

EFECTUL DIOXIMĂ ILOR Co(III) CU SULFANILAMIDĂ ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE A UNOR MICROMICETE

Deseatnic-Ciloci Alexandra¹, Coropceanu Eduard², Clapco Steliana¹, Rija
Andrei², Stratan Maria¹, Bologa Olga², Bulhac Ion², Afranșchi Valentin²

¹ Institutul de Microbiologie i Biotehnologie al Academiei de tiin e a Moldovei

² Institutul de Chimie al Academiei de tiin e a Moldovei

Rezumat

Au fost sintetizate dioximă și [Co(DH)₂(Sam)₂][BF₄].H₂O (1), [Co(DH)₂(Sam)₂][ZrF₆].5H₂O (2) și [Co(NioxH)₂(Sam)₂][TiF₆].3H₂O (3) (DH și NioxH – monoanionii dimetilgloximei și respectiv 1,2-ciclohexandiondioximei, iar Sam – sulfanilamida), compoziția, structura și proprietățile lor au fost investigate cu ajutorul metodelor: analiză elementală, spectroscopia în IR, UV, precum și analiza cu raze X.

Testele microbiologice ale metalocomplexelor sintetizate ca factori de sporire și reglare a sintezei enzimatice la tulpinile de micromicete *Penicillium viride* CNMN FD 04 - producător de pectinază și *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 - producător de amilază au scos în evidență influența stimulatorie a acestora asupra biosintezei hidrolazelor respective.

Cuvinte-cheie: micromicete, metalocomplexe, pectinaze, amilaze.

Depus la redacție 31 mai 2013

Adresa pentru corespondență: Deseatnic-Ciloci Alexandra, Institutul de Microbiologie i Biotehnologie al Academiei de tiin e a Moldovei, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; e-mail: alexandra.ciloci@gmail.com; tel. (+373 22)73 98 24.

Introducere

Extinderea domeniilor de aplicare a preparatelor enzimatiche 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 stimulatoarelor de natură chimică, în special a compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție [9]. Metalele de tranziție joacă un rol important în metabolismul celular, în primul rând, prin rolul de cofactori pentru un număr important de enzime. De rând cu cataliza, microelementele exercită un rol de alte funcții - de transport a diferitor grupe de atomi și molecule, de fixare a moleculei în poziții anumite, de polarizare a moleculelor [6, 19].

Unul dintre microelementele cu importanță vitală pentru microorganisme este cobaltul [5], care de rând cu ionii altor metale are rol de activator al majorității kinazelor, sintetazelor și este implicat în reacțiile metabolice dependente de vitamina B₁₂. Cercetările realizate în ultimii ani în cadrul Institutului de Microbiologie i Biotehnologie al Academiei de tiin e a Moldovei au arătat că compușii coordinativi ce conțin cobalt au un rol important în sinteza orientată a variate substanțe bioactive (carotenoizi, ficobiline, cianocobalamină, lipide, enzime) produse de către microorganisme din diverse grupe taxonomice (cianobacterii, alge, levuri, micromicete) [2, 9, 13, 15].

Proprietățile compușilor coordinativi, în mare măsură sunt determinate de atomul de metal. Rezultatele unor cercetări în biologie demonstrează și rolul liganzilor în

manifestarea propriet ilor metalocomplexilor, care datorit setului larg de atomi donori, creeaz cu ionii metalelor tranzi ionale complexe stabili, diferi i dup compozi ie, structur i propriet i [4, 17]. Substan ele biologic active, incluse n compozi ia complex ilor metalelor n calitate de liganzi, sporesc esen ial eficien a lor [1]. Aceasta s-a stabilit i pentru dioxima ii metalelor de tranzi ie, care manifest activitate biologic i pot fi analiza i n calitate de modele ale unor obiecte biologice cu importan vital ca vitamina B_{12} [7, 8].

Ace ti compu si se plaseaz la hotarul dintre chimia coordinativ clasic , chimia complex ilor organometalici i biochimie. Sinteza complex ilor ce prezint modele ale obiectelor biologice i testarea ac iunii lor asupra proceselor metabolice ale microorganismelor prezint o direc ie de perspectiv n reproducerea i dirijarea biosintezei naturale. Este cunoscut faptul, c unele oxime sunt implicate n procese metabolice importante pentru organism. S-a constatat faptul, c dioxima ii Co(III) ce con in fluor manifest propriet i de biostimulatori ai biosintezei vitaminei B_{12} [10], precum i ai enzimelor hidrolitice la unii fungi [3, 12].

n lucrare se prezint rezultatele cercet rilor, privind influen a unor dioxima i ai Co(III) cu sulfanilamida asupra activit ii enzimatic e a tulpinilor de micromicete *Penicillium viride* CNMN FD 04 P - produc tor de pectinaze i *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 - produc tor de amilaze.

Materiale i metode

n calitate de obiecte de cercetare au servit tulpini de micromicete cu sisteme enzimatic e diferite: *Penicillium viride* CNMC FD 04 P - produc tor de pectinaze i *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02A – produc tor de amilaze, depozitate n Colec ia Na ional de Microorganisme Neapatogene a Republicii Moldova.

Cultivarea submers a produc torilor s-a efectuat n retorte Erlenmayer cu capacitatea de 0.75 – 1.0 l ce con in 0.1-0.2 l mediu nutritiv, pe agitatoare cu viteza de rota ie 180-200 rot./min., la temperatura de 28-30 °C. Cultivarea s-a efectuat pe medii nutritive cu compozi ie, (g/l):

- pentru *Penicillium viride* CNMN FD 04 P: $(NH_4)_2SO_4$ – 1.0; $ZnSO_4$ – 0.25; $MgSO_4$ – 0.7; glucoz – 1.0; f in de porumb – 15.0; borhot de sfecel – 25.0; pH-ul mediului – 6.0 ;

- pentru *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 A: amidon – 3.0; f in de fasole – 9.0; t r e de gr u – 18.0; $MgSO_4$ – 0.5; KH_2PO_4 – 2.0; KCl – 0.5, pH-ul ini ial al mediului respectiv – 5.0 i 3.0.

Durata cultiv rii a constituit 4 zile (96 ore) pentru *Penicillium viride* i 6 zile (144 ore) pentru tulpina *Aspergillus niger*. n calitate de stimulatori ai activit ii pectolitice i amilolitice a tulpinilor de micromicete n studiu au fost evalua i dioxima i ai Co(III) n care ligandul de pe coordonata axial este sulfanilamida: $[Co(DH)_2(Sam)_2][BF_4] \cdot H_2O$ (1), $[Co(DH)_2(Sam)_2][ZrF_6] \cdot 5H_2O$ (2) i $[Co(NioxH)_2(Sam)_2][TiF_6] \cdot 3H_2O$ (3) Complex ii 1-3 au fost sintetiza i din sistemul $Co(X)_z \cdot nH_2O - 2DioxH_2 - 2Sam$ (X - BF_4 , ZrF_6 , TiF_6 ; z=1 sau 2; $DioxH_2$ – DH, NioxH; mediu aqua-metanol) la nclzire n creuzet de grafit [15]. Solu iile s-au filtrat i l sat pentru evaporare lent la temperatura camerei. Compozi ia, structura i propriet ile complex ilor au fost investigate cu ajutorul metodelor: analiza elemental , spectroscopia n IR, UV, precum i analiza cu raze X.

Testarea biologic a compu ilor coordinativi sintetiza i s-a efectuat la trei concentra ii: 1 mg/ml, 5 mg/ml i 10 mg/ml, prin adi ionare la mediul nutritiv (marmor) steril pentru cultivarea submers a tulpinilor de micromicete produc tori, în form de solu ie apoas concomitent cu materialul semincer.

Activitatea pectolitic a fost determinat prin metoda interferometric , utilizând ca substrat solu ia de 1% de pectin de sfecl [11].

Activitatea amilolitic s-a determinat dup ac iunea asupra amidonului solubil prin metoda colorimetric cu iod [18].

Rezultate i discu ii

Cercet richimice. Au fost sintetiza i dioxima i ai cobaltului(III), ce con in în pozi iile 1.6 ale poliedrului de coordinare molecule de sulfanilamid : $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Sam})_2][\text{BF}_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Sam})_2][\text{ZrF}_6] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**2**) i $[\text{Co}(\text{NioxH})_2(\text{Sam})_2][\text{TiF}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**3**) (DH i NioxH – monoanionii dimetilgliximei i respectiv 1.2-ciclohexandiondioximei, iar Sam – sulfanilamida). Compu ii sunt bine solubili în alcooli, solubili în ap . Analiza elemental a dioxima ilor studia i este redat în tabelul 1:

Tabelul 1. Analiza elemental a dioxima ilor sintetiza i.

Complexul	o		C		H		N	
	Calc., %	G sit, %	Calc., %	G sit, %	Calc., %	G sit, %	Calc., %	G sit, %
$[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Sam})_2][\text{BF}_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$	7.98	7.62	32.53	32.27	4.37	4.23	15.18	15.10
$[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Sam})_2][\text{ZrF}_6] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	7.54	7.37	30.75	30.64	4.52	4.46	14.34	14.22
$[\text{Co}(\text{NioxH})_2(\text{Sam})_2][\text{TiF}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	7.43	7.26	36.32	36.26	4.70	4.36	14.12	13.98

Pentru ob inerea informa iei despre structura compu ilor coordinativi i a modului de coordinare a liganzilor pe larg este folosit spectroscopia în IR.

În spectrele IR ale complec ilor sunt prezente benzile de absorbie ale oscila iilor de valen i deformare, ce apar in grup rii o(DioxH)₂, cm⁻¹: $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)_{\text{DH}}=2930$, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)_{\text{NioxH}}=2939$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)_{\text{DH}}=2867$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)_{\text{NioxH}}=2864$, $\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{N})=1545$, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)_{\text{DH}}=1460$, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)_{\text{NioxH}}=1447$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)_{\text{DH}}=1374$, $\nu_{\text{as}}(\text{N}-\text{O})=1237$, $\nu_{\text{s}}(\text{N}-\text{O})=1083$, $\nu(\text{OH})=973$, $\nu(\text{CNO})=730$, $\nu_{\text{as}}(\text{Co}-\text{N})=505$ i $\nu_{\text{s}}(\text{Co}-\text{N})=430$. Manifestarea acestor benzi de absorbie confirm faptul c complec ii fac parte din *trans*-dioxima ii Co(III). Oscila iile care caracterizeaz moleculele de sulfanilamid amplasate în pozi iile 1.6 se manifest prin benzile de absorbie, cm⁻¹: $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)=3280$, $\nu_{\text{s}}(\text{NH}_2)=3165$, $[\nu_{\text{as}}(\text{CC})+\nu_{\text{as}}(\text{CCH})]=1595$, $[\nu_{\text{s}}(\text{CC})+\nu_{\text{s}}(\text{CCH})]=1488$, $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)=1312$, $\nu_{\text{s}}(\text{SO}_2)=1145$, $\nu(\text{CCC})=672$ i 562. Grupa NH₂ legat de inelul aromatic este coordinat la atomul de cobalt. În sfera extern sunt prezen i ionii $[\text{BF}_4]^-$, $[\text{ZrF}_6]^{2-}$ sau $[\text{TiF}_6]^{2-}$ i molecule ale apei de cristalizare ($\nu(\text{OH})_2=3400-3600$ cm⁻¹). Benzile ionului $[\text{BF}_4]^-$ în **1** se observ în regiunile, cm⁻¹: $\nu_{\text{as}}(\text{BF}_4)=1085$, $\nu_{\text{s}}(\text{BF}_4)=760$, $\nu(\text{F}-\text{B}-\text{F})=525$, pentru $[\text{ZrF}_6]^{2-}$ în **2**: $\nu_{\text{as}}(\text{Zr}-\text{F})=670$, $\nu_{\text{s}}(\text{Zr}-\text{F})=525$, iar pentru $[\text{TiF}_6]^{2-}$ în **3**: $\nu_{\text{as}}(\text{Ti}-\text{F})=638$, $\nu_{\text{s}}(\text{Ti}-\text{F})=487$ [16].

Analiza cu raze X a cristalelor **1** i **2** a permis elucidarea definitiv a structurii lor [14]. S-a stabilit, c compu ii sunt constitui i din cationii $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Sam})_2]^+$, anionii complec i i molecule de ap de cristalizare. Nodul coordinativ CoN₆ include patru atomi de azot de la doi monoanioni ai dioximei i doi de la grupele amine ale sulfanilamidei (Fig. 1,2). În planul ecuatorial al octaedrului dou resturi ai dimetilgliximei formeaz

leg tiri de hidrogen intramoleculare H-O...H, care sporesc stabilitatea acestui fragment. Anionii complec i, moleculele apei de cristalizare i cationii complec i sunt implica i în formarea unui sistem complicat de leg tiri de hidrogen.

La compararea structurii complec ilor **1** i **2** se observ tr s tiri asem n toare, dar i deosebite în modul împachet rii moleculelor, influen at de natura diferit a anionilor complec i $[\text{BF}_4]^-$ i $[\text{ZrF}_6]^{2-}$. În cristalele **1** i **2** se formeaz fragmente ciclice asem n toare, atât cu implicarea anionilor complec i, cât i f r ace tea.

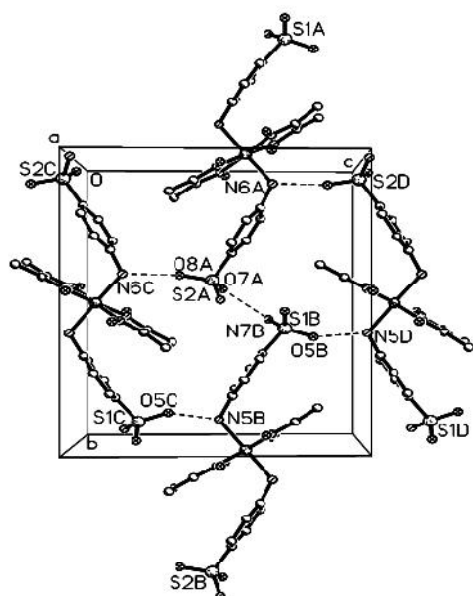


Figura 1. Formarea ciclurilor de c tre cationii complec i în compusul **1**.

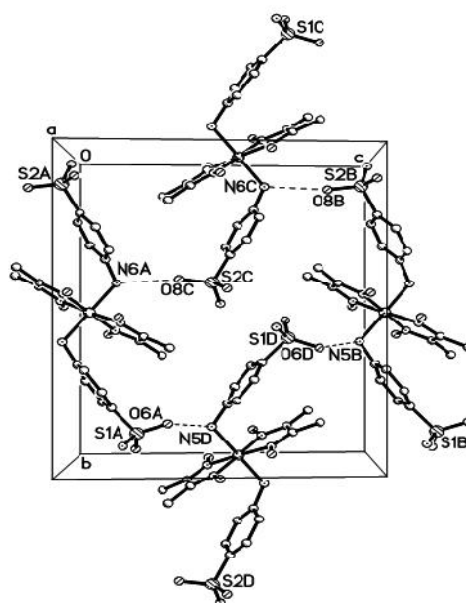


Figura 2. Formarea ciclurilor de c tre cationii complec i în compusul **2**.

Cercet ri biologice. Evaluarea însu irilor biologice a compu ilor sintetiza i s-a efectuat dup gradul de ac iune asupra procesului de enzimogenez la fungii miceliali produc tori de hidrolaze exocelulare: *Penicillium viride* CNMN FD 04P - produc tor de pectinaze i tulpina *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02A - produc tor de amilaze. Cercet rile prezint interes pentru biotehnologia ob inerii preparatelor enzimatic microbiene în vederea sporirii i stabiliz rii capacit ii biosintetice a tulpinilor produc toare.

Datele ob inute scot în eviden efectul diferen iat al dioxima ilor Co(III) cu sulfanilamid asupra biosintezei componentelor sistemului enzimatic pectolitic la tulpina *Penicillium viride* CNMC FD 04P i amilolitic al tulpinii *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02A.

Din rezultatele prezentate în tabelul 1 constat m o stimulare evident a activit ii pectinazelor sub ac iunea compusului $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Sam})_2][\text{BF}_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$. Activitatea enzimatic este superioar martorului atât în ziua a 3-a, cât i în ziua a 4-a de cultivare a produc torului, constituind respectiv 450.28-498.37 u/ml i 842.31-860.71 u/ml în variantele experiment în dependen de concentra ia aplicat i termenul de cultivare fa de 437.39 – 611.30 u/ml în varianta martor. Complexul nu modific etapele de

dezvoltare a microorganismului. Acumularea maxim a pectinazelor în variantele experimentale se înregistrează în ziua a 4-a de cultivare și coincide cu maximumul variantei control. Concentrația optimă a complexului constituie 5-10 mg/l și asigură o creștere a activității pectolitice cu 37.8-40.8% față de control.

Tabelul 2. Modificarea activității pectolitice a micromicetei *Penicillium viride* sub influența a compușilor coordinați cu sulfanilamid .

Complexul	Conc., mg/l	a 3-a zi de cultivare		a 4-a zi de cultivare	
		Apc, u/ml	%, față de mator	Apc, u/ml	%, față de mator
[Co(DH) ₂ (Sam) ₂][BF ₄] \cdot H ₂ O	1	498,37	113,9	526,89	86,2
	5	463,74	106,0	860,71	140,8
	10	450,28	102,9	842,31	137,8
[Co(NioxH) ₂ (Sam) ₂][TiF ₆] \cdot 3H ₂ O	1	457,26	104,5	658,27	107,7
	5	451,48	103,2	724,07	118,4
	10	339,04	77,5	557,64	91,2
Mator	0	437,39	100,0	611,30	100,0

Metalocomplexul [Co(NioxH)₂(Sam)₂][TiF₆] \cdot 3H₂O în variantele cu concentrații mai mici (1,0-5,0 mg/l) practic nu influențează activitatea enzimatică a tulpinii, exercitând acțiune de inhibare până la 12,3-26,0% la concentrația mai sporită – 10 mg/l. Influența diferită a compușilor coordinați asupra activității pectolitice a micromicetei poate fi condiționată de componența diferită a metalocomplexelor. Complexii conțin nu numai anioni diferiți [BF₄]⁻ [TiF₆]²⁻, dar diferiți după compoziția liganzilor ecuatoriali reprezentați de DH și NioxH – monoanionii dimetilglioximei și respectiv 1.2-ciclohexandiondioximei.

Contrar rezultatelor obținute pentru tulpina *Penicillium viride*, compusul coordinațiv [Co(NioxH)₂(Sam)₂][TiF₆] \cdot 3H₂O în experimentele asupra tulpinii *Aspergillus niger* 33-19 se manifestă ca un stimulator veridic al biosintezei amilazelor.

În toate trei concentrații testate a fost înregistrată creșterea activității ambelor tipuri de amilaze – acidlabile și acidstabile, respectiv cu 40,47- 164,08% și 33,9-148,15% (Tabelul 3 și 4). Complexul modifică etapele de dezvoltare a tulpinii, exprimat prin accelerarea manifestării maxime de biosinteză a enzimelor cu 24 ore comparativ cu matorul. Cu privire la efectul exercitat de către compusul [Co(DH)₂(Sam)₂][ZrF₆] \cdot 5H₂O ce conține anionul cu zirconiu [ZrF₆]²⁻ asupra activității enzimatică a tulpinii *Aspergillus niger* 33-19 se constată o diminuare a activității amilazelor, deși dezvoltarea culturii prezintă tendința variantei compusului cu anionul cu titan [TiF₆]²⁻ - manifestarea mai timpurie a maxime de biosinteză (ziua a 5-a) în comparație cu matorul, activitatea amilazelor, rămânând, însă, sub nivelul matorului 173,81-157,77 u/ml față de 202,25 u/ml și 248,78-244,01 u/ml față de 280,56 u/ml, respectiv pentru amilazele acidlabile și acidstabile. Efectul poate fi provocat atât de natura diferită a anionilor complecși [BF₄]⁻ și [ZrF₆]²⁻ cât și de liganzii DH și NioxH care prin compoziția lor diferită influențează diferit structura și stabilitatea complexului [14].

Tabelul 3. Modificarea activit ii amilazelor acidlabile a micromicetei *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 sub influen a compu ilor coordinativi cu sulfanilamid .

Complexul	Conc., mg/l	a 5-a zi de cultivare*		a 6-a zi de cultivare*	
		activitatea, u/ml	%, fa de martor	activitatea, u/ml	%, fa de martor
[Co(NioxH) ₂ (Sam) ₂] ₂ [TiF ₆] ₂ ·3H ₂ O	1	286,26±13,0	141,54	238,23±3,60	117,79
	5	331,85±6,51	164,08	250,93±3,64	124,07
	10	284,09±3,76	140,47	227,65±3,35	112,56
[Co(DH) ₂ (Sam) ₂] ₂ [ZrF ₆] ₂ ·5H ₂ O	1	173,81±2,12	95,8	87,46±2,32	47,1
	5	157,77±1,34	87,0	74,97±1,98	40,4
	10	117,65±2,64	64,9	64,13±2,09	34,6
Martor	0	172,63±5,58	100,0	202,25±0,28	100,0

*activitatea enzimatic în variante este prezentat în raport cu valoarea maxim a martorului.

Tabelul 4. Modificarea activit ii amilazelor acidstabile a micromicetei *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02 sub influen a compu ilor coordinativi cu sulfanilamid .

Complexul	Conc., mg/l	a 5-a zi de cultivare*		a 6-a zi de cultivare	
		activitatea, u/ml*	%, fa de martor	activitatea, u/ml*	%, fa de martor
[Co(NioxH) ₂ (Sam) ₂] ₂ [TiF ₆] ₂ ·3H ₂ O	1	375,75±4,61	133,90	269,98±3,67	96,23
	5	415,65±4,71	148,15	316,55±0,26	112,80
	10	383,27±4,09	136,60	255,17±3,43	90,95
[Co(DH) ₂ (Sam) ₂] ₂ [ZrF ₆] ₂ ·5H ₂ O	1	248,78±2,18	88,67	209,80±2,32	74,78
	5	244,01±1,64	87,00	235,97±1,98	84,11
	10	182,08±2,53	64,9	217,23±2,09	77,42
Martor	0	262,38±3,76	100,0	280,56±3,61	100,0

*activitatea enzimatic în variante este prezentat în raport cu valoarea maxim a martorului

Astfel, rezultatele ob inute demonstreaz c efectul exercitat de compu ii coordinativi asupra activit ii biosintetice a fungilor miceliali este influen at de compozi ia elemental i concentra ia aplicat a compu ilor, cât i de originea tulpinii de micromicete i profilul sistemelor enzimatic sintetizate.

De aici urmeaz c sinteza i selec ia compu ilor coordinativi ai metalelor cu activitate biologic înalt i toxicitate redus cu utilizarea de noi liganzi, reprezentan i ai diferitor clase de substan e organice în vederea aplic rii lor în microbiologie i biotehnologie r mâne actual .

În conformitate cu rezultatele cercet rilor compu ii coordinativi [Co(DH)₂(Sam)₂]₂[BF₄]₂·H₂O i [Co(NioxH)₂(Sam)₂]₂[TiF₆]₂·3H₂O pot fi recomandate pentru elaborarea unor noi procedee de sintez orientat sporit de biosintez a pectinazelor i amilazelor la fungii miceliali.

Bibliografie

1. Bresciani-Pahor N., Farcolin M., Marzilli L.G. et al. // Coord. Chem. Rev. 1985, V.63, 4, p. 1.

