

Invenția se referă la chimie și microbiologie, în special la un compus nou tetra(izotiocianat)cobaltat(II) de tris(diethyl piridin-2,6-dicarboxilat)calciu - ($[\text{CaL3}][\text{Co}(\text{NCS})_4]$), care poate fi utilizat în calitate de stimulator al activității lipolitice la micromiceta *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03.

Rhizopus arrhizus CNMN FD 03 reprezintă o tulpină de fungi miceliali (micromicetă), care este producător de lipaze exocelulare cu semnificație biotehnologică și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor pectolitice sau lipolitice exocelulare cu spectru larg de aplicare (MD2458 F1 2004.05.31). Pentru cultivarea tulpinilor de micromicete producătoare de lipaze se utilizează medii nutritive, care includ săruri minerale (diferite modificări ale mediului Czapek) și inductori ai sintezei lipazelor – ingrediente naturale cu conținut de componente lipidice – făină de soia, făină de porumb, extract de porumb, extract de drojdii, tărâțe de grâu etc. Componentele lipidice prezente în cantități mici în ingredientele din compoziția mediului stimulează efectiv biosinteza lipazelor (Fogarty W.M. Микробные ферменты и биотехнология. Москва: Агропромиздат, 1986, с. 189-190).

La multe microorganisme o parte considerabilă de lipaze exocelulare sunt legate de peretele celular, ce poate afecta secreția lipazelor în mediul de cultură și inhibarea biosintezei acestora. Incluzerea în mediul nutritiv a substanțelor cu abilități de stimulare a eliberării lipazelor legate din peretele celular, spre exemplu, surplus de ioni ai unor metale, accelerează secreția lipazelor legate în mediul de cultură ce favorizează procesul de biosinteză a lipazelor exocelulare.

Un efect de stimulare a biosintezei lipazelor exocelulare poate asigura și incluzerea în mediul nutritiv a anumitor compuși coordinativi ai unor metale, în special al cobaltului. De exemplu, este cunoscută utilizarea în calitate de biostimulator al producerii de enzime lipolitice la tulpina *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 a compusului de cobalt: bis(trietanolamin)-cobalt(II) diizobutirat). Dezavantajul acestui complex constă în faptul că sinteza necesită utilizarea unui compus auxiliar mai puțin accesibil ca 3,6-di-2-piridil-1,3,4,5,-tetrazină [1].

Este necesar de menționat că unii compuși ai metalelor nu posedă proprietăți de biostimulatori ai sintezei enzimelor, ci din contra, se manifestă ca inhibitori ai biosintezei acestor lipaze (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).

Spre exemplu, utilizarea în mediul nutritiv a compușilor coordinativi ai cobaltului(III) cu structuri foarte apropiate – $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2]_3\text{F}[\text{SiF}_6] \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ și $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2]_2[\text{SiF}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ în calitate de biostimulatori, asigură creșterea capacității biosintetice a micromicetei *Rhizopus arrhizus* producătoare de enzime pectolitice [2]. Deși fiecare biostimulator este activ, compușii nu sunt stabili la păstrare, sunt corozivi – interacționează cu sticla datorită prezenței fluorurii și a anionului hidrolizabil de hexafluorsilicat.

De asemenea, este cunoscută utilizarea în mediul nutritiv în calitate de biostimulator a nanoparticulelor de Fe_3O_4 , care asigură o creștere sporită a capacității biosintetice a micromicetelor producătoare de lipaze exocelulare [3]. Dezavantajul acestui mediu nutritiv constă în faptul că este necesară dispersarea prealabilă riguroasă cu ultrasunet a nanoparticulelor de Fe_3O_4 , operație, care prezintă riscuri de sănătate prin inhalarea sau contactul direct a nanoparticulelor cu pielea. Astfel, utilizarea nanoparticulelor de Fe_3O_4 în calitate de biostimulator necesită condiții speciale, care pot conduce la ridicarea prețului produsului final. Alt dezavantaj constă în faptul că, deși activitatea lipolitică este destul de înaltă, maximul de activitate a tulpinii de fungi miceliali *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 se atinge în a 2-a zi de cultivare, pe când în cazul compusului revendicat aceasta se manifestă în prima zi de cultivare.

Este cunoscut un compus, cel mai apropiat după structură și activitatea biologică, dioximatul de Co(III) cu formula $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{An})_2]_2[\text{ZrF}_6] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [4]. Activitatea maximală lipolitică a tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, datorită utilizării acestui analog proxim, se manifestă în a doua zi de cultivare, care la concentrația de 10 mg/L constituie 81250 U/mL, ceea ce constituie 144,4% față de martor, pe când compusul revendicat - $[\text{CaL3}][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ manifestă o activitate maximală în prima zi de cultivare, chiar la concentrația de 5 mg/L - 41125,0 U/mL, ceea ce constituie 198,6% față de martor. Aceste date demonstrează că activitatea compusului revendicat este mai superioară comparativ cu cea a analogului proxim. În plus, acest dioximat de Co(III) conține anionul de fluorură în sarea de cobalt inițială și care la fel se conține și în contraanionul complex $[\text{ZrF}_6]$ - al analogului proxim. Datorită hidrolizei cu formarea acidului fluorhidric chimic agresiv, care reacționează cu sticla, atât la sinteză cât și la utilizările ulterioare a analogului proxim, sinteza și păstrarea dioximatului necesită condiții speciale. Mai mult ca atât, pentru sinteza compusului dat se reiese din sarea comercială de $\text{CoZrF}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, reactiv care practic în prezent nu se mai produce de firmele specializate, fapt ce complică sinteza dioximaților respectivi de Co(III).

Problema tehnică soluționată de invenție constă în extinderea gamei de compuși coordinativi ai cobaltului – biostimulatori ai activității lipolitice la tulpina de micromicete *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 prin sinteza unui nou compus heterometalic de Co și Ca în formă cristalină, ușor separabil prin filtrare, stabil și noncoroziv care ar conține într-un singur compus chimic individual mai multe macro- și microelemente: Co, Ca, N, și S. Totodată compusul să asigure reducerea duratei de cultivare submersă cu 24 de ore.

Esența invenției constă în obținerea unui compus chimic nou - tetra(izotiocianat)cobaltat(II) de tris(diethyl piridin-2,6-dicarboxilat)calciu ($[\text{CaL3}][\text{Co}(\text{NCS})_4]$) caracterizat prin aceea că manifestă activitate de stimulator al activității

lipolitice la cultivarea micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, totodată se reduce durata de cultivare cu 24 de ore.

Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea unui complex bimetalic nou cristalin - tetra(izotiocianat)cobaltat(II) de tris(dietil piridin-2,6-dicarboxilat)calciu - $[\text{CaL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$, stabil și noncoroziv care manifestă activitate stimulatorie a activității lipolitice la cultivarea micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 și asigură atingerea maximumului de producere a lipazelor exocelulare în prima zi de cultivare a micromicetei menționate.

Avantajele invenției constau în faptul că:

- caracterul bimetalic al compusului înaintat ca invenție - $[\text{CaL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ conține în componența sa cobaltul și calciul, care sunt cunoscuți ca microelemente necesare pentru dezvoltarea normală a plantelor superioare și inferioare;
- compusul revendicat se obține în formă cristalină, ceea ce face posibilă separarea ușoară a compusului, precum spălarea și uscarea lui;
- compusul este stabil și noncoroziv față de sticlă.

Compusul coordinativ revendicat $[\text{CaL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$, atât și procedeul de sinteză a lui, datele spectrale cât și proprietățile sale biologice nu sunt descrise în Stadiul tehnicii.

În literatura științifică sunt descriși complecși ce au ligand și structură apropiată cu cea a invenției însă conțin în calitate de metal Cd(II), cationul complex $[\text{CdL}_3]^{2+}$ și anionul complex $[\text{CdI}_4]^{2-}/[\text{CdBr}_4]^{2-}$ (Hakimi M., Mardani Z., Moeini K., Mohr F. Coordination behavior of dimethyl pyridine-2,6-dicarboxylate towards mercury(II), cadmium(II) and chromium(III) in the solid- and gaseous state supported by CSD studies. Polyhedron, 2015, vol. 102. pp. 569-577).

Dezavantajul acestor complecși ai cadmiului constă în faptul că: 1) aceștea conțin metalul cadmiu, cunoscut prin toxicitatea pronunțată a acestuia; 2) cadmiul este prezent în componența complecșilor în concentrație ridicată (și în cationul complex și în anionul complex); 3) sinteza complecșilor cadmiului menționați se efectuează în două etape (prima etapă - obținerea ligandului și a doua etapă - sinteza complecșilor cadmiului); 4) în literatura de specialitate examinată nu sunt cunoscute date referitor la vreo activitate biologică a compușilor cadmiului.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1. Sinteza tetra(izotiocianat)cobaltat(II) de tris(dietil piridin-2,6-dicarboxilat)calciu.

Amestecul mecanic din 0,05 g (0,025 mmol) de tiocianat de calciu tetrahidrat, 0,06 g (0,025 mmol) tiocianat de cobalt trihidrat și 0,15 g (0,075 mmol) de 2,6-bis(carbonilclorură)piridină într-un raport molar de 1:1:3 a fost suspendat în 15 mL etanol și refluxat timp de 3 ore. Toate componentele sunt solubile în alcool. Soluția formată, de culoare albastră-violetă, s-a filtrat și s-a lăsat la temperatura camerei pentru cristalizare. Peste 24 de ore în soluție s-au format cristale mărunte albastre în formă de prisme. Rândamentul constituie 45% (0,09 g).

Găsit, %: C 44,46; H 4,08; Ca 4,07; Co 5,94; N 9,87; S 12,89.

Pentru: $\text{C}_{37}\text{H}_{39}\text{CaCoN}_7\text{O}_{12}\text{S}_4$

calculat, %: C 44,39; H 3,93; Ca 4,00; Co 5,89; N 9,79; S 12,81.

Spectru IR (v, cm^{-1}): 3413 f.s, 3079 f.s, 2983 s, 2939 f.s, 2902 f.s, 2823 f.s, 2296 s, 2058 f.p, 1700 f.p, 1587 p, 1469 m, 1445 s, 1396 m, 1373 p, 1320 f.p, 1265 f.p, 1195 m, 1153 s, 1113 s, 1082 m, 1012 p, 964 f.s, 857 m, 818 f.s, 794 f.s, 754 p, 727 m, 692 p, 658 m, 561 f.s, 506 f.s, 480 s, 431 s, 409 s (f.p - foarte puternică, p - puternică, m - medie, s - slabă, f.s - foarte slabă).

Compusul este stabil, noncoroziv față de sticlă și poate fi păstrat în recipiente standarde de sticlă.

Compoziția chimică și structura compusului înaintat au fost determinate prin datele analizei elementale și spectrale în IR, dar și prin comparație cu structura determinată cu metoda difracției razelor X a compusului similar tetra(izotiocianat)cobaltat(II) de tris(dimetil piridin-2,6-dicarboxilat)calciu (brevet acordat MD4853, data depozit 2021.10.11). În spectrele IR ale acestor doi compuși majoritatea benzilor de absorbție importante coincid, ceea ce confirmă faptul că structura compușilor este asemănătoare sau chiar identică. Aceste benzi sunt (cm^{-1}): 2983 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 2902 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 2058 $\nu(\text{NCS})$, 1700 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1587 $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{arom.}}$, 1469 $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 1373 $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 1265 $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})_{\text{ester}}$, 1014 $\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})_{\text{ester}}$, 754 și 692 $\delta_{\text{nepl.}}(\text{CH})$ în inelul aromatic 1,2,3-substituit (3 atomi de hidrogen alăturați), 480 $\delta(\text{NCS})$ în cazul coordinării grupei NCS- la metal prin intermediul atomului de azot (Co-NCS). Pe de altă parte, compoziția compusului revendicat se deosebește prin prezența grupării $-\text{CH}_2-$ în ligand care lipsește în componența compusului similar, fapt confirmat cu metoda spectroscopiei IR. Astfel, în spectrul IR se manifestă benzile de absorbție: 2939, 2823 și 794 cm^{-1} care sunt atribuite diferitelor tipuri de oscilații a grupei $-\text{CH}_2-$, care nu se observă în spectrul compusului similar. Datele respective dovedesc că în componența complexului revendicat sunt grupări de atomi $-\text{CH}_2-$ ce fac parte din grupa etil. Aceste diferențe de structură în ligand sunt cauzate de particularitățile de sinteză a complexului revendicat obținut în mediu de alcool etilic ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), spre deosebire de compusul analog, sinteza căruia s-a petrecut în alcool metilic (CH_3OH), care nu conține gruparea $-\text{CH}_2-$. În cazul dat metoda spectrală IR este indicată pentru elucidarea acestei diferențe de structură a ligandului.

*Exemplul 2. Aplicarea compusului revendicat $[\text{CaL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ în cultivarea tulpinii de micromicete *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 producătoare de lipaze exocelulare.*

Cultivarea tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 se efectuează în pahare Erlenmeyer cu capacitatea de 0,5 L care conțin 0,1 L de mediu nutritiv lichid steril cu următoarea compoziție, (g): făină de soia – 35,0; K₂HPO₄ – 5,0; (NH₄)₂SO₄ – 1,0; [CaL₃][Co(NCS)₄]- 0,005...0,015; apă potabilă până la 1,0 L; pH-ul inițial al mediului – 8,0. Mediul nutritiv se inoculează cu suspensie de spori și miceliu în cantitate de 10% din volumul mediului nutritiv inoculat cu densitatea de (2...3)x10⁶ spori/mL. Suspensia de spori și miceliu se obține prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii de *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 crescută timp de 30 de zile pe suprafețe oblice de malț-agar. Compusul revendicat se include în mediul nutritiv concomitent cu materialul semincer. Nemijlocit înainte de utilizare, compusul revendicat, dizolvat în cantitate minimă de apă distilată sterilă, se tratează cu ultrasunet pe baie de apă de tipul DA-968 DADI discret a câte 1-2 minute până la obținerea soluției străvezii.

Cultivarea se efectuează în condiții de agitare continuă la 180...200 rot/min, timp de 24 de ore. Temperatura de cultivare - 28°C. Martor a servit proba cultivată în mediu nutritiv în absența compusului revendicat.

Activitatea enzimatică, determinată prin metoda titrimetrică Otto-Iamada (Грачева И.М. și al. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. Москва, «Легкая и пищевая промышленности», 1982, p.75-76), a fost dozată în dinamică în zilele a 1-3-a de cultivare, perioadă în care micromiceta manifestă cote superioare de acumulare a enzimelor.

Conform datelor obținute nivelul maxim al activității lipolitice în proba de referință a fost înregistrat în a doua zi de cultivare, activitatea constituind 30000 U/mL, comparativ cu valoarea de 20708,3 U/mL, respectiv 22083,3 U/mL marcată în prima și a treia zi de cultivare (tabel).

Tabel

Influența compusului revendicat asupra activității lipolitice a micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03

| Compusul | Conc., g/L | 1-a zi | | a 2-a zi | | a 3-a zi | |
|--|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Activitatea, U/mL | %, față de martor | Activitatea, U/mL | %, față de martor | Activitatea, U/mL | %, față de martor |
| [CaL ₃][Co(NCS) ₄] | 0,005 | 41125,0 | 198,6/137,1 | 19375,0 | 64,6 | 2083,3 | 9,4 |
| | 0,010 | 28291,7 | 136,6/94,3 | 25000,0 | 83,3 | 2083,3 | 9,4 |
| | 0,015 | 20125,0 | 97,2 | 23750,0 | 79,2 | 1250,0 | 5,7 |
| Martor | - | 20708,3 | 100,0 | 30000,0 | 100,0 | 22083,3 | 100,0 |

198,6/137,1 – față de martorul zilei/față de maxima martorului (ziua a 2-a)

Analiza datelor, privind influența compusului revendicat asupra activității lipolitice a tulpinii producătoare pune în evidență o intensificare semnificativă a procesului de acumulare a enzimelor, efectul pozitiv fiind constatat deja în prima zi de cultivare. La această etapă, activitatea lipolitică în variantele cu compusul revendicat [CaL₃][Co(NCS)₄] a constituit 41125,0 U/mL (0,005 g/L), 28291,7 U/mL (0,010 g/L) și 20125,0 U/mL (0,015 g/L) în funcție de concentrația aplicată, depășind nivelul maximal al probei martor, ziua 1-a de cultivare – cu 37,1% la concentrația de 0,005 g/L cu reducerea ciclului tehnologic cu 24 ore.

Cercetările au fost efectuate în cadrul Programului de Stat 2020-2023 al Republicii Moldova prin proiectul cu titlul: ”Elaborarea noilor materiale multifuncționale și tehnologii eficiente pentru agricultură, medicină, tehnică și sistemul educațional în baza complexilor metalelor „s” și „d” cu liganzi polidentari”, (cifrul: 20.80009.5007.28) cu finanțarea de către ANCD.