

Invenția se referă la chimia coordinativă, în special la un compus coordinativ heterodinuclear de Ba-Co și poate fi utilizată în biotehnologia cultivării fungilor miceliali în scopul sporirii biosintezei enzimelor și productivității de biomasă microbiană.

Este cunoscut un procedeu de obținere a biomasei miceliale a ciupercii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. într-un mediu nutritiv fără de metale în componența sa [1]. Neajunsul invenției constă în faptul că mediul nutritiv creat nu conține metale bivalente, care influențează esențial procesul de biosinteză.

Un efect de stimulare a biosintezei de enzime sau biomasă se poate de asigurat în unele cazuri prin includerea în mediul nutritiv a unor compuși coordinativi specifici cu liganzi polidentati. De exemplu, în procedeul de creștere a ciupercii *Lentinus edodes* se prevede ca la stadiul de cultivare a masei miceliale se utilizează un mediu format din clorură de mangan(II), glucoză și L-asparagină [2]. Procedeul permite obținerea unei pelicule pigmentate de miceliu, care condiționează reducerea ulterioară a perioadei de cultivare pe substrat.

Dezavantajul procedurii constă în faptul că acesta nu asigură și o mărire a biomasei miceliale.

Este necesar de menționat faptul că unii compuși coordinativi nu posedă proprietăți de biostimulatori ai biosintezei, ci din contra, se manifestă ca inhibitori. De exemplu, în cazul biosintezei enzimelor amilolitice de micromiceta *Aspergillus niger* în prezența compușilor coordinativi cu liganzi polidentati (Bulhac I. et al. Structure and some biological properties of Fe(III) complexes with nitrogen-containing ligands. Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry, 2016, vol. 11(1), pp. 39-49).

Este cunoscut procedeul de cultivare a ciupercii *Lentinus edodes* cu scopul măririi biomasei de lectine – proteine extracelulare non-imunoglobulare, în medii care conțin săruri simple de metale de tranziție bivalente și liganzi simpli – etilenglicol, glucoza și asparagina [3]. Acești ioni manifestă un efect de stimulare a activității lectinelor, care se explică prin formarea unor complecși cu liganzi micști cu lectine și gluco-conjuțați. Cu toate acestea utilizarea acestor metale și liganzi nu influențează esențial procesul de creștere a biomasei ciupercii *Lentinus edodes*. Este cunoscut un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 prin utilizarea unui biostimulator al sintezei enzimelor amilolitice heterodinuclear cu formula $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Anilina})_2]_2[\text{TiF}_6]$, în care DH – reprezintă anionul dimetilgloximat [4]. După cum reiese din formula de mai sus ionii de metal nu sunt uniți între ei, ci fac parte din cationi și anioni complecși. Deși biostimulatorul este activ, el nu este stabil la păstrare și coroziv, interacționează cu sticla datorită prezenței fluorului în anionul de hexafluortitanat.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în extinderea gamei de compuși coordinativi ai cobaltului cu proprietăți de biostimulatori prin obținerea unui compus coordinativ nou heterodinuclear, în care ionii de metal să fie legați între ei - tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di-μ-(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II) cu formula $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$ (L = esterul dimetilic al acidului 2,6-piridindicarboxilic) cu proprietăți de biostimulator al activității enzimatice și productivității de biomasă la tulpinile de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 06 producător de amilaze, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN FB 01 producător de biomasă micelială cu proprietăți curative și nutraceutice la un ciclu mai redus de cultivare. Totodată, compusul heterodinuclear biostimulator să fie cristalizabil, stabil la păstrare și noncoroziv.

Esența invenției constă în faptul că se propune un compus coordinativ nou - $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$ cu proprietăți de biostimulator al sintezei amilazelor exocelulare la tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 06 și productivității de biomasă micelială la *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN FB 01.

Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea unui complex heterodinuclear monocristalin nou bine cristalizabil și noncoroziv $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$ (L = esterul dimetilic al acidului 2,6-piridindicarboxilic), care, fiind introdus în componența mediului nutritiv al producătorilor, sporesc biosinteza amilazelor la tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 06 și productivitatea de biomasă micelială la *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01 cu reducerea ciclului de cultivare cu 24...48 ore. Complexul manifestă influență stimulatorie asupra biosintezei amilazelor exocelulare la micromiceta *Aspergillus niger*, depășind la concentrațiile de 0,001 și 0,005 g/L respectiv cu 51,08 și 32,68% matorul zilei (ziua a 5-a de cultivare) și cu 39,18 și 22,24% maxima matorului (ziua a 6-a de cultivare), facilitând reducerea ciclului tehnologic cu 24 de ore.

Aplicarea compusului coordinativ heterometalic $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$ în procedeul de cultivare a tulpinii de fungi *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN -FB -01 producător de biomasă micelială, asigură sporirea cantității de biomasă acumulată deja în ziua a 6-a de cultivare până la 27,13...28,15 g/L comparativ cu 20,46 g/L maxima matorului în ziua a 8-a de cultivare, ceea ce depășește nivelul maximei matorului cu 32,6...37,6 % în funcție de concentrația aplicată, totodată reducând termenul de cultivare cu 48 de ore.

Compusul coordinativ revendicat $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$ atât și procedeul de sinteză al lui, datele structurale cât și proprietățile sale biologice nu sunt descrise în Stadiul tehnicii.

Este cunoscut un complex al Ba(II) homodinuclear polimeric cu un ligand foarte asemănător – acidul 2,6-piridindicarboxilic, dar complexul acesta nu posedă proprietăți de biostimulator (Massoud Rafizadeh, Vahid Amani, Reza Tayebbe. Synthesis, characterization, and crystal structure of a new coordination polymer, $\{[\text{Ba}_2(\text{HPYDC})_2(\text{PYDC})(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot(\text{H}_2\text{PYDC})\}_n$. Bull. Chem. Soc. Ethiop. 2008, 22(1), pp. 93-99).

Avantajele invenției revendicate constau în:

- obținerea compusului coordinativ revendicat este simplă în executare, iar substanțele inițiale sunt accesibile comercial;

- compusul-invenție se obține în formă de monocristale, ceea ce face posibilă separarea ușoară a complexului, precum și spălarea lui;
- compusul este stabil, nu interacționează cu sticla vasului recipientului la păstrare;
- obținerea compusului-invenție în formă de monocristale a permis stabilirea structurii moleculare și cristaline cu metoda difracției razelor X;
- complexul revendicat manifestă o solubilitate foarte bună în alcoolii, ceea ce asigură o utilizare practică în calitate de component al mediului nutritiv.

Invenția se explică prin figură, care reprezintă structura moleculară a tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di- μ -(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II).

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1. Sinteza compusului [BaL₃- μ -(NCS)₂-Co(NCS)₂].

Tiocianatul de bariu dihidrat cu masa de 0,08 g (0,025 mmoli) și tiocianatul de cobalt trihidrat cu masa de 0,06 g (0,025 mmoli) s-au dizolvat în 7 mL metanol (soluția 1). 2,6-Piridindicarbonildiclorura cu masa de 0,16 g (0,075 mmoli) s-a dizolvat în 15 mL metanol (soluția 2) (raportul molar Ba²⁺:Co²⁺:2,6-piridindicarbonildiclorura este 1:1:3). La o agitare permanentă soluția 1 se adaugă la soluția 2, după care, soluția obținută de culoare albastră a fost refluxată timp de 3 ore. După refluxare, soluția obținută este filtrată și lăsată la temperatura camerei pentru cristalizare. A doua zi în soluția filtrată se formează cristale albastre sub forma unor prisme, potrivite și pentru analiza cu raze X. Randamentul constituie 43% (0,11 g).

Găsit, %: C 36,75; H 2,76; Ba 13,51; Co 5,84; N 9,74.

Pentru C₃₁H₂₇BaCoN₇O₁₂S₄

calculat, %: C 36,71; H 2,68; Ba 13,54; Co 5,81; N 9,67.

Spectrul IR (ν , cm⁻¹): 3405sl.lată, 3084sl., 3009sl., 2955m., 2631sl.lată, 2327sl.lată, 2091m., 2066p., 2031f.p., 1737m., 1714f.p., 1584m., 1491f.sl., 1450m., 1435m., 1428m., 1311f.p., 1262f.p., 1225umăr, 1199m., 1175m., 1157sl., 1147f.sl., 1085m., 1027f.sl., 1001m., 989p., 957m., 950m., 870m., 848m., 838sl., 825m., 796sl., 756p., 728m., 694p., 654m., 530sl.lată, 500m., 480m., 429m (sl. semnifică intensitate slabă, m – medie, p – puternică, f.p. – foarte puternică, f.sl. – foarte slabă).

Exemplul 2. Structura compusului [BaL₃- μ -(NCS)₂-Co(NCS)₂] stabilită prin metoda difracției cu raze X.

Compusul obținut cristalizează în singonia triclinică (tabelul 1) și are formula [BaL₃- μ -(NCS)₂-Co(NCS)₂] (L = esterul dimetilic al acidului 2,6-piridindicarboxilic) (figură). Ca rezultat s-a obținut un compus complex molecular heteronuclear, în care la atomul Ba(1), pe lângă trei liganzi tridentati neutri L, coordinează fragmentul [Co(NCS)₄] prin doi atomi de azot. Ca urmare numărul de coordinare (NC) al Ba(1) este 11 și este format de setul de atomi donori N₅O₆. Poliedrul de coordinare al atomului Co(1) este format de patru atomi de azot, ce aparțin celor patru anioni NCS⁻.

Tabelul 1

Datele cristalografice și parametrii de structură pentru [BaL₃- μ -(NCS)₂-Co(NCS)₂]

Formula empirică	C ₃₁ H ₂₇ Ba ₁ Co ₁ N ₇ O ₁₂ S ₄
Mr	1014.10
Singonia	Triclinică
Grupul spațial	P-1
a(Å)	10.6515(5)
b(Å)	11.0221(5)
c(Å)	18.1814(8)
α (grad)	85.125(4)
β (grad)	83.249(4)
γ (grad)	82.707(4)
V(Å ³)	2097.27(16)
Z	2
D _c (g/cm ⁻³)	1.606
μ (mm ⁻¹)	1.591
F(000)	1010
Dimensiunile cristalului (mm)	0.44x0.42x0.10
Reflexele colectate/unice	13971/ 7780 [R(int) =0.0273]
Parametrii fitați	512
GOF	1.001
R ₁ , wR ₂ [I>2 σ (I)]	0.0353, 0.0806
R ₁ , wR ₂ (pentru toate refexele)	0.0443, 0.0847

Distanțele interatomice din poliedrele de coordinare ale atomilor de metale sunt: Ba(1)-N(1)=2.979(2), Ba(1)-N(2)=2.984(3), Ba(1)-N(3)=2.946(2), Ba(1)-O(1)=2.786(2), Ba(1)-O(3)= 2.835(2), Ba(1)-O(5)=2.810(2), Ba(1)-O(7)=2.877(3), Ba(1)-O(9)=2.833(2), Ba(1)-O(11)= 2.833(2), Ba(1)-N(4)=3.325(3), Ba(1)-N(5)=3.220(3), Co(1)-N(4)=1.956(3), Co(1)-N(5)= 1,976(3), Co(1)-N(6)=1,957(4), Co(1)-N(7)=1.964(3) (figură). În cristal compușii complecși sunt uniți doar prin legături de hidrogen slabe de tipul C-H...O și C-H...S.

Exemple de aplicare a compusului revendicat $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$ în tehnologia cultivării tulpinilor de funghi miceliali cu semnificație biotehnologică: *Aspergillus niger* CNMN FD 06 producător de amilaze, *Lentinus edodes* (Berk.) CNMN FB 01 producător de biomasă micelială cu proprietăți curative și nutraceutice.

Exemplul 3. Se pregătește mediul nutritiv cu următoarea compoziție ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): amidon 3,0; făină de fasole 9,0; tărâțe de grâu 18,0; KH_2PO_4 2,0, KCl 0,5, MgSO_4 0,5, apă potabilă restul, pH-ul inițial – 5,0. Mediul pregătit se repartizează a câte 0,2 L în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 1,0 L și se sterilizează la temperatura de 120°C, 1 atm., timp de 1 oră. După răcire până la temperatura de cameră (25...28°C) mediul nutritiv se inoculează cu suspensie de spori ai tulpinii *Aspergillus niger* 33 în doză de 10% v/v. Concomitent se adaugă soluția apoasă a compusului coordinativ revendicat cu concentrații bine determinate, reieșind din intervalul revendicat, care nemijlocit înainte de utilizare, se agită discret timp de 2...5 minute pe baie de apă cu ultrasunet de tip DA-968 DADI. Cultivarea se realizează în condiții de agitare continuă (200 rot/min), la temperatura de 28°C, timp de 5 zile. Activitatea amilolitică a lichidului cultural, determinată prin metoda colorimetrică după gradul de hidroliză a amidonului solubil în condiții standard de hidroliză a substratului (pH 4,7) (Грачева И.М. и др. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М., Лёгкая и пищ. пром., 1982, с. 57-62) deja în ziua a 5-a de cultivare la concentrațiile compusului revendicat de 0,001, 0,005 g/L constituie respectiv 110,08 și 96,68 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ față de 79,09 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ în varianta martor, (ziua a 6-a de cultivare) ceea ce depășește cu 39,2 și 22,2% activitatea amilazelor maximei martorului. În ziua a 6-a de cultivare, ziua biosintezei maxime în varianta martor (79,9 U/mL) activitatea amilazelor în variantele experimentale la concentrațiile sus marcate a compusului revendicat constituie 143,94 U/mL și 132,15 U/mL , procentual fiind superioară martorului cu 67,1...82,0% (tabelul 2).

Tabelul 2

Modificarea activității amilolitice a tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 06 sub influența compusului coordinativ $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$

Procedee de cultivare	Concentrația, g/L	Activitatea amilolitică			
		a 5-a zi		a 6-a zi	
		Activitatea, U/mL	%, față de martor	Activitatea, U/mL	%, față de martor
$[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$	0,001	110,08	151,1/139,2**	143,94	182,0
	0,005	96,68	132,7/122,2**	132,15	167,1
	0,010	72,86	92,1	61,40	77,6
Mediul de referință (martor)*	-	72,86	100,0	79,09	100,0

*Mediul de bază de cultivare submersă a tulpinii în condiții clasice (fără compusul revendicat): amidon 3,0; făină de fasole 9,0; tărâțe de grâu 18,0; KH_2PO_4 2,0, KCl 0,5, MgSO_4 0,5, apă potabilă restul, pH-ul inițial – 5,0 (MD2836).

**Calcululele sunt efectuate față de maxima martorului (ziua a 6-a)

Exemplul 4.

Materialul semincer (miaua) se obține la cultivarea în profunzime pe mediul nutritiv de bază timp de 8-10 zile a miceliului tulpinii *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01 de 20 zile, crescut pe suprafețe înclinate de malț-agar.

Se prepară mediul nutritiv cu compoziția (g): NH_4NO_3 0,20; KH_2PO_4 1,30; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,35, malț de 5° Balling până la 1L, pH-ul inițial 5,0...5,5. Mediul pregătit se repartizează a câte 200 mL în colbe Erlenmeyer cu volumul de 0,75 L. După sterilizare (1oră, 1 atm.) și răcire până la temperatura de cameră, mediul se inoculează cu maiaua obținută preventiv în raport de 10% v/v. Cultivarea se realizează în condiții de agitare continuă (200 rot/min), timp de 8 zile, la temperatura de 28°C.

Soluția apoasă a compusului coordinativ tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di- μ -(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II) cu formula $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$, în care L reprezintă esterul dimetilic al acidului 2,6 piridindicarboxilic, cu concentrații de 0,0025, 0,005, 0,010, și 0,015 g/L, prealabil tratată în baie cu ultrasunet tipul DA-96 DADI timp de 1...2 minute până la dizolvare completă, se adăunează la mediul de cultivare steril simultan cu materialul de inoculare. Monitorizarea biomasei s-a efectuat în dinamică pe parcursul zilelor a 6-a, a 7-a și a 8-a de cultivare, perioadă în care cultura manifestă maxima de biosinteză. Masa uscată de miceliu s-a determinat prin cântărire (tabelul 3).

Tabelul 3

Influența compusului coordinativ $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$ asupra acumulării biomasei la tulpina *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. CNMN-FB-01 în cultură submersă

Variante	Concen- trația, g/L	Ziua a 6-a		Ziua a 8-a	
		g/L	%/martor**	g/L	%/martor
Invenția	0,0025	24,27	118,6	23,67	115,7
	0,005	28,15	137,6	25,23	123,3
	0,010	27,76	135,7	24,98	122,1
	0,015	27,13	132,6	24,70	120,7
Mediul de referință (martor)*		17,32	100	20,46	100

*Mediu nutritiv fără compusul revendicat (g): must de bere - 270...320; melasă – 50...70; ulei de floarea soarelui - 0,5...1,5; restul – apă până la 1L; pH-ul inițial 4,5...5,0.

**Calcululele sunt efectuate față de maxima martorului (ziua a 8-a).

Nivelul maximal de biomasă micelială în varianta experimentală s-a marcat în ziua a 6-a de cultivare a producătorului și a constituit 28,15 g/L la concentrația complexului $[\text{BaL}_3\text{-}\mu\text{-(NCS)}_2\text{-Co(NCS)}_2]$ de 0,005 g/L și 27,76 g/L la concentrația complexului de 0,010 g/L, depășind maxima martorului (20,46 g/L în ziua a 8-a de cultivare) cu 37,6% și respectiv 35,7%.

Cercetările au fost efectuate în cadrul proiectelor 20.80009.5007.28 și 20.80009.5007.15 din Programul de Stat 2020-2023 al Republicii Moldova cu finanțarea de către ANCD.