

**EFECTORII SINTEZEI CATALAZEI CA FACTORI REGLATORI  
AI ACTIVIT II BIOSINTETICE A MICROMICETEI *Penicillium  
funiculosum* CNMN FD 11**

**Sîrbu T., Bur eva S., Stepanov V., Turt C.**

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei*

*\*Institutul de Chimie al Academiei de științe a Moldovei*

**Rezumat**

A fost studiat efectul unor substan e ce produc deteriorarea structurii i func iei membranei celulare (nistatina, alcoolul polivinilic, metanolul, etanolul), agen ilor tensioactivi (Tween – 20, Tween – 80, Triton 305) i 2-4 dinitrofenolului asupra activit ii catalazei i randamentului biomasei micromicetei *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11. S-a constatat c suplimentarea mediului nutritiv cu etanol în concentra ie de 600 mM, Triton 305, Tween 20, Tween 80 în concentra ie de 1-5 mM spore te activitatea catalazei de 1,4 – 1,5 ori.

*Cuvinte cheie:* *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 – catalaza - randamentul biomasei – alcooli - substan e tensioactive.

*Depus la redacție* 31 mai 2013

-----  
*Adresa pentru corespondență:* Sîrbu Tamara, Institutul de Microbiologie i Biotehnologie al Academiei de tiin e a Moldovei, str. Academiei 1, MD-2028 Chi in u, Republica Moldova; e-mail: *sirbutf@rambler.ru*; tel. (+37322) 73 96 09

**Introducere**

Catalaza particip la reac ia de descompunere a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pîn la oxigen molecular i ap . Aceast enzim este universal r spîndit în natur , activitatea ei fiind prezent în toate microorganismele aerobe, în celulele plantelor, animalelor i omului. Datorit capacit ilor sale de a neutraliza peroxidul,

catalaza este pe larg utilizat în diferite ramuri ale economiei na ionale, spre exemplu: prelucrarea pieilor, în lbirea i colorarea materialelor textile .a. [2, 19]; de asemenea este utilizat în industria alimentară la procesele de sterilizare rece a berii, sucurilor, produselor lactate. Actualmente, catalaza este utilizat în monitoringul ecologic, cercet rile tiin ifice, tehnologia de biosensori ce sunt întrebuinta i la determinarea cantitativ a  $H_2O_2$  i etanolului [11]. Un rol deosebit îi revine catalazei în medicin i farmaceutic . Ea este cunoscut în practica medical datorit capacit ii antioxidante ridicate i este utilizat în profilaxia i tratamentul diferitor maladii [6; 15; 18].

Reie ind din semnificatia teoretic i practic , producerea catalazei i mic orarea sinecostului ei are o importan deosebit , iar cercet rile orientate spre valorificarea unor noi produc tori de catalaz i diferitor reglatori i stimulatori ai activit ii enzimaticе sunt actuale.

Exist numeroase metode de intensificare a biosintezei enzimaticе la microorganismе - produc tori de catalaz utilizând diferite substan e chimice: compu ii coordinativi, alcooli, oxidan i, antioxidan i, inhibitori ai sintezei enzimaticе, tweenuri etc [5, 13, 14, 17, 22-24]. Astfel, compu ii coordinativi ai Fe(III) întrodu i în mediul nutritiv la cultivarea fungilor *Penicillium piceum* F-648 A3 i *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 majoreaz activitatea catalazei cu 30-50% [26]. Cu m rirea concentra iei ionilor de fier în mediul nutritiv se m re te cantitatea de catalaz la cultivarea tulpinii *Penicillium funiculosum* KM M 433 [16]. O majorare a catalazei de 1,3 - 4,5 ori a fost înregistrat la cultivarea submers a tulpinii *Penicillium piceum* pe mediul nutritiv suplimentat cu hemoglobin , nistatin , 2 - 4 dinitrofenol i alcool etilic [25]. De asemenea, a fost demonstrat ac iunea stimuloare a heminei i alcoolului metilic la bacteriile anaerobe din genul *Clostridium*, *Acetobacter* și *Methanobrevibacter*. În experien ele efectuate, substan ele men ionate, au majorat semnificativ cantitatea catalazei (2 – 100 ori) [12].

Reie ind din cele men ionate, **scopul cercet rilor** a constat în analiza modific rilor activit ii catalazei i acumului rii biomasei tulpinii *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 în prezen a diferitor efectori ai sintezei enzimaticе în mediul nutritiv de cultivare.

### Materiale i metode

Ca obiect de studiu a servit tulpina *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11–depozitat în Colec ia Na ional de Microorganismе Neapatogene ca poten ial produc tor de catalaz [9].

Cultivarea s-a realizat pe mediul cu compozi ia (%):  $KNO_3$  – 0,74; glucoz – 4,0;  $NaH_2PO_4$  – 0,25;  $K_2HPO_4$  – 0,25;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,005;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,005 i extract de drojdii – 18,5 ml/l; microelemente – 1,0 ml/l, pH – 6,6. Solu ia de microelemente con ine mg/l:  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  – 1,0;  $NH_4Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  – 1,0;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 0,1;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 2,0;  $CoCl_2$  – 2,0;  $CaCl_2$  – 2,0.

Tulpina a fost cultivat în baloane Erlenmayer de 250 ml cu 50 ml mediu nutritiv, timp de 6 zile la temperatura de 28°C, pe agitator cu 180 r.p.m.

În calitate de biostimulatori ai activit ii catalazei la tulpina *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 au fost testate substan ele: 2 - 4 dinitrofenol, nistatina, alcool etilic, alcool metilic, alcool polivinilic, Tween 20, Tween, 80, Triton 305. Substan ele testate, în diferite concentra ii, au fost suplimentate în mediul nutritiv lichid în timpul inocul rii. Ca inocul a servit suspensia apoas de spori, cu concentra ia de  $5 \times 10^6$ . Suspensia a fost ob inut prin sp larea cu ap distilat a sporilor tulpinii *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 cultivat pe mediul mal -agarizat înclinat, timp de 14 zile.

Activitatea catalazei a fost determinat prin metoda titrimetric . Drept unitate de activitate enzimatic s-a considerat cantitatea de enzim , care descompune  $1 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  (0,034 $\mu\text{g}$ ) timp de 1 minut la temperatura de 28°C [21]. Cantitatea de biomas a fost determinat prin metoda gravimetric , fiind anterior separat din lichidul cultural prin filtrare i uscare la temperatura de 105°C [20]. Datele ob inute au fost analizate prin metoda calculului statistico-matematic, utilizând programul Microsoft Office Excel.

### Rezultate i discu ii

Analiza rezultatelor ob inute privind ac iunea 2-4 dinitrofenolului asupra randamentului biomasei i activit ii catalazei, la cultivarea submers a tulpinii *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11, a demonstrat, c pentru toate concentra iile substan ei testate suplimentate în mediul nutritiv, cantitatea biomasei în variantele experimentale este superior martorului, îns activitatea enzimatic este diferit (tabelul 1).

**Tabelul 1. Activitatea catalazei i biomas micromicetei *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 cultivat în prezen a 2-4 dinitrofenolului i nistatinei.**

Nr.d/o	Substan a testat	Concen- tra ia	Catalaza		Biomasa	
			U/ml	% M	g/l	% M
1	2-4 dinitro- fenol	0,002mM	500,5 ± 10,3	95,0±2,0	11,9 ± 2,9	<b>108,2 ± 26,4</b>
		0,004mM	513,1 ± 30,8	97,3±5,8	12,2 ± 3,3	<b>110,9±30,0</b>
		0,008mM	524,5 ± 27,2	99,5±5,2	12,9 ± 3,3	<b>117,3±30,0</b>
		0,01mM	563,1 ± 23,0	<b>106,9±4,4</b>	14,6 ± 3,2	<b>132,7±29,0</b>
2	Nistatina	0,05 $\mu\text{M}$	508,7 ± 1,5	96,6±0,3	13,8 ± 2,6	<b>125,5±23,6</b>
		0,1 $\mu\text{M}$	481,7 ± 16,5	91,4±3,1	12,4 ± 2,1	<b>112,7±19,1</b>
		0,15 $\mu\text{M}$	456,8 ± 3,9	86,7±0,7	11,0 ± 2,5	100,0±22,7
		0,2 $\mu\text{M}$	334,1 ± 14,0	63,4±2,7	10,4 ± 2,2	94,5±20,0
	<b>Martor*</b>		527,1 ± 2,3	<b>100±0,4</b>	11,0 ± 1,5	<b>100,0± 13,6</b>

Not : \*martor – mediul nutritiv f r substan ele testate.

Din rezultatele prezentate se vede, c acumularea biomasei se m re te diferit odat cu m rirea concentra iei substan ei suplimentate în mediul nutritiv. Astfel, la cre terea concentra iei 2 - 4 dinitrofenolului de la 0,002 la 0,008 mM, cre terea acumul rii biomasei are loc treptat (8,2 - 17,3% fa de martor). Majorarea în continuare a concentra iei substan ei pîn la 0,01mM a avut un efect stimulator mai pronun at (de pîn la 32,7%).

Rezultatele ob inute la determinarea activit ii catalazei *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11, cultivat în mediul nutritiv suplimentat cu 2 - 4 dinitrofenol, a demonstrat c substan a dat în cantit i mici (0,002 - 0,008 mM) practic nu influen eaz asupra activit ii catalazei (95,0 - 99,5%), iar în cantit i mai mari (0,01mM) a produs o sporire nesemnificativ a acestui indice (6,9 %) fa de martor.

Suplimentarea mediului de cultivare cu antibioticul nistatina a ac ionat negativ asupra activit ii enzimaticice. Pentru toate concentra iile nistatinei, suplimentate în mediul nutritiv, s-a înregistrat o diminuare a activit ii catalazei fa de martor. Activitatea minim a catalazei. de 63,45% fa de martor. a fost înregistrat în varianta cu concentra ia maxim de nistatin - 0,2 $\mu$ M. Spre deosebire de activitatea catalazei, cantitatea de biomas e mai mare cu 12,7 - 25,5 % în cazul supliment rii mediului nutritiv cu nistatin în concentra ii mici (0,05 - 0, 1 $\mu$ M), îns cu m rirea concentra iei nistatinei (0,2 $\mu$ M) acumularea biomasei micromicetei *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 scade treptat pîn la 94,5% fa de martor.

Astfel, analizînd rezultatele ob inute s-a observat c , m rirea concentra iei 2-4 dinitrofenolului de la 0,002mM pîn la 0,01mM, în mediul nutritiv de cultivare submers a tulpinii *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11, duce la sporirea atît a biomasei cît i a activit ii enzimaticice, iar m rirea concentra iei nistatinei (0,05 - 0,2 $\mu$ M) contribuie la diminuarea atît a acumul rii biomasei cît i a activit ii catalazei

Datele ob inute nu se afl în concordan cu rezultatele altor cercet tori care au identificat ac iuni benefice ale acestor substan e (2 - 4 dinitrofenolul i nistatina) asupra microorganismelor [1, 3]. Astfel, savanii beloru i utilizînd 2-4 dinitrofenolul în cantitate de 0,001 - 0,002 mM la cultivarea unui alt reprezentant al genului *Penicillium* - *Penicillium piceum* au ob unut o majorare a activit ii catalazei cu 22 - 57%, iar utilizînd nistatina în cantitate de 0,05 - 0,15 $\mu$ M -cu 28 - 35% fa de martor [25].

Numeroase cercet ri au demonstrat efecte pozitive la utilizarea alcoolilor în calitate de stimulatori ai biosintezei catalazei la microorganisme [7, 8, 21]. Astfel, prezen a etanolului în mediul nutritiv de cultivare a tulpinii *Penicillium piceum* spore te activitatea catalazei de 1,2-1,4 ori. Majorarea esen ial a activit ii catalazei a fost înregistrat la cultivarea *Thermoascus auranticus* (cu 23%), *Saccharomyces cerevisiae* (cu 50-100%) în prezen a etanolului.

În cazul suplimentării mediului nutritiv cu metanol activitatea catalazei micromicetei *Aspergillus niger* G-IV -10 a crescut de 2 ori. [2, 4, 24].

Studiul influenței alcoolilor asupra tulpinii *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 a demonstrat o acțiune inhibitoare asupra activității catalazei și asupra creșterii tulpinii luate în studiu, excepție fiind când doar alcoolul etilic (fig. 1- 3).

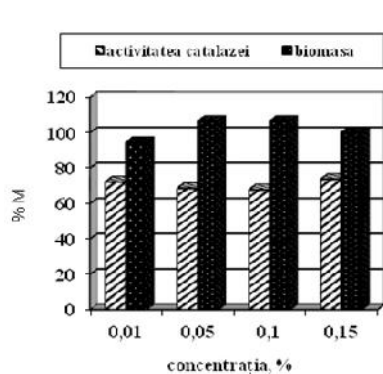


Fig. 1. Acțiunea alcoolului polivinilic asupra creșterii și activității catalazei la tulpina *P. funiculosum* CNMN FD 11

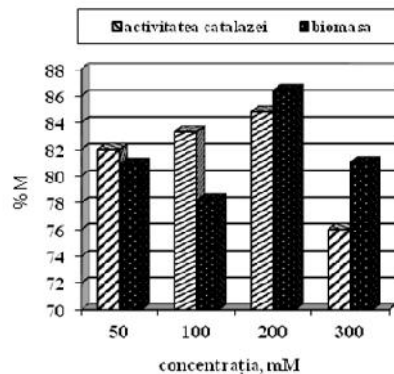


Fig. 2. Acțiunea alcoolului metilic asupra creșterii și activității catalazei la tulpina *P. funiculosum* CNMN FD 11

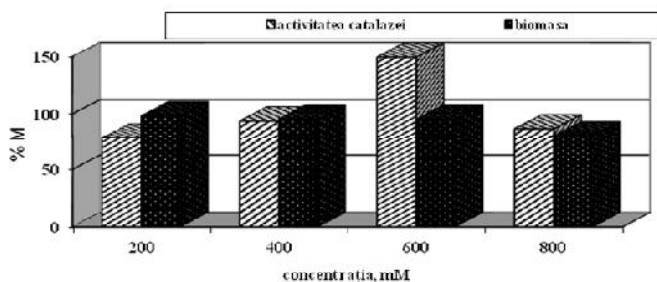
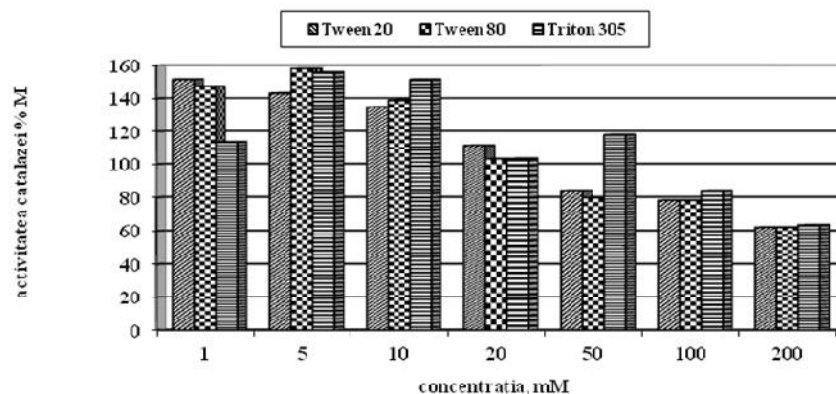


Fig.3 Influența alcoolului etilic asupra activității catalazei și acumulării biomasei la tulpina *P. funiculosum* CNMN FD 11.

Introducerea în mediul nutritiv a alcoolului polivinilic practic nu influențează asupra acumulării biomasei tulpinii *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11, dar acționează negativ asupra activității catalazei, care constituie doar 67,8 – 73,0% față de martor. (fig.1). Prezența alcoolului metilic în mediul nutritiv inhibă atât creșterea tulpinii, cât și activitatea catalazei (fig.2). Valorile activității catalazei, cât și a cantității biomasei nu depășesc limitele valorilor 76,0 - 86,4 % față de martor. Rezultate pozitive au fost obținute numai la utilizarea alcoolului etilic care suplimentat în mediul nutritiv în concentrație de 600 mM a contribuit la sporirea activității catalazei tulpinii *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 cu 49,5 % față de martor (fig. 3). În același timp menționăm, că tulpina luate în studiu a înregistrat o diminuare nesemnificativă a acumulării biomasei cu 2–5 %, iar în varianta cu concentrație mare a alcoolului etilic (800 mM) cantitatea biomasei constituie doar 80 % față de martor.

Cercetările de sporire a potențialului biosintetic al micromicetei *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 au continuat cu testarea substanțelor tensioactive Tween 20, Tween 80 și Triton 305.

Conform datelor din literatura de specialitate, substan ele tensioactive ac ioneaz asupra membranei celulare i fiind utilizate în cantit i mici faciliteaz ie irea endoenzimelor în mediul cultural, iar utilizate în cantit i mari, pot distruge membrana celular , cea ce duce la sc derea productivit ii miceliului [10, 22]. În conformitate cu rezultatele ob inute (fig. 4), activitatea catalazei micromicetei *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 depinde de concentra ia substan elor tensioactive (Tween 20, Tween 80 i Triton 305) suplimentate în mediul de cultivare.



**Fig. 4. Influen a substan elor tensioactive asupra activit ii catalazei micromicetei *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11.**

Utilizate în cantit i mici (1–20 mM), substan ele tensioactive, ac ioneaz ca stimulatori ai biosintezei enzimatic. Valoarea maxim a activit ii catalazei a fost înregistrat în varianta suplimentat cu 5 mM Tween 80 i constituie 157,9 % fa de martor. Fiind, îns , utilizate în cantit i mari (50 - 200 mM), substan ele tensioactive, ac ioneaz ca inhibitori, activitatea catalazei mic orându-se pîn la 62% fa de martor. Astfel, activitatea enzimatic maximal la utilizarea Tween 20 a fost înregistrat la concentra ia de 1 mM (151,5% M), iar minim la 200 mM (62 % M). Valoarea maxim a activit ii catalazei la suplimentarea mediului nutritiv cu Tween 80 i Triton 305 a fost înregistrat la concentra ia de 5 mM i este cu 57,9 i respectiv 55,8 % superioar martorului. M rirea în continuare a concentra iei substan elor tensioactive men ionate în mediul de cultivare duce la diminuarea activit ii catalazei, iar de la concentra ia de 50 mM acestea se manifest ca inhibitori.

Toate substan ele tensioactive men ionate au influen at negativ asupra acumul rii biomasei *P. funiculosum* CNMN FD 11, cantitatea minim de biomas ob inându-se la utilizarea lor în concentra ii mari (fig.5).

Indiferent de activitatea catalazei, cantitatea biomasei scade treptat odat cu m rirea concentra iei substan elor tensioactive testate. Astfel, la m rirea concentra iei substan elor tensioactive suplimentate în mediul de cultivare de la 1mM pîn la 200mM, acumularea biomasei scade pîn la 72% la utilizarea

Tween 20, la suplimentarea cu Tween 80 cantitatea biomasei scade de la 96,7 pîn la 60,0%, iar la utilizarea Triton 305 valoarea biomasei scade de la 88,3 pîn la 43,5% fa de martor.

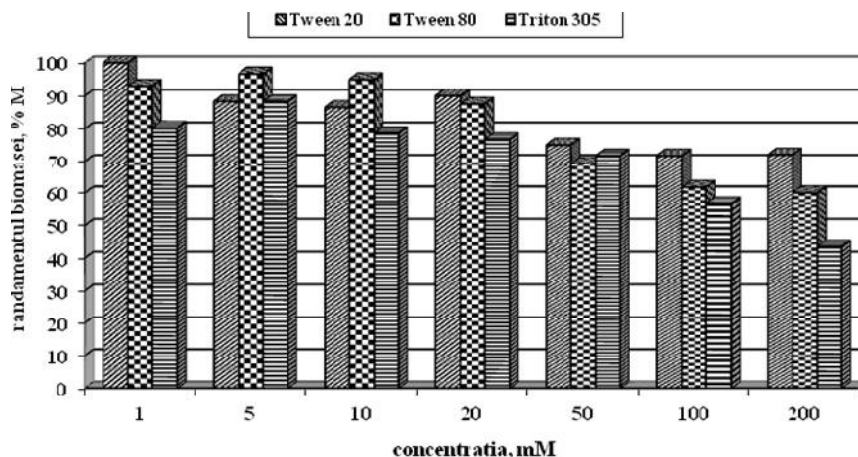


Fig. 5. Influen a substan elor tensioactive asupra randamentului biomasei la tulpina *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11.

### Concluzii

1. 2-4 dinitrofenolul cît i nistatina în concentra ii mici (0,05 – 0, 1μM) suplimentate în mediul nutritiv de cultivare a micromicetei *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 sporesc acumularea biomasei.

2. Nistatina la concentra ii mai mari de 0,1μM, cît i alcoolii polivinilic i metilic exercit un efect inhibitor asupra activit ii catalazei i acumul rii biomasei micromicetei *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11.

3. Suplimentarea mediului nutritiv de cultivare cu alcool etilic în concentra ie de 600 mM spore te activitatea catalazei *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 fa de martor cu 49,5%, Tween 20 în concentra ie de 1mM cu 51,5%, Tween 80 i Triton 305 în cantitate de 5 mM cu 57,9 i respectiv 55,8 %.

4. Alcoolul etilic, Tween 20, Tween 80 i Triton 305 pot fi utiliza i în calitate de stimulatori ai activit ii catalazei micromicetei *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11.

### Literatura

1. Conner R., Meladee S., Kornoche,Goldberg R. Influence of certain sterols and 2,4 dinitrofenol an phosphate acumulation and distribution in *Tetrahymena pyriformes*.// Microbiology, 1961, V. 26, N 3, p. 437- 442.
2. Fang F. Thermo-alkali-stable catalase from *Thermoascus aurantiacus* and its potential use in textile bleaching process. // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2004, Vol.3, p. 423-428.
3. Gemini V., Coreea E., Gallego A., Korol S. Degradacion microbiana de 2,4 dinitrofenol en efluetes liquidos efecto de factores bioticos y abioticos. // Higiene y Seidad Ambiental, 2008, 8, p. 320-324.
4. Gromada A., Fiedurek J. Optimization of catalase biosynthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* mutant. // J.Basic Microbiology, 1997, Vol. 37, 2, p. 85-91.

5. Nishikawa, Y., Kawata Y, Nagai J. Effect of Triton X-100 on catalase production by *Aspergillus terreus* IFO61123. // J. Ferment. Bioeng., 1993, Vol. 76, No. 3, p. 235–236.
6. Popovici I., Rezuş E., Mancaş G. Antioxidant enzyme levels in reactive arthritis and rheumatoid polyarthritis. // Jurnal of preventive medicine, 2001, 9 (2), p. 38-42.
7. Ro Y.T., Lee H.I., Kim E.J., Koo J.H., Kim Y.M. Purification, characterization and physiological response of a catalase-peroxidase in *Micobacterium sp.* strain JCI DSM 3803 grown on metanol. // Biotechnology Lett., 2003, 25, No. 16, p. 825-830.
8. Sahoo S., Roo K. K., Suraiashkumar G.K. Induced reactive oxygen species improve enzyme production from *Aspergillus niger* cultivation. // Biotechnology Lett., 2003, 25, No. 16, p. 821-825.
9. Sîrbu T. Tulpina de micromicete *Penicillium funiculosum* – surs de catalază. Brevet de invenție MD 4059. BOPI, No. 7, 2010, p.25.
10. Баранов П.А., Кравцова О.Ю., Сариев А.К., Жердев В.П. // Биотехнология, 2008, No. 146, p. 62-64.
11. Борисов И.А., Лобанов А.В., Решетилов А.Н., Курганов Б.И. // Биотехнология, 2000, Т. 36, No. 3, p. 254 - 260.
12. Брюханов А.Л., Тауэр Р.К., Нетрусов А.И. // Биотехнология, 2002, No. 71, No. 3, p. 330 – 335.
13. Господарьов Д.В., Мандрик С.Я., Луцак В.И. // Биотехнология, 2005, No. 77, No. 2, c. 162-165.
14. Ильченко А.П., Чернявская О.Г., Финогенова Т.В. // Биотехнология, 2005, Т. 41, No. 5, p. 487 - 494.
15. Кения М.В., Лукаш Е.П., Гуськов Е.П. // Биотехнология, 1993, No. 113, No. 4, c. 456-470.
16. Куплецкая М.Б., Кураков А.В. // Биотехнология, 2003, No. 1, p. 16-21.
17. Кураков А.В., Куплецкая М.Б., Скрынникова Е.В., Сомова Н.Г. // Биотехнология, 2001, Т. 37, No. 1, p. 67-72.
18. Максименко А.В. // Биотехнология, 1993, No. 113, No. 3, c. 351-365.
19. Мельников Б.Н. // Биотехнология, 2002, No. 46, No. 1, p. 9-19.
20. Методы экспериментальной микологии. // Биотехнология, 1978, No. 240.
21. Методы экспериментальной микологии. // Биотехнология, 1982, No. 176 - 179.
22. Мороз И.В., Павловская Ж.И., Михайлова Р.В. // Биотехнология, 2002, No. 188-189.



23. Мороз И.В., Михайлова Р.В.  
*Penicillium piceum* F 648A3. // i . П i i i i  
i . . . 25-30 2009 , , .67.
24. Мороз И.В., Михайлова Р.В., Лобанок А.Г.  
*Penicillium piceum* F 371 . //  
– .  
, 2011. . 181-182.
25. Мороз И.В., Михайлова Р.В., Лобанок А.Г.  
*Penicillium piceum*. :  
// , . 1, , 2007, с 48 – 55.
26. Сырбу Т.Ф., Туртэ К.И., Михайлова Р.В., Мороз И.В., Лобанок А.Г., Бурцева С.А., Степанов В.С., Горинчой В.В., Мелник С.В.  
*Penicillium*. //  
i Н ii i, 2011, 3 i i , с.  
57-61.