

CZU:664.644.5:547.1+669.892/.3:577.151.5

INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI BARIULUI ȘI STRONȚIULUI ASUPRA BIOSINTEZEI AMILAZELOR EXTRACELULARE LA MICROMICETA *Aspergillus niger* CNMN FD 06

CONDRUC Viorica¹, CILOCI Alexandra¹, BULHAC Ion², CLAPCO Steliana¹,
COCU Maria², BOUROSH Polina², DVORNINA Elena¹, LABLIUC Svetlana¹,
URECHE Dumitru²

¹Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, str. Academiei 1, Chișinău, R. Moldova

²Institutul de Chimie, str. Academiei 3, Chișinău, R. Moldova

Rezumat. *Prezentul studiu a avut drept scop stabilirea condițiilor optime de aplicare a compușilor coordinativi heterometalici ai bariului și stronțului în tehnologia cultivării micromicetei *Aspergillus niger* CNMN FD 06 ca strategie de sporire a biosintezei amilazelor exocelulare. S-a constatat că complexii heterometalici $[Ba(L)_3-\mu_2-(NCS)_2-Co(NCS)_2]$, $[Sr(L)_3][Co(NCS)_4]$ obținuți în bază de piridin-2,6-dicarbonil diclorură și săruri de Sr(II), Ba(II) și Co(II) manifestă proprietăți biostimulatoare și de intensificare a biosintezei amilazelor. În concentrațiile optime selectate - 1 mg/L – pentru $[Ba(L)_3-\mu_2-(NCS)_2-Co(NCS)_2]$ și 5 mg/L – pentru $[Sr(L)_3][Co(NCS)_4]$, compușii asigură atât sporul activității enzimatică (cu 39,2 și, respectiv 42,9%), cât și modificarea termenului de manifestare a maximei de biosinteză. Maxima activității enzimatică s-a înregistrat la pH-ul inițial al mediului de cultivare 5,0, stabilit anterior drept optim pentru sinteza amilazelor exocelulare la cultivare clasică.*

Cuvinte cheie: *amilaze, *Aspergillus niger*, cultivare submersă, producerea amilazelor, compuși coordinativi.*

INFLUENCE OF COORDINATIVE COMPOUNDS OF BARIUM AND STRONTIUM ON EXTRACELLULAR AMYLASE BIOSYNTHESIS IN MICROMICET *Aspergillus niger* CNMN FD 06

Abstract. *The aim of this study was to establish the optimal conditions for the application of barium and strontium heterometallic coordinating compounds in the technology of *Aspergillus niger* CNMN FD 06 micromycete cultivation as a strategy of exocellular amylase biosynthesis enhancing. Heterometallic $[Ba(L)_3-\mu_2-(NCS)_2-Co(NCS)_2]$, $[Sr(L)_3][Co(NCS)_4]$ complexes obtained from pyridine-2,6-dicarbonyl dichloride and Sr(II), Ba(II) and Co(II) salts have been found to exhibit biostimulating and enhancing properties on amylase biosynthesis. The compounds, applied in optimal selected concentrations - 1 mg /L - for $[Ba(L)_3-\mu_2-(NCS)_2-Co(NCS)_2]$ and 5 mg /L - for $[Sr(L)_3][Co(NCS)_4]$, ensure both the increase of the enzymatic activity (by 39.2 and, respectively 42.9%), as well as the modification of the term of manifestation of the maximum of biosynthesis. The peak of enzymatic activity was recorded at the initial pH of the culture medium 5.0, previously established as optimal for the synthesis of exocellular amylases in classical conditions of cultivation.*

Keywords: *amylase, *Aspergillus niger*, submerged cultivation, amylase production, coordination compounds.*

Introducere

Amilazele (EC 3.2.11, 3.2.12, 3.2.13) reprezintă o clasă de enzime care scindează amidonul, catalizând hidroliza legăturilor glicozidice în poziția α -1,4 prezente în

molecula de amidon [1], cu producerea diferitor polizaharide, precum dextrina, maltoza și glucoza [18].

În scopuri industriale prioritate se acordă amilazelor microbiene [2, 17]. Avantajele deosebite pentru care sunt apreciate amilazele microbiene prezintă activitatea lor înaltă, specificitatea largă de substrat, proprietățile de termo- și acidstabilitate care asigură capacitatea de a activa la temperaturi extrem de înalte (până la 100°C) și valori joase de pH (2.0-2.5) [20, 22].

Principalele surse microbiene pentru producerea amilazelor sunt speciile de *Bacillus* [11, 12, 16] și *Aspergillus* [2, 13-15]. Aspergillii produc o varietate mare de enzime extracelulare dintre care amilazele, după diversitatea și volumul de aplicare, ocupă poziția lider. Acestea sunt pe larg utilizate în majoritatea ramurilor industriei alimentare (fabricarea băuturilor, coacerea pâinii), cât și în industriile textilă, farmaceutică, în producerea hârtiei și detergenților [3, 14, 19], substituind complet hidroliza chimică a amidonului în procesele tehnologice [2, 17].

Extinderea domeniilor de aplicare a amilazelor argumentează necesitatea realizării unor studii de evidențiere a noilor posibilități de intensificare a proceselor de biosinteză microbială.

Din acest punct de vedere prezintă interes utilizarea în calitate de stimulatori a compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție. În cercetările de ultima oră compușii coordinativi ai elementelor „d” și „s” marchează rezultate promițătoare în sinteza microbială orientată [4-10, 21].

Studiul prezent a avut drept scop stabilirea condițiilor optime de aplicare a compușilor coordinativi heterometalici ai bariului și stronțului în tehnologia cultivării micromicetei *Aspergillus niger* CNMN FD 06 ca strategie de sporire a biosintezei amilazelor exocelulare.

Rezultate și discuții

Selectarea concentrațiilor optime de compuși coordinativi ai bariului și stronțului ce asigură sinteza maximală a amilazelor exocelulare la micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 06

În cercetări anterioare complecșii heterometalici $[\text{Ba}(\text{L})_3-\mu_2-(\text{NCS})_2-\text{Co}(\text{NCS})_2]$, $[\text{Sr}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ obținuți în bază de piridin-2,6-dicarbonil diclorură și săruri de Sr(II), Ba(II) și Co(II) au fost evaluate ca perspectivi biostimulatori ai biosintezei amilazelor exocelulare la tulpina de micromicete *A. niger* CNMN FD 06, asigurând un spor al activității enzimatică (cu cca 35-50%).

În scopul stabilirii condițiilor optime de cultivare a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 – producătoare de amilaze exocelulare a fost extins diapazonul de concentrații ale bariului și stronțului cu ligandul L. Ținând cont de faptul că ambii compuși au exercitat influență benefică asupra productivității tulpinii de *A. niger* în concentrația minimă testată (5 mg/L), concentrațiile mai mari având efect neutru sau chiar inhibitor, în cadrul studiilor curente accentul a fost plasat pe analiza influenței concentrațiilor mici: 1, 5 și 10 mg/L. Experiențele au fost realizate în dinamică pe parcursul a 5 și 6 zile de cultivare – perioada de sinteză maximală a enzimelor amilolitice la tulpina în studiu. Compușii au fost adăugați la mediul de cultivare optimizat anterior. În calitate de probă de referință a servit activitatea variantei cultivate în absența metalocomplexilor.

În baza rezultatelor obținute se constată că compusul bariului, în concentrație de 1 și 5 mg/L, influențează pozitiv acumularea amilazelor la micromiceta *A. niger* pe parcursul ambelor zile de cultivare, activitatea variind între 96,68-110,08 u/mL în ziua a 5-a și respectiv 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 enzimatică asigurată de suplimentarea mediului cu compusul bariului a variat între 32,7-82,0% (Figura 1)

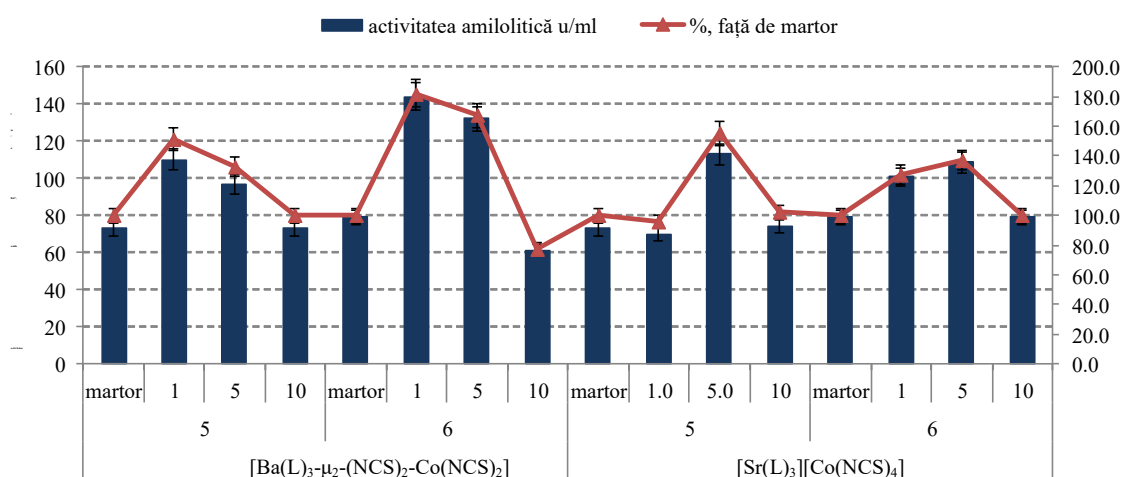


Fig. 1. Influența diferitor concentrații a compușilor coordinativi ai Ba și Sr asupra activității amilolitice a micromicetei *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

În ambele zile de cultivare valorile maxime ale activității enzimatică se remarcă la concentrația minimă testată (1 mg/L), sporul activității constituind 51,1% în ziua a 5-a și 82,0% în ziua a 6-a. La cultivarea micromicetei în prezența metalocomplexului

în concentrație de 5 mg/L activitatea a depășit nivelul martorului cu 32,7 și respectiv 67,1%. De menționat că la ambele concentrații activitatea amilolitică relevată în ziua a 5-a de cultivare depășește inclusiv nivelul maximal al activității probei martor marcat în ziua a 6-a, sporul activității în raport cu acesta constituind 39,2% la concentrația de 1 mg/L și 22,2% la 5 mg/L.

În aceleași condiții, în cazul compusului coordinativ al stronțiului, activitatea a variat în limitele de 69,88-113,06 u/mL și 79,09-108,57 u/mL, în ziua a 5-a și a 6-a, corespunzător. Similar compusului bariului, efectul pozitiv a fost înregistrat doar în cazul concentrației de 1 (în ziua a 6-a de cultivare) și 5 mg/L. Adăugarea la mediul de cultivare a compusului $[\text{Sr}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ în concentrație de 5 mg/L asigură intensificarea procesului de biosinteză, maxima activității enzimatică fiind marcată în a 5-a zi de cultivare, valoarea dată depășind nivelul maximal al probei martor cu 42,9% și, mai puțin semnificativ (în medie cu 8%) nivelul probei cultivate în prezența compusului coordinativ timp de 6 zile.

În a 6-a zi de cultivare activitatea se menține la cote superioare, fiind mai înaltă față de cea prezentată de varianta martor cu 27,3 și 37,3% la concentrația de 1 și respectiv 5 mg/L.

Reieșind din rezultatele obținute se constată că concentrațiile optime ale compusului bariului și stronțiului cu ligandul polidentat în bază de piridin-2,6-dicarbonil diclorură, care exercită efect stimulator maximal (39,2 și respectiv 42,9%) asupra activității amilazelor exocelulare a tulpinii de interes biotehnologic *Aspergillus niger* CNMN FD 06 și intensificarea procesului de biosinteză este 1 mg/L – pentru $[\text{Ba}(\text{L})_3-\mu_2-(\text{NCS})_2-\text{Co}(\text{NCS})_4]$ și 5 mg/L – în cazul metalocomplexului $[\text{Sr}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$.

Selectarea pH-ului inițial al mediului de cultivare ce asigură sinteza maximală a amilazelor exocelulare la micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 06 la cultivarea în prezența compușilor coordinativi ai bariului și stronțiului

La faza ulterioară a investigațiilor compușii coordinativi ai bariului și stronțiului cu liganzi polidentati au fost adăuși în concentrațiile optime selectate în mediul nutritiv cu diferite valori ale pH-ului – 4,0; 5,0; 6,0 și 7,0. În calitate de probă de referință a servit activitatea enzimatică a variantei cultivate în absența compușilor coordinativi, pe mediu cu pH inițial 5,0, selectat anterior drept optim pentru asigurarea creșterii și dezvoltării tulpinii fungice *A. niger* CNMN FD 06, precum și sintezei enzimelor amilolitice.

Conform rezultatelor prezentate în Figura 2 se constată că pH-ul inițial al mediului nutritiv optim pentru biosinteza amilazelor exocelulare este plasat în mediul acid, la valoarea 5,0. În baza datelor experimentale s-a stabilit că în cazul cultivării micromicetei producătoare în prezența compușilor coordinativi cu proprietăți biostimulatoare pH-ul optim ce asigură sinteza maximală a enzimelor amilolitice este similar celui determinat anterior pentru cultivarea în condiții clasice. Astfel, activitatea enzimatică în variantele cultivate în medii cu pH-ul 5,0, în prezența metalocomplecșilor Ba și Sr constituie 114,46 u/mL (a 5-a zi) și respectiv 148,06 u/mL (a 6-a zi) – în cazul I-ului compus, 116,43 (a 5-a zi) și 120,02 u/mL (a 6-a zi) – în cazul celui de-al II-lea compus, față de valoarea de 76,23 u/mL și 92,02 u/mL, corespunzător, marcată în proba martor. Efectul stimulator înregistrat în experiențele anterioare se menține, sporul activității constituind 50,2 și 60,9%, față de martorul din aceeași zi – pentru compusul bariului și 52,7, respectiv, 30,4% – pentru metalocomplexul ce conține stronțiu. Comparând valorile relevate în a 5-a zi de cultivare în probele cultivate în prezența stimulatorilor cu valoarea maximală a activității probei de referință prezentată în ziua a 6-a se constată sporul activității amilazelor cu 24,4 și 26,5%, respectiv, în cazul compusului Ba și Sr, diferența dintre activitatea relevată în ziua a 5-a și a 6-a în varianta cultivată pe medii ce conțin complexul stronțului fiind neesențială.

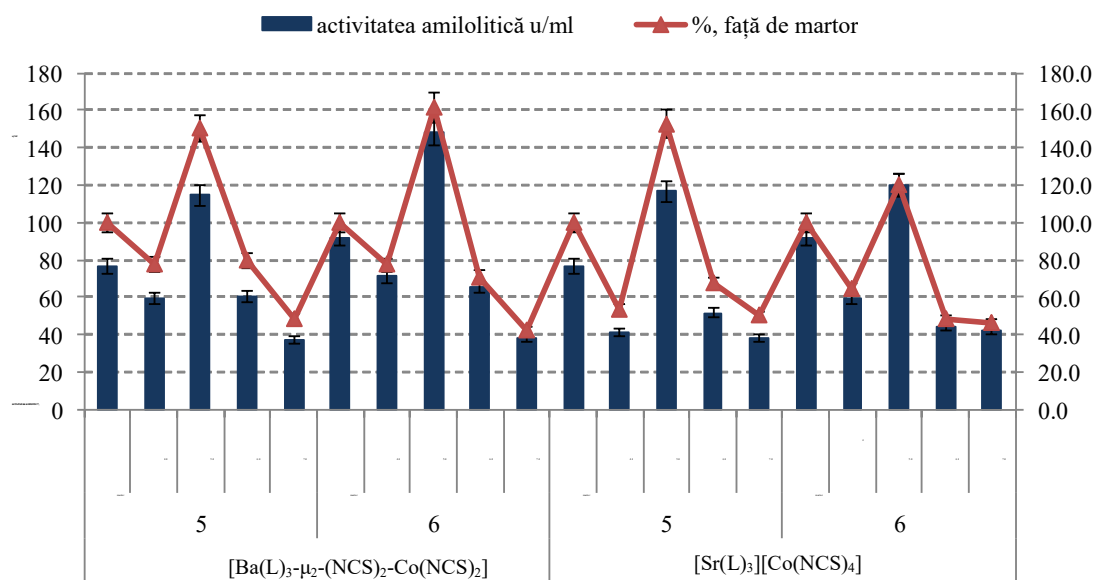


Fig. 2. Influența compușilor Ba(II) și Sr(II) în concentrațiile optime selectate (Ba – 1 mg/L; Sr – 5 mg/L) asupra activității amilolitice a micromicetei *Aspergillus niger* CNMN FD 06, în funcție de diferite valori ale pH-ului mediului de cultivare.

La valorile acide de pH (4,0) activitatea amilolitică este cu cca 24% (I-ul compus) și respectiv 40-60% (al II-lea compus) mai redusă față de activitatea probei martor cultivată pe mediu cu pH optim, în absența compușilor coordinativi. O diminuare de cca 20-60% se marchează și în cazul variantelor cultivate pe medii cu pH 6,0 și 7,0.

În baza rezultatele obținute se constată că picul activității enzimaticice în probele cultivate în prezența compușilor coordinativi ai Ba și Sr cu liganzi polidentati este înregistrat la pH-ul inițial al mediului de cultivare 5,0 – valoare stabilită anterior drept optimă pentru sinteza amilazelor exocelulare la micromiceta producătoare *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

Concluzii

- Compleșii heterometalici $[\text{Ba}(\text{L})_3-\mu_2-(\text{NCS})_2-\text{Co}(\text{NCS})_2]$, $[\text{Sr}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ obținuți în bază de piridin-2,6-dicarbonil diclorură și săruri de Sr(II), Ba(II) și Co(II) noi sintetizați au manifestat proprietăți biostimulatoare și de intensificare a biosintezei amilazelor, asigurând atât sporul activității enzimaticice (cu cca 30-80%), cât și modificarea termenului de manifestare a maximei de biosinteză a enzimelor de interes;
- Concentrațiile de 1 mg/L – pentru $[\text{Ba}(\text{L})_3-\mu_2-(\text{NCS})_2-\text{Co}(\text{NCS})_2]$ și 5 mg/L – în cazul metalocomplexului $[\text{Sr}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ asigură reducerea ciclului tehnologic cu 24 ore și exercită efect stimulator maximal (39,2 și respectiv 42,9%) asupra activității amilazelor exocelulare ale tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 06;
- Maxima activității enzimaticice în variantele experimentale se înregistrează la pH-ul inițial al mediului de cultivare 5,0 – valoare stabilită anterior drept optimă pentru sinteza amilazelor exocelulare pentru micromiceta dată la cultivare clasică.

Cercetările au fost efectuate în cadrul PS 2020-2023 a Republicii Moldova prin proiectele 20.80009.5007.28 „Elaborarea noilor materiale multifuncționale și tehnologii eficiente pentru agricultură, medicină, tehnică și sistemul educațional în baza compleșilor metalelor „s” și „d” cu liganzi polidentati ”cu finanțare de către ANCD.

Bibliografie

1. AJAYI, A.E; FAGADE, O.E. Growth pattern and structural nature of amylases produced by some *Bacillus* species in starchy substrates. *African Journal of Biotechnology*. 2006, 5, 440-444.

2. ALVA, S.; ANUMPAMA, J.; SAVLA, J. et al. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. *Afr. J. Biotechnol.* 2007, 6, 576-581.
3. BANU, C. et al. *Biotehnologii în industria alimentara*, București: Ed. Tehnica, 2000. p. 467 – 506.
4. BULHAC, I.; URECHE, D.; BOUROȘ, P.; COCU, M.; CILOCI, A.; CONDRUC, V.; DVORNINA, E. *Tris(2,6-dimetil piridincarboxilat-1kONO)-di-μ-(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II) cobalt(II) cu proprietăți de biostimulator al sintezei principiilor bioactive la fungi*. Cerere de brevet de invenție nr. 6910 din 09.09.2021.
5. CILOCI, A.; TIURINA, J.; BULHAC, I.; CLAPCO, S.; DANILESCU, O.; LABLIUC, S.; DVORNINA, E. *Nutrient medium for cultivation of fungal strain Fusarium gibbosum* CNMN FD 12. Brevet de invenție MD 4645, 2020.03.31.
6. CONDRUC, V. Methods for oriented synthesis of exocellular amylases using fungal strain *Aspergillus niger* CNMN 06. In: *XIth International congress of geneticists and breeders from the Republic of Moldova*, 2021, 15-16 June, Chișinău, Republic of Moldova, p.152.
7. COROPCEANU, E.; DESEATNIC, A.; RIJA, A.; BOLOGA, O.; TIURIN, J.; LABLIUC, S.; CLAPCO, S.; CONDRUC, V.; STRATAN, M.; BULHAC I. Studiul comparativ al proprietăților biostimulatoare ale unor dimetilglioximați ai Co(III) cu anioni polifluorurați. *Studia Universitatis, științe ale naturii*. 2008, nr. 2, 212-216.
8. DESEATNIC, A.; COROBCEANU, E.; TIURIN, J.; LABLIUC, S.; ROTARU, V.; BOLOGA, O.; GARABĂLĂU, N. Co (III) dioximates which contain fluorine- stimulators of the biosynthesis of microorganisms' enzymes. In: „*SICHEM-2000. International Chemistry Show*”. 3-6 october, 2000. București: Univ. „Politehnica”. p. 388-393.
9. DESEATNIC, A.; TIURIN, J.; LABLIUC, S. et al. Effect of coordinative compounds of Zn (II) on biosynthesis capacity of microscopic fungi-hydrolases producers. In: *Fiziologia și biochimia plantelor la început de mileniu: realizări și perspective*. Chișinău, 2002. p.228-231.
10. DESEATNIC, A.; TIURIN, J.; ROTARU, V. et al. Procedee avansate de sinteză orientată a enzimelor hidrolitice microbiene. In: *Conferința științifico-practică „Tehnologiile avansate în pragul secolului 21”*, Chișinău, 2000. p. 121-123.
11. DEUTCH, C.E. Characterization of salttolerant extracellular alpha–amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Letters in Applied Microbiology*. 2002, 35, 78–84.
12. DEY, G.; PALIT, S.; BANERJEE, R.; MAITI, B.R. Purification and characterization of malto-oligosaccharide forming amylase from *Bacillus circulans* GRS 313. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002, 28, 193–200.
13. HERNANDEZ, M.S.; RODRIGUEZ, M.R.; PEREZ GUERRA, N.; PEREZ ROSES, R. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*. 2006, 73, 93–100.
14. MABEL, S.H.; RODRÍGUEZ, M.R.; GUERRA, N.P.; ROSÉS, R.P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*. 2006, 73, 93-100.

15. MONGA, M.; GOYAL, M.; KALRA, K.L.; SONI, G. Production and stabilization of amylases from *Aspergillus niger*. *Mycosphere*. 2011, 2(2), 129–134.
16. NURMATOV, S.K.; AKHMEDOVA, Z.R.; RAKHIMOV, D.A. Isolation, purification and properties of alpha amylase from *Bacillus subtilis* – 7A. *Chemistry of Natural Compounds*. 2001, 37, 364–368.
17. PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R. et al. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2000, 31, 135–152.
18. RIAZ, N.; HAQ, I.U.; QADEER, M.A. Characterization of α -amylase by *Bacillus subtilis*. *Int J Agr Biol*. 2003, 5(3), 249–252.
19. SINDHU, R.; BINOD, P.; UMMALYMA, S.B. et al. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technol. Biotechnol*. 2018, 56, 16-30.
20. ГАЛИЧ, И.П. *Амилазы микроорганизмов*. Киев: Наукова Думка, 1987, 191 с.
21. ДЕСЯТНИК, А.; ТЮРИН, Ж.; ТУРТА, К.; ЛАБЛЮК, С.; КОНДРУК, В.; СЫРБУ, Т.; ДЬЯКОН, И.; ЧАПУРИНА, О. Использование комплекса меди (3) с серином и треонином в качестве биостимулятора ферментов активности штампов *Aspergillus niger* 33 CNMN FD 06A и *Rhizopus arrhizus* CMNN FD 03. *Buletinul AŞM. Ştiinţe biologice şi chimice*. 2004, 3, 74-79.
22. КВЕСИТАДЗЕ, Г.И. *Грибные и бактериальные амилазы*. Тбилиси, 1984, с. 8.