei binucleare  $[\text{Zn}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{NioxH}_2)_2\text{bpy}(\text{H}_2\text{O})_2]$ .

Prezența resturilor de acetat în complecși este demonstrată de oscilațiile  $\delta(\text{CH}_3) \sim$  la  $1460, 1434, 1353$  și  $\rho(\text{CH}_3)$  la  $1040\text{ cm}^{-1}$ . Pe lângă acestea au fost depistate oscilațiile de valență  $\nu(\text{COO})$  în regiunile  $1550, 1409\text{ cm}^{-1}$ , precum și  $\pi(\text{COO})$  în regiunea  $613\text{ cm}^{-1}$ . Benzile la  $3003, 2948\text{ cm}^{-1}$  au fost atribuite oscilațiilor de valență  $\nu(\text{CH})$ . De asemenea, au fost observate oscilațiile  $\nu(\text{CC})$  în regiunea  $930\text{ cm}^{-1}$ . Oscilațiile metal-ligand M-O-C au fost înregistrate la  $\sim 1980\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{M-O}) + \nu(\text{C-C})$  la  $\sim 518\text{ cm}^{-1}$  și  $\nu(\text{M-N})$  la  $\sim 420\text{ cm}^{-1}$ .

### Cercetări biologice

Studiile de reglare și stimulare a biosintezei enzimelor au o importanță deosebită pentru stabilirea unor legături de formare a fermenților sub acțiunea factorilor externi de influență, stabilirea unor noi căi de dirijare și orientare a sintezei microbiene. Elementele Zn, Cu, Co prezintă importanță vitală pentru organismele vii, inclusiv microorganisme, fiind implicate în procesele de sinteză a lipidelor, proteinelor, activare a formelor zimogene ale enzimelor, în metabolismul fosfaților, transcrierea și stabilizarea moleculei de ADN etc. [19,23,24,61]. Sub acest aspect prezintă interes studiul influenței compușilor coordinativi care conțin în calitate de atomi generatori de complecși ionii metalelor menționate asupra capacității biosintetice a micromicetelor producătoare de substanțe biologice active, în particular de enzime hidrolitice.

Efectul biologic al compușilor coordinativi a fost evaluat după gradul de influență asupra activității enzimatică a micromicetelor din diferite genuri și cu sisteme enzimatică diferite, cum prezintă: *Aspergillus niger* – producătoare de celuloze și xilanaze, *Trichoderma koningii* și *Fusarium gibbosum* – producătoare de proteaze, precum și din diferite genuri cu sisteme enzimatică similare: *Trichoderma koningii* și *Fusarium gibbosum* – producătoare de proteaze.

Cercetările s-au efectuat pe fundalul mediilor nutritive și regimurilor de cultivare optimizate, care asigură atât condiții optime pentru creșterea și dezvoltarea culturilor, cât și pentru biosinteza maximă a enzimelor.

#### a) Influența compușilor coordinativi ai Zn (II), Co(II) și Cu(II) în bază de oxime asupra activității celulozolitice și xilanolitice la micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 10

În cercetările asupra tulpinii de *Aspergillus niger* au fost utilizați compușii coordinativi:  $[\text{Co}_2(\text{DH})_4\text{bpeCl}_2] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$  (3),  $[\text{Cu}_2(\text{DH})_4\text{bpe}]$  (4),  $[\text{Zn}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{NioxH}_2)_2\text{bpy}(\text{H}_2\text{O})_2]$  (5).

În calitate de martor a servit activitatea enzimatică a micromicetei manifestată la cultivarea pe mediul de bază (fără compuși coordinativi). Influența compușilor coordinativi asupra producerii de celuloze și xilanaze a fost urmărită în dinamică, pe parcursul a 4 zile de cultivare (a 6-a; a 7-a, a 8-a și a 9-a zi), perioadă de sinteză maximă a componentelor complexului enzimatic –  $\beta$ -glucozidaze, endoglucanaze (a 8-a zi), xilanaze (a 7-a zi) la cultivarea producătorului în condiții clasice (Tab.1).

Tabelul 1

**Influența compușilor coordinativi ai zincului, cobaltului și cuprului în bază de oxime asupra activității celulozolitice și xilanazice a micromicetei *Aspergillus niger* CNMN FD 10**

Comp. coord.	Conc. (mg/L)	$\beta$ -glucozidaze				endoglucanaze				xilanaze			
		a 6-a zi	a 7-a zi	a 8-a zi	a 9-a zi	a 6-a zi	a 7-a zi	a 8-a zi	a 9-a zi	a 6-a zi	a 7-a zi	a 8-a zi	a 9-a zi
3	5	1,28	2,28	2,44	1,85	4,95	6,36	7,34	6,20	107,93	89,11	105,53	60,93
	10	1,47	2,28	2,47	1,82	5,00	6,53	7,18	6,04	100,97	104,66	104,45	64,41
	15	1,28	2,21	2,28	1,82	3,59	5,55	6,53	5,87	97,48	82,03	87,04	62,66
4	5	1,25	2,48	2,55	1,90	4,79	6,12	7,99	8,16	104,45	107,49	113,52	86,17
	10	1,31	2,17	2,62	1,66	4,90	6,53	8,81	8,16	104,45	118,81	91,39	90,52
	15	1,36	2,10	2,40	1,48	0,14	5,71	7,18	6,69	104,45	118,81	91,39	64,41
5	5	1,33	2,47	2,28	1,90	5,00	6,61	7,34	6,04	94,00	76,38	87,04	71,37
	10	1,25	2,37	2,44	1,95	4,90	6,61	3,59	6,36	97,48	84,86	91,39	73,11
	15	1,20	2,28	2,59	1,69	5,00	6,04	3,26	6,36	94,21	90,52	91,39	87,04
Martor	-	1,09	2,51	2,59	1,90	4,24	6,12	8,00	7,50	79,21	94,44	80,51	63,54

La analiza datelor obținute privind modificarea activității hidrolazelor la micromiceta *Aspergillus niger* s-a constatat că includerea compușilor testați în mediul nutritiv al producătorului nu influențează sinteza  $\beta$ -glucozidazelor. Deși în ziua a 6-a de cultivare în variantele experimentale, cultivate în prezența compușilor coordinativi nominalizați, se înregistrează o sporire a activității  $\beta$ -glucozidazelor – 1,33-1,47 u/ml față de nivelul martorului zilei – 1,09 u/ml, în zilele următoare de cultivare (a 7-a – a 8-a zi) diferența se atenuază. Activitatea  $\beta$ -glucozidazică a probelor experiment practice se echivalează cu activitatea martorului, constituind 2,47-2,62 u/ml, față de 2,51-2,59 u/ml, respectiv. Similară este influența compușilor Co(III) și Zn(II) asupra endoglucanazelor: activitatea enzimelor superioară martorului în zilele a 6-a – a 7-a – 4,90-5,00 u/ml și 6,36-6,61 u/ml comparativ cu 4,24 u/ml și 6,12 u/ml în varianta martor, prezintă valori sub nivelul martorului în ziua de biosinteză maximă – 7,18-7,34 u/ml față de 8,00 u/ml, respectiv.

Diferit de compușii Co(III) și Zn(II), compusul Cu(II) exercită influență biostimulatoare asupra biosintezei endoglucanazelor. În concentrația de 10 mg/L a compusului, activitatea enzimelor este superioară martorului pe toată perioada de cultivare, constituind 8,81 u/ml comparativ cu 8,00 u/ml în varianta martor în ziua de biosinteză maximă. Adicional, compusul menține cultura în stare activă și în ziua a 9-a de cultivare, activitatea endoglucanazelor constituind 8,16 u/ml față de 7,50 u/ml în proba de referință. Extinderea fazei staționare prezintă o caracteristică pozitivă a producătorului ca obiect biotehnologic. În cazul metalocomplexului Zn(II), activitatea ambelor componente enzimatică –  $\beta$ -glucozidazelor și endoglucanazelor – pe parcursul zilelor a 7-a – a 9-a de cultivare rămâne sub nivelul martorului în toate concentrațiile testate.

Sporirea activității enzimatice la etapa inițială (ziua a 6-a) de cultivare poate fi atribuită acțiunii de intensificare a dezvoltării culturii sub influența compușilor coordinativi, ce provoacă reducerea fazelor de dezvoltare a microorganismului și apariția în termen mai precoce a  $\beta$ -glucozidazelor și endoglucanazelor în mediul de cultivare.

Interes mai semnificativ prezintă compușii testați pentru stimularea xilanazelor din complexul enzimatic sintetizat de *Aspergillus niger*. În ziua a 6-a de cultivare a producătorului se marchează o sporire semnificativă a activității xilanazelor în variantele experiment – 97,48 u/ml pentru compusul Co(III), 107,93 u/ml – a Cu(II), 104,45 u/ml – a Zn(II), comparativ cu 94,44 u/ml în varianta martor în ziua a 7-a de cultivare – perioade de sinteză maximă pentru martor. Prin urmare, aplicarea compușilor testați accelerează procesul de sinteză a xilanazelor cu 24 ore față de martor, acoperind maxima biosintezei martorului în termene mai precoce. Activitate superioară a xilanazelor – 118,81 u/ml în a 7-a zi de cultivare – s-a marcat la compusul coordinativ al cuprului, sporul constituind 25,8% față de martor.

Compușii binucleari ai cobaltului și cuprului pot fi considerați stimulatori veritabili ai biosintezei xilanazelor la tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 10, asigurând sporirea biosintezei enzimei în toate variantele de concentrații testate și extinderea fazei staționare, cu menținerea culturii în stare activă timp de 72 de ore. Metalocomplexul zincului cu 1,2-ciclohexandiondioxima și 4,4-dipiridil nu sporește biosinteza xilanazelor, activitatea enzimei (94,0-97,48 u/ml) rămâne la nivelul martorului în ziua de biosinteză maximă pentru cultură, dar provoacă manifestarea mai precoce a maximei – cu 24 ore, ce prezintă eficiențe tehnologice la obținerea preparatelor enzimactice.

Rezultatele cercetărilor demonstrează influența selectivă a compușilor coordinați testați asupra biosintezei componentelor enzimactice ale complexului celulozo-xilanazic sintetizat de tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 10: introducerea compușilor testați în mediul de cultivare a micromicetei nu influențează biosinteza  $\beta$ -glucozidazelor și influențează diferențiat biosinteza endoglucanazelor și xilanazelor. Astfel, compușii Co(III) și Zn(II) modifică termenul de manifestare a maximumului de biosinteză a xilanazelor din ziua a 7-a – în ziua a 6-a, reducând ciclul de cultivare a micromicetei cu 24 ore. Metalocomplexul Cu(II) sporește activitatea xilanazelor față de proba de referință, asigurând un spor de 25,8%. Efectele menționate asigură posibilități de racordare a compoziției preparatelor enzimactice în raport cu exigențele sferei de aplicare și eficiențe tehnologice în producerea de enzime.

**b) Influența compușilor coordinați ai Zn(II), Cu(II) și Co(III) în bază de oxime asupra biosintezei proteazelor la tulpina de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15**

Tulpina de fungi miceliali *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 se distinge prin capacitatea de a sintetiza toate trei tipuri de proteaze: acide (pH 3,6), neutre (pH 7,4) și bazice (pH 9,2). Complexele enzimactice sintetizate de un singur producător manifestă sinergism de acțiune mai exprimat, ce determină profunzimea proceselor de hidroliză a substraturilor, iar enzimele componente posedă însușiri mai omogene, ameliorând utilizarea lor practică [68].

În cercetările de stabilire a efectului metalocomplecșilor asupra biosintezei proteazelor de către *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 au fost incluși compușii coordinați ai cobaltului cu selenocarbamida  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Seu})_{7/4}(\text{Se-Seu})_{1/4}]_2[\text{TiF}_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1), ai cuprului cu disulfanilamidgloxima  $[\text{Cu}(\text{DSamH}_2)_3]\text{SO}_4$  (2) și ai zincului cu 4,4-bipiridilul  $[\text{Zn}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{NioxH}_2)_2\text{bpy}(\text{H}_2\text{O})_2]$ . Influența compușilor coordinați asupra activității proteolitice a micromicetei a fost evaluată în dinamică, pe parcursul zilelor a 8-a – a 10-a de cultivare, zile de manifestare a maximei de biosinteză a proteazelor în condiții de cultivare clasică a producătorului (Tab.2 și 3).

**Tabelul 2**

**Influența compușilor coordinați ai zincului, cobaltului și cuprului în bază de oxime asupra activității proteazelor acide la micromiceta *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15**

Compusul coordinați	Conc. (mg/L)	Activitatea proteazelor acide (pH 3,6)					
		a 8-a zi		a 9-a zi		a 10-a zi	
		u/ml	% față de martor	u/ml	% față de martor	u/ml	% față de martor
<b>1</b>	5	0,42	53,2	0,84	52,8	0,08	19,0
	10	0,67	84,8	3,53	222,0	0,50	119,0
	15	0,42	53,2	2,18	137,1	0,42	100,0
<b>2</b>	5	1,76	222,8/ 110,7*	0,92	57,9	0,59	140,5
	10	1,93	244,3/ 121,4*	0,08	5,0	0,42	100,0
	15	0,84	106,3	0,0	0,0	0,0	-
<b>5</b>	5	1,92	243,0/ 110,2*	1,26	79,2	0,42	100,0
	10	1,68	212,6/ 105,7*	1,51	94,9	0,37	88,1
	15	1,43	181,0	0,50	31,4	0,08	19,0
<b>Martor</b>	-	<b>0,79</b>	<b>100</b>	<b>1,59</b>	<b>100</b>	<b>0,42</b>	<b>100</b>

\*față de martorul zilei/ de valoarea maximă a martorului (ziua a 9-a)



În conformitate cu datele din acest tabel, compusul cobaltului cu dimetilgloxima și selenocarbamidă –  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Seu})_{7/4}(\text{Se-Seu})_{1/4}]_2[\text{TiF}_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$  în concentrații de 10-15 mg/L sporește biosinteza proteazelor acide cu 122,0-37,1% și a proteazelor neutre cu 13,8-44,1%, activitatea enzimatică constituind 3,53-2,18 u/ml comparativ cu 1,59 u/ml în varianta martor și 3,38-4,28 u/ml comparativ cu 2,97 u/ml în varianta martor, respectiv, pentru proteazele acide și neutre. Complexul nu modifică ciclul biologic de dezvoltare a tulpinii: maxima de biosinteză enzimatică se manifestă în ziua a 9-a de cultivare și coincide cu maxima biosintezei proteazelor în varianta martor. Activitatea enzimatică sub nivelul activității martorului a variantelor experiment în ziua a 8-a de cultivare indică la necesitatea adaptării culturii la noile condiții de mediu, ce conduce la extinderea în vreme a lag-fazei și la reținerea multiplicării celulelor [6,60].

În cazul compusului coordinativ al Cu cu disulfanilamidgloxima, maxima de biosinteză a proteazelor acide 1,76-1,93 u/ml se înregistrează în ziua a 8-a de cultivare, depășind valoarea maximei controlului (1,59 u/ml) din ziua a 9-a cu 110,7-121,4%. Concentrațiile favorabile constituie 5 și 10 mg/L, sinteza maximă fiind asigurată de concentrația superioară. În ziua a 9-a de cultivare biosinteza proteazelor acide înscrie valori semnificativ inferioare variantei martor.

Tabelul 3

**Influența compușilor coordinativi ai zincului, cobaltului și cuprului în bază de oxime asupra activității proteazelor neutre la micromiceta *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15**

Compusul coordinativ	Conc. (mg/L)	Activitatea proteazelor neutre (pH 7,4)					
		a 8-a zi		a 9-a zi		a 10-a zi	
		u/ml	% față de martor	u/ml	% față de martor	u/ml	% față de martor
<b>1</b>	5	2,15	94,7	2,90	97,6	1,19	52,4
	10	2,27	100,0	3,38	113,8	0,89	39,2
	15	2,27	100,0	4,28	144,1	1,77	77,9
<b>2</b>	5	4,04	177,9	4,53	152,5	3,15	138,8
	10	3,03	133,5	2,64	88,9	3,27	144,1
	15	2,01	88,5	2,52	84,8	2,64	116,3
<b>5</b>	5	5,04	222,0	1,89	63,6	1,52	66,9
	10	3,21	141,4	1,89	63,6	1,98	87,2
	15	2,90	127,7	1,52	51,2	1,89	83,3
<b>Martor</b>	-	<b>2,27</b>	<b>100</b>	<b>2,97</b>	<b>100</b>	<b>2,27</b>	<b>100</b>

Privind biosinteza proteazelor neutre, adăugarea la mediul de cultivare a compusului binuclear al Cu(II) (**4**) nu modifică manifestarea maximă de biosinteză a enzimei. Maxima activității proteazelor neutre de 4,53 u/ml se manifestă analog variantei martor – în ziua a 9-a de cultivare, depășind nivelul martorului cu 52,5%. La adăugarea complexului Cu(II) în mediul nutritiv al micromicetei în concentrații de 5-10 mg/L activitatea proteazelor neutre este superioară martorului pe toată perioada de cultivare – zilele a 8-a – a 10-a, ce caracterizează complexul ca un stimulator specific al proteazelor neutre la micromiceta *Trichoderma koningii* Oudemans. Apariția în cantități mai mari în termen mai precoce a proteazelor neutre în mediul de cultură indică asupra mecanismului de sporire a biosintezei prin intensificarea dezvoltării și multiplicării culturii în prezența metalocomplexului în mediul de cultivare.

Complexul binuclear al Zn(II) manifestă influență evident biostimulatoare asupra proteazelor acide și neutre și accelerarea manifestării maximei de biosinteză, ce indică asupra acțiunii de intensificare a dezvoltării și multiplicării culturii exercitate de metalocomplex. În ziua a 8-a de cultivare, în toate concentrațiile testate activitatea proteazelor, atât acide, cât și neutre, este superioară activității martorului zilei, precum și a zilei de biosinteză maximă pentru martor, constituind 1,92; 1,68 și 1,43 u/ml față de 0,79 u/ml în martorul zilei și 1,59 u/ml (ziua a 9-a) pentru proteazele acide și, respectiv, 5,04, 3,21, 2,90 u/ml față de 2,27 u/ml și 2,97 u/ml în varianta martor, în zilele a 8-a – a 9-a pentru proteazele neutre. Sporul maxim pentru proteazele acide constituie 110,2%, pentru proteazele neutre 69,7% și este asigurat de concentrația compusului de 5 mg/L.

**c) Influența compușilor coordinați ai Co(III), Cu(II) și Zn(II) în bază de oxime asupra biosintezei proteazelor la tulpina de micromicete *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12**

Reieșind din faptul că micromicetele *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 și *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 sintetizează complexe enzimatiche similare, în cercetările cu tulpina *Fusarium gibbosum* a fost utilizată aceeași grupă de compuși coordinați ai Co (1), Cu (2) și Zn (5) în bază de oxime. Influența compușilor coordinați asupra activității proteolitice a micromicetei a fost evaluată în dinamică, pe parcursul zilelor a 4-a – a 6-a de cultivare, ce corespunde perioadei manifestării maximului de biosinteză pentru *Fusarium gibbosum* în condiții de cultivare clasică (Tab.4 și 5).

Tabelul 4

**Influența compușilor coordinați ai zincului, cobaltului și cuprului în bază de oxime asupra activității proteazelor acide la micromiceta *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12**

Compușul coordinațiv	Conc., mg/L	Activitatea proteazelor acide (pH 3,6)					
		a 4-a zi		a 5-a zi		a 6-a zi	
		u/ml	%, față de martor	u/ml	%, față de martor	u/ml	%, față de martor
1	5	0,17	33,3	4,28	154,5	0,67	57,1
	10	0,76	150,0	4,70	169,7	0,42	35,7
	15	0,08	16,7	4,54	163,6	0,59	50,0
2	5	0,25	50,0	4,28	154,5	2,02	171,4
	10	0,59	116,7	2,69	97,0	0,71	64,3
	15	0,42	83,3	2,52	90,9	0,17	14,3
5	5	0,17	33,3	4,79	172,7	0,59	50,0
	10	0,92	183,3	3,95	142,4	0,59	50,0
	15	0,50	100,0	2,35	84,8	0,50	42,9
<b>Martor</b>	-	<b>0,50</b>	<b>100,0</b>	<b>2,77</b>	<b>100,0</b>	<b>1,18</b>	<b>100,0</b>

Tabelul 5

**Influența compușilor coordinați ai zincului, cobaltului și cuprului în bază de oxime asupra activității proteazelor neutre la micromiceta *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12**

Compușul coordinațiv	Conc., mg/L	Activitatea proteazelor neutre					
		a 4-a zi		a 5-a zi		a 6-a zi	
		u/ml	%, față de martor	u/ml	%, față de martor	u/ml	%, față de martor
1	5	3,61	286,7	6,05	180,0	1,26	50,0
	10	1,68	133,3	5,71	170,0	1,26	50,0
	15	1,01	80,0	4,70	140,0	1,05	41,7
2	5	2,02	160,0	6,30	187,5	3,53	140,0
	10	1,60	126,7	5,96	177,5	4,20	166,7
	15	1,34	104,3	4,79	142,5	2,52	100
5	5	2,18	173,3	4,66	138,8	3,19	126,7
	10	1,34	106,7	5,88	175,0	3,36	133,3
	15	2,52	200,0	6,47	192,5	0,67	26,7
<b>Martor</b>	-	<b>1,26</b>	<b>100,0</b>	<b>3,36</b>	<b>100,0</b>	<b>2,52</b>	<b>100,0</b>

La administrarea compusului cobaltului cu dimetilglioximă și selenocarbamidă (1) maximul activității s-a înregistrat la concentrațiile 5-10 mg/L (în funcție de tipul enzimelor), sporul maxim al activității constituind 69,7% pentru proteazele acide și 80,0% pentru proteazele neutre.

În concentrația optimă (5 mg/L), compusul marcat asigură intensificarea biosintezei proteazelor neutre, confirmat prin faptul că în a 4-a zi de cultivare activitatea proteolitică este practic echivalentă cu cea a matorului din ziua a 5-a.

În a 5-a zi de cultivare, în toate variantele experiment activitatea ambelor tipuri de proteaze este superioară matorului, sporul activității variind între 54,5 și 69,7% – în cazul proteazelor acide și între 40 și 80% – în cazul proteazelor neutre. Activitatea maximă a proteazelor acide este asigurată de concentrația de 10 mg/L compus, activitatea proteazelor neutre – de concentrația de 5 mg/L.

În cazul compusului coordonativ al Cu cu sulfanilamidă (2), valorile maxime ale activității enzimatică se fixează la administrarea concentrației minime testate – 5 mg/L, diminuând odată cu majorarea concentrației. Activitatea proteazelor acide constituie 4,28 u/ml, sporul fiind de 54,5%. La concentrația 10-15 mg/L, activitatea diminuează în medie cu 5% sub nivelul matorului. Proteazele neutre manifestă o activitate de 4,79-6,30 u/ml, fiind cu 42,5-87,5% superioară probei de referință.

La administrarea compusului zincului cu 1,2-ciclohexandiondioxima (5) în concentrație de 5 mg/L sporul activității proteazelor acide constituie 78,3%. Nivelul superior al activității proteazelor neutre – 6,17 u/ml – este determinat la adăugarea compusului în concentrație de 15 mg/L (spor de 90%).

În rezultatul investigațiilor a fost constatat efectul stimulator al compușilor coordonativi testați asupra activității proteazelor acide și neutre la micromiceta *Fusarium gibbosum*, sporul constituind 42,4-72,5% pentru proteazele acide și 38,8-92,5% pentru proteazele neutre față de mator, variind în funcție de concentrațiile aplicate. În toate variantele experimentale maximul activității proteazelor acide și neutre se manifestă în a 5-a zi de cultivare și coincide cu maximul de biosinteză a variantei mator. În a 6-a zi de cultivare activitatea ambelor tipuri de proteaze scade semnificativ, marcând, în majoritatea cazurilor, valori cu 50% și mai mult, sub nivelul probelor mator.

### Concluzii

Pe exemplul tulpinilor de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 10 – producător de celuloze și xilanaze, *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15, *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – producătoare de proteaze acide și neutre s-a demonstrat dependența efectului exercitat de compușii coordonativi ai Co, Cu, Zn cu liganzi oximici asupra biosintezei hidrolazelor exocelulare de taxonomia tulpinilor de micromicete și sistemele enzimatică sintetizate.

A fost stabilit efectul diferențiat al compușilor testați asupra activității componentelor complexului celulozo-xilanazic sintetizat de tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 10 și a proteazelor acide și neutre la tulpina *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15:

- ✓ introducerea compușilor testați în mediul de cultivare a micromicetei *Aspergillus niger* CNMN FD 10 nu influențează biosinteza β-glucozidazelor și influențează diferențiat biosinteza xilanazelor. Astfel, compușii Co și Cu asigură sporirea biosintezei enzimei în toate variantele de concentrații testate și extinderea fazei staționare, cu menținerea culturii în stare activă timp de 72 de ore. Metalocomplexul zincului nu sporește biosinteza xilanazelor, activitatea enzimei (94,0-97,48 u/ml) rămâne la nivelul matorului în ziua de biosinteză maximă pentru cultură, dar provoacă manifestarea mai precoce a maximei cu 24 ore (din ziua a 7-a – în ziua a 6-a);
- ✓ compusul cobaltului cu dimetilglioximă și selenocarbamidă –  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Seu})_{7/4}(\text{Se-Seu})_{1/4}]_2[\text{TiF}_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$  – sporește biosinteza ambelor tipuri de proteaze ale micromicetei *Trichoderma koningii*: acide cu 122,0-37,1%, neutre cu 13,8-44,1%. Complexul nu modifică ciclul biologic de dezvoltare a tulpinii;
- ✓ compusul coordonativ al cuprului cu disulfanilamidglioxima sporește biosinteza proteazelor acide cu 110,7-121,4% față de control cu accelerarea manifestării maximei din ziua a 9-a (în control) în ziua a 8-a. Maxima biosintezei proteazelor neutre se manifestă analog variantei mator – în ziua a 9-a de cultivare, depășind nivelul activității matorului cu 52,5%;
- ✓ complexul zincului manifestă influență evident stimulatorie asupra activității proteazelor acide și neutre ale micromicetei *Trichoderma koningii* cu accelerarea manifestării maximei de biosinteză pentru ambele tipuri de proteaze din ziua a 9-a (variantea mator) în ziua a 8-a de cultivare, sporul maxim pentru proteazele acide constituind 110,2 %, pentru proteazele neutre 69,7% .

S-a constatat influența similară a compușilor testați asupra biosintezei proteazelor la tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, cu asigurarea sporirii proteazelor acide cu cca 49-73% și a celor neutre cu 80-93%, maximul activității ambelor tipuri de proteaze fiind înregistrat în ziua a 5-a de cultivare, analog variantei martor.

#### Bibliografie:

- BULHAC, I. *Sinteza, proprietățile fizico-chimice și structura compușilor coordinativi de fier, cobalt, nichel și cupru cu  $\alpha$ -dioxime* / Autoreferat al tezei de doctor habilitat în chimie. Chișinău, 2000.
- CILOCI, A., BIVOL, C., STRATAN, M. et al. The effect of  $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{An})_2]_2[\text{TiF}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  coordination compound on polypeptide spectrum of amyolytic preparation from *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02a strain. In: *Analele Universității din Oradea. Fascicula Biologie*, 2012, nr.19(2), p.128-132. ISSN 1224-5119
- CLAPCO, S., BIVOL, C., CILOCI, A. et al. The effect of some metal complexes of oxime ligands on proteolytic activity of *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 strain. In: *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, 2013, nr.20(1), p.53-58. ISSN 1224-5119
- CLAPCO, S., BIVOL, C., DESEATNIC-CILOCI, A. et al. The influence of coordination compound of zinc(II) with dioxime on proteolytic activity of *F. gibbosum* CNMN FD 12. In: *Simpozionul internațional „Prioritățile chimiei pentru o dezvoltare durabilă” PRIOCHEM*, ediția a IX-a, 24-25 octombrie 2013. București, România, p.19.
- COCU, M., CILOCI, A., TIURINA, J. et al. The influence of nickel(II) and copper(II) coordination compounds based on benzoylacetone s-methylisothiosemicarbazone on enzymatic activity of micromycete *Aspergillus niger* CNMN FD 10. In: *Revue Roumaine de Chimie*, 2012, no.57(1), p.23-27. ISSN 0035-3930
- COCU, M., CLAPCO, S., GĂRBĂLĂU, N. et al. Synthesis and biological study of Ni(II), Cu(II) and VO(II) coordination complexes based on acetylacetone or benzoylacetone S-methylisothiosemicarbazone. In: *Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering RICCCE XV*, vol.1, Bucharest, Romania, 2005, p.51-53.
- COROPCEANU, E., BOUROSH, P., LIPKOWSKI, J. et al. Synthesis and structure of the dimer  $[\text{Co}_2(\text{DH})_4(\text{bptha})\text{Cl}_2]$ . In: *5<sup>th</sup> International Conference on Materials Science and Condensed Matter Physics and Symposium “Electrical Methods of Materials Treatment” in Memoriam of Acad. Boris Lazarencu*. September 13-17, 2010. Moldova, Chișinău, p.83.
- COROPCEANU, E., DESEATNIC, A., RIJA, A. et al. The synthesis and the study of the biological activity of some cobalt(III) dioximates with flourine containing anions. In: *Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry*, 2008, no.3(2), p.70-80. ISSN 1857-1727
- COROPCEANU, E., DESEATNIC, A., RIJA, A. și al. Studiul comparativ al proprietăților biostimulatoare ale unor dimetilglioximați ai Co(III) cu anioni polifluorurați. În: *Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”*, 2008, nr.2, p.212-216. ISSN 1857-1735
- COROPCEANU, E.B., CROITOR, L., BOTOSHANSKY, M.M. et al. Wheel-and-axle” binuclear Cu(II) dioximates mediated by 1,2-bis(4-pyridyl)ethane: synthesis and X-ray study. In: *Polyhedron*, 2011, no.30, p.2592-2598. ISSN 0277-5387
- CROITOR, L., COROPCEANU, E., JEANNEAU, E. et al. Anion-induced generation of binuclear and polymeric Cd(II) and Zn(II) coordination compounds with 4,4-bipyridine and dioxime ligands. In: *Crystal Growth & Design*, 2009, vol.9, p.5233-5243. ISSN 1528-7483
- DEMPSEY, J.L., WINKLER, J.R., GRAY, H.B. Kinetics of electron transfer reactions of  $\text{H}_2$ -evolving cobalt diglyoxime catalysts. In: *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, no.132(3), p.1060-1065. ISSN 0002-7863
- DESEATNIC, A., TIURIN, J., RUDIC, V. et al. Zinc(II) and Copper(II) coordination compounds containing  $\alpha$ -aminoacids as stimulators of microbial enzyme activity. In: *International Symposium on “Metal Elements in Environment, Medicine and Biology”*. Timisoara, Romania, November 4-6, 2002, p.139-142.
- DESEATNIC-CILOCI, A., COROPCEANU, E., BULHAC, I. et al. The influence of coordinative compounds of Zn(II), Cu(II) and Co(III) with dioximes on the biosynthetic activity of micromycete *Aspergillus niger* CNMN FD 10. In: *The XVII International Conference “Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry”*, Chisinau, Moldova, October 24-26 2012, p.97-98.
- DESEATNIC-CILOCI, A., LAZARESCU, A., CLAPCO, S., ș.a. Influența compușilor tiosemicarbazonici în baza acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic asupra activității proteolitice a tulpinii de fungi *Trichoderma sp.* În: *Progrese în știința compușilor organici și macromoleculari. A XXIII-a Sesiune de Comunicări Științifice a I.C.M. „P.Poni”*, Iași, 1 octombrie, 2011, p.2.
- DESEATNIC-CILOCI, A., TIURINA, J., CIAPURINA, L., et al. Coordination compounds of copper with aminoacids as potential stimulators of micromycetes extracellular hydrolases biosynthesis. In: *Simpozionul internațional „Prioritățile chimiei pentru o dezvoltare durabilă PRIOCHEM*, ediția a IX-a, 24-25 octombrie 2013, București, România, p.119-121.
- DESEATNIC-CILOCI, A.A., TIURINA, J.P., CLAPCO, S.F. et al. The influence of complex compounds of transition metals on proteolytic activity of strains from genera *Fusarium* and *Trichoderma*. In: *The XVII International Conference “Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry”*, Chisinau, Moldova, October 24-26 2012, p.99-100.
- DOLGANOV, A.V., BELOV, A.S., NOVIKOV, V.V. et al. Iron vs. cobalt clathrochelate electrocatalysts of HER: the first example on a cage iron complex. In: *Dalton Trans.*, 2013, 42, p.4373-4376. ISSN 1477-9226
- DUGAS, H. *Bioorganic chemistry*. Springer-Verlag, New York, Inc. 1996, 700 p. ISBN-13: 978-0-387-94494-4

20. DULCEVSCAIA, G., KRAVTSOV, V., MACAEV, F. et al. New copper(II) complexes with isoconazole: synthesis, structures and biological properties. In: *Polyhedron*, 2013, 52, p.106-114. ISSN 0277-5387
21. FILIPPOVA, I., GHERCO, O., SIMONOV, YU. et al. Synthesis, structures and biological properties of nickel(II) phthalates with imidazole and its derivatives. In: *Polyhedron*, 2010, 29, p.1102-1108. ISSN 0277-5387
22. GERBELEU, N., COROPCEANU, E., BOLOGA, O., SIMONOV, YU., DESEATNIC, A. Synthesis, structure and properties of Co(III) dioximates which contain hexafluorosilicate ion. In: *The 30-th Annual Congress of the American Romanian Academy of Arts and Sciences (ARA)*. Central publishing House, Chișinău, 2005, p.204-207.
23. GRECU, I., NEAMȚU, M., ENESCU, L. *Implicații biologice și medicale ale chimiei anorganice*. Iași, 1982. 300 p.
24. HAIDUC, I., EDELMANN, F.T. *Supramolecular Organometallic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, 1999. 470 p. ISBN 3-527-29533-X
25. INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL AȘM. Tulpina de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN15-producătoare de proteaze acide, neutre și alcaline: Brevet de invenție MD 4285, Inventatori: DESEATNIC-CILOCI, A., TIURINA, J., BIVOL, C., CLAPCO, S., LABLIUC, S., DVORNINA E., STRATAN, M. Publ. 2014-05-31, BOPI 5/14.
26. INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL AȘM. Tulpină de fungi *Fusarium gibbosum* – producătoare de proteaze acide și neutre, xilanaze și  $\beta$ -glucozidaze: Brevet de invenție MD 4186, Inventatori: CILOCI, A., TIURINA, J., LUPAȘCU, G., CLAPCO, S., LABLIUC, S., STRATAN, M., DVORNINA, E., SAȘCO, E. Publ. 2012-11-30, BOPI 11/12.
27. INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL AȘM. Tulpină de fungi *Aspergillus niger* – producătoare de enzime cu activitate celulozolică și xilanazică. Brevet de invenție MD 4072, Inventatori: CILOCI, A., TIURINA, J., CLAPCO, S., LABLIUC, S., STRATAN, M., GRUMEZA, M. Publ. 2010 -03-12, BOPI 12/10.
28. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FAAR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Fenol reagents. In: *Journal of Biological Chemistry*, 1951, nr.48, p.17-25. ISSN 0021-9258
29. MALINOVSKY, ȘT., COROPCEANU, E., BOLOGA, O., DESEATNIC, A. Tetrafluorine containing Co(III) dioximates: synthesis, structure and properties. In: *Conferința Națională de Chimie, 23-25 octombrie, 2002. Călimănești-Căciulata, Vâlcea, România*, p.141.
30. McCORMIC, T.M., CALITREE, B.D., ORCHARD, A. et al. Reductive side of water splitting in artificial photosynthesis: new homogeneous photosystems of great activity and mechanistic insight. In: *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132 (44), p.15480-15483. ISSN 0002-7863
31. MOKHIR, A., KRAMER, R., VOLOSHIN, Y.Z., VARZATSKII, O.A. Synthesis and DNA binding properties of dioxime-peptide nucleic acids. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, 14, 11, p.2927-2930. ISSN 0960-894X
32. MULFORT, K.L., TIEDE, D.M. Supramolecular cobaloxime assemblies for H<sub>2</sub> photocatalysis: an initial solution state structure-function analysis. In: *J. Phys. Chem. B.*, 2010, 114 (45), p.14572-14581. ISSN 1520-6106
33. NAUR, P., PETERSEN, B.L., MIKKELSEN, M.D., et al. CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates. In: *Arabidopsis. Plant Physiology*, 2003, vol.133, p.63-72. ISSN 0176-1617
34. NIKLAS, J., MARDIS, K.L., RAKHIMOV, R.R. et al. The Hydrogen Catalyst Cobaloxime: A Multifrequency EPR & DFT Study of Cobaloxime's Electronic Structure. In: *J. Phys. Chem. B.*, 2012, 116(9), p.2943-2957. ISSN 1520-6106
35. PROSKINA, N., GERBELEU N.V., DRAGANCEA, D. et al. New Ni(II) complexes of hidrazones end their influence on enzymogenesis process of some *Penicillium* strains. In: *Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering RICCE XV*, Bucharest, Romania, 2005, vol.1, p.58-62.
36. RIJA, A., BOUROSH, P., COROPCEANU, E., MOROZAN, M., BULHAC, I. Synthesis and structure of new bis (sulfanilamide) glyoxime and its coordination compound with Cu(II). In: *The 6<sup>th</sup> International Conference on Materials Science and Condensed Matter Physics*. Chișinău, Republic Moldova. September 11-14, 2012, p.103.
37. RUDIC, V., CEPOI, L., RUDI, L. et al. Acțiunea compușilor coordinativi ai cobaltului cu dioximele asupra unor procese biosintetice la alga roșie *Porphyridium cruentum*. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Seria „Științele vieții”*, 2012, nr.1, p.144-151. ISSN 1857-064X
38. RUDIC, V., GULEA, A., COJOCARI, A. et al. Sinteza orientată a exopolizaharidelor de către cianobacteria *Nostoc linckia (Roth) Born et Flah CNM-CB-03*. În: *Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova. Seria „Științe chimico-biologice”*, 2001, p.96-99. ISSN 1811-2617
39. STRATAN, M. Biotehnologii de cultivare a tulpinii *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02a – producător de amilaze / Autoreferat al tezei de doctor în biologie. Chișinău, 2011.
40. ȘHUBINSKA, A.S., VARBANET, L.D., SEIFULLINA, I.I. et al. Effect of coordination germanium compounds on biosynthesis and activity of proteases. In: *Bacillus* sp. and *Yarrowia lipolytica*. *Microbiol. Journal*, 2008, T.70, no4, p.3-9. ISSN 0201-8462
41. USATÎI, A., TOPALĂ, L., CHIRIȚA, E. et al. Productivitatea, lipidogeneza și carotenogeneza drojdiei *Rhodotorula gracilis* CNM-YS-III/20 la cultivarea în prezența compușilor coordinativi ai Mo(VI), Cr(III), Co(III), V(V). În: *Buletinul Academiei de Științe. Seria „Științele biologice, chimice și agricole”*, 2003, nr.1, p.99-103. ISSN 1857-064X

42. VALDEZ, C.N., DEMPSEY, J.L., BRUNSCHWIG, B.S. et al. Catalytic hydrogen evolution from a covalently linked dicobaloxime. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2012, vol.109, no39, p.15589-15593.
43. VOLOSHIN, Y.Z., BELOV, A.S., VOLOGZHANINA, A.V. Synthesis, structure, properties and immobilization on a gold surface of the monoribbed-functionalized tris-dioximate cobalt(II) clathrochelates and an electrocatalytic hydrogen production from H<sup>+</sup> ions. In: *Dalton Trans.*, 2012, 41(20), p.6078-6093. ISSN 1477-9226
44. VOLOSHIN, Y.Z., KOSTROMINA, N.A., KRAMER, R. *Clathrochelates: synthesis, structure and properties*. Amsterdam: Elsevier, 2002. 419 p. ISBN 0-444-51223-3
45. WEN, F., YANG, J., ZONG, X. et al. Photocatalytic H<sub>2</sub> production on hybrid catalyst system composed of inorganic semiconductor and cobaloximes catalysts. In: *Journal of Catalysis*, 2011, no281, p.318-324. ISSN 0021-9517
46. БОУРОШ, П.Н., КОРОПЧАНУ, Э.Б., ДЕСЯТНИК, А.А. et al. Супрамолекулярная организация структуры кристаллов соединения [Co(DH)<sub>2</sub>(PP)<sub>2</sub>][BF<sub>4</sub>]·2H<sub>2</sub>O и его биологические свойства. В: *Коорд. Химия*, 2009, Т.35, №10, с.761-767. ISSN 0132-344X
47. БОУРОШ, П.Н., КОРОПЧАНУ, Э.Б., ДЕСЯТНИК, А.А. et al. Новые диоксиматы Co(III) с гексафторофосфат-ионом – стимуляторы протеолитической активности микромицета *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12. В: *Коорд. Химия*, 2013, 39 (11), p.669-678. ISSN 0132-344X
48. ВАРБАНЕЦ, Л.Д., РАЗАЕВА, О.Н., АВДЮК, Е.В. et al. Влияние координационных соединений германия на активность ряда гликозидаз. В: *Микробиол. Журнал*, 2007, Т.69, №3, с.11-18. ISSN 0201-8462
49. ВОЛОШИН, Я.З., ВАРЗАТСКИЙ, О.А., БУБНОВ, Ю.Н. Клеточные комплексы переходных металлов в биохимии и медицине. В: *Известия АН. Сер. хим.*, 2007, №4, с.555-582. ISSN 0002 3353
50. ГРАЧЁВА, И.М., ГРАЧЁВ, Ю.П., МОСИЧЕВ, М.С. et al. *Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов*. Москва. Легкая и пищевая промышленность, 1982, с.41-44.
51. ДЕСЯТНИК, А.А., ТЮРИНА, Ж.П., КЛАПКО, С.Ф. et al. Влияние диоксиматов кобальта (III) с фторсодержащими анионами на биосинтез амилаз *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02A и липаз *Rhizopus arrhizus* Fisher CNMN FD 03 L. В: *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*, 2010, №4, с.85-90. ISSN 0002-3558
52. ДЕСЯТНИК, А.А., ТЮРИНА, Ж.П., ЛАБЛЮК, С.В. et al. Особенности биосинтеза липаз штаммом *Aspergillus niger* CNMN FD 01L на средах оптимального состава. В: *Микробиология и биотехнология*. Одесский Национальный Университет им. И.И. Мечникова, 2007, № 1, с.46-52. ISSN 0201-8462
53. ДЕСЯТНИК, А., СЫРБУ, Т., КОРОПЧАНУ, Э. Et al. Изменение липолитической активности штамма *Aspergillus niger* 412 под влиянием координационных соединений. În: *Buletinul Academiei de Științe. Seria „Științele biologice, chimice și agricole”*, 2003, vol.291, nr.2, p.112-1173. ISSN 1857-064X
54. ДЕСЯТНИК, А.А.; ГЭРБЭЛЭУ, Н.В., КОРОПЧАНУ, Э.Б. et al. Использование диметилглиоксиматов Co(III) при биосинтезе пектиназ. В: *Rhizopus arrhizus. Коорд. Химия*, 2002, Т.28, №2, с.144-145. ISSN 0132-344X
55. ДОСПЕХОВ, Б. *Планирование полевого опыта и статистическая обработка данных*. Москва: Колос, 1985, с.192-196.
56. Закиров, М.З. *Ферменты плесневых грибов*. Ташкент, 1975, с.51-69.
57. КОКУ, М.А., ТЮРИНА, Ж.П., ГРЭДИНАРУ, Д.И. et al. Биологические свойства координационных соединений никеля(II) и меди(II) на основе S-метилизотиосемикарбазида. В: *XXII Международная Чугаевская конференция по координационной химии*, Кишинёв, 20-24 июня, 2005, с.387.
58. КОНОВАЛОВ, С.А. *Биосинтез ферментов микроорганизмами*. Москва: Пищевая промышленность, 1972. 270 с.
59. КОРОПЧАНУ, Э.Б., БОЛОГА, О.А., БОУРОШ, П.Н., ДЕСЯТНИК, А.А. Фторсодержащие α-диоксиматы Co(III). Синтез, строение, свойства. XXII. В: *Международная Чугаевская конференция по координационной химии*, Кишинёв, 20-24 июня, 2005, с.394.
60. ЛАМБЕРОВА, М.Э., СКИБА, Е.А. *Моделирование биотехнологических процессов*. Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2011. 114 с.
61. ПАРШИЕВ, Н.А., КУШАКБАЕВ, А., АЗИМОВ, М.М. *Координационные соединения металлов с лекарственными препаратами*. Ташкент: ФАН, 1982. 138 с.
62. РИЖА, А.П., НИКОЛЕСКУ, А., СОРАН, А. Синтез и исследование некоторых фторсодержащих диоксиматов Co(III) с селеномочевинной. В: *Коорд. Химия*, 2011, Т.37, №10, с.759-767. ISSN 0132-344X
63. РОДИОНОВА, Н.А., ТИУНОВА, Н.А., ФЕНИКСОВА, Г.Ф. Методы определения целлюлазной активности. В: *Прикладная биохимия и микробиология*, 1966. Т.2, вып. 2, с.197-205. ISSN 0555-1099
64. СТРАТАН, М., РИЖА, А.П., КОРОПЧАНУ, Э.Б. et al. Комплексные соединения Co(III) с диоксиматами как биостимуляторы активности микромицета *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 A – продуцент амилаз. В: *13-я международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых*, Пуццино, Россия, 28 сентября-2 октября 2009. с.178-179.
65. ЧИЛОЧИ, А.А., ТЮРИНА, Ж.П., БОЛОГА, О.А. Комплексные соединения молибдена и ванадия как возможные стимуляторы биосинтеза внеклеточных целлюлаз микромицета *Penicillium expansum* CNMN FD 05 C. В: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Seria „Științele vieții”*, 2012, 3(318), p.158-165. ISSN 1857-064X

Prezentat la 28.11.2014