

Invenția se referă la chimie și biologie, în special la un compus nou tetra(izotiocianat)cobaltat(II) de tris(dimetil piridin-2,6-dicarboxilat)calciu ($[\text{CaL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$), 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 (MD 2458 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, tărațe 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 de peretele celular, spre exemplu, surplusul 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 ai 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 greu accesibil ca 3,6-di-2-piridil-1,3,4,5,-tetrazină [1].

Este necesar de menționat faptul că compușii unor metale 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).

Se cunoaște faptul, că utilizarea în mediul nutritiv a compușilor coordinativi ai cobaltului(III) – $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2]_3\text{F}[\text{SiF}_6] \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ 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 biostimulatorul este activ, el nu este stabil la păstrare și coroziv, interacționează cu sticla datorită prezenței fluorului în anionul de hexafluorsilicat.

Este cunoscută utilizarea în mediul nutritiv a nanoparticulelor de Fe_3O_4 , în calitate de biostimulator, care asigură o creștere sporită a capacității biosintetice a micromicetelor producătoare de lipaze exocelulare [3]. Dezavantajul mediului nutritiv ce conține ca biostimulator nanoparticule de Fe_3O_4 , 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 al 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 al 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.

Sunt cunoscuți compuși ai cobaltului(III) în baza dimetilgloximei și 1,2-ciclohexandiondioximei cu formulele $[\text{Co}(\text{NioxH})_2(\text{An})_2]_2[\text{ZrF}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{An})_2]_2[\text{ZrF}_6] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{An})_2]_2[\text{TiF}_6]$ în care An – anilina, care manifestă o activitate destul de înaltă de biostimulare de producere a lipazelor la tulpina *Rhizopus arrhizus* [4]. Relativ cel mai activ se manifestă compusul heterobimetalic $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{An})_2]_2[\text{ZrF}_6] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, care poate fi considerat și analog proxim.

Dezavantajele acestor compuși, inclusiv și al analogului proxim, constau în:

- deosebirea esențială a componentelor compușilor dioximici și compusului revendicat, în primul caz liganzii oximici și anilina sunt bi- și respectiv monodentați, pe când în compusul revendicat ligandul este tridentat;
- compușii dioximici conțin în componența lor fluoruri, care impun condiții speciale pentru sinteză sau păstrare (a nu se folosi vase din sticlă), pe când compusul revendicat, se obține și se păstrează în vase de sticlă, fără a necesita condiții speciale;
- sinteza compușilor de Co(III), inclusiv a dioximaților, pornește de la săruri inițiale de Co(II), care trebuiesc apoi oxidate cu oxidanți;
- pentru obținerea acestor compuși dioximați se utilizează anilina ca ligand axial, care este o amină toxică pentru om, pe când sinteza compusului revendicat nu necesită acest reagent toxic;
- sinteza dioximaților de Co(III) cu anioni de hexafluorozirconat și hexafluorotitanat conform [4], pe lângă oxidare, s-a realizat reieșind din sărurile $\text{CoZrF}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și $\text{CoTiF}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Aceste săruri inițiale practic în prezent nu sunt produse de firmele specializate, fapt ce complică încă mai mult sinteza dioximaților de Co(III);
- deși activitatea de stimulare a producerii lipazelor de tulpina *Rhizopus arrhizus* este destul de înaltă, maximul de producere a lipazelor se atinge în ziua a doua de cultivare.

Astfel, compusul revendicat înlătură dezavantajele menționate pentru compușii dioximatici descriși în [4] și face utilizarea lui mai comodă și mai convenabilă din punct de vedere economic comparativ cu dioximații de Co(III).

Problema tehnică soluționată de invenție constă în extinderea gamei de compuși coordinați ai cobaltului - biostimulatori ai activității lipolitice la tulpina de micromicete *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 prin sinteza unui nou compus chelat 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 coordinați biostimulator asigură reducerea duratei de cultivare submersă cu 24 de ore.

Esența invenției constă în obținerea unui compus nou - tetra(izotiocianat)cobaltat(II) de tris(dimetil piridin-2,6-dicarboxilat)calciu cu formula $[CaL_3][Co(NCS)_4]$ caracterizat prin aceea că manifestă activitate de stimulator al activității lipolitice la cultivarea micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, reducând totodată durata de cultivare cu 24 de ore.

Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea unui complex bimetalic nou monocristalin - tetra(izotiocianat)cobaltat(II) de tris(dimetil piridin-2,6-dicarboxilat)calciu - $[CaL_3][Co(NCS)_4]$, stabil și noncoroziv, care stimulează activitatea lipolitică la cultivarea micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 și asigură atingerea maximului de producere a lipazelor exocelulare în prima zi de cultivare a micromicetei menționate.

Avantajele invenției constau în faptul că:

- caracterul bimetalic al compusului revendicat - $[CaL_3][Co(NCS)_4]$ conține în componența sa cobaltul, care este cunoscut ca unul dintre microelementele necesare pentru dezvoltarea normală a plantelor superioare și inferioare;
- compusul revendicat se obține în formă de monocristale, ceea ce face posibilă obținerea în stare pură, separarea ușoară și spălarea lui;
- pentru sinteza compusului revendicat nu este necesar de a utiliza oxidarea cu oxigen sau reagenți greu accesibili, ca hexafluorozirconatul sau hexafluorotitanatul de cobalt(II);
- obținerea compusului revendicat în formă de monocristale a permis stabilirea absolută a structurii moleculare și cristaline prin metoda difracției razelor X.

Compusul coordinați revendicat $[CaL_3][Co(NCS)_4]$, procedeul de sinteză, datele structurale, cât și proprietățile sale biologice nu sunt descrise în stadiul tehnicii.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1. Sinteza tetra(izotiocianat)cobaltat(II) de tris(dimetil 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(carbonililor)piridină într-un raport molar de 1:1:3 a fost suspendat în 15 mL metanol și refluxat timp de 3 ore. Toate componentele sunt solubile în alcool. Soluția formată are o culoare albastră-violetă. Amestecul s-a filtrat și s-a lăsat la temperatura camerei pentru cristalizare. Peste 24 ore în soluție se formează cristale albastre de forma unor prisme, potrivite pentru analiza roentghenostructurală. Randamentul constituie 47% (0,11 g).

Găsit, %: C 40,57; H 2,88; Ca 4,45; Co 6,45; N 10,74.

Pentru: $C_{31}H_{27}CaCoN_7O_{12}S_4$

calculat, %: C 40,61; H 2,97; Ca 4,37; Co 6,43; N 10,70.

Spectrul IR (ν, cm^{-1}): 3089sl., 3010sl., 2957sl., 2901f.sl. 2095m., 2058f.p., 1709f.p., 1588p., 1463m., 1436p., 1424umăr, 1326f.p., 1271f.p., 1205m., 1179m., 1155m., 1083m., 1013m., 994p., 951m., 871m., 845m., 826m., 796f.sl., 756p., 731p., 693p., 658m., 540sl., 499umăr, 485umăr, 478m., 434m., 429m., 404m. (intensitatea relativă a benzilor de absorbție: f.p – foarte puternică; p – puternică; m – medie; sl – slabă).

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

Exemplul 2. Structura compusului $[CaL_3][Co(NCS)_4]$ stabilită prin metoda difracției cu raze X.

Pentru studiul cu raze X a fost selectat un cristal de culoare albastră cu dimensiunile 0,34x0,20x0,07mm. Compusul cristalizează în grupul centrosimetric monoclinic $C2/c$ având parametrii celulei elementare: $a = 15,7908(9) \text{ \AA}$, $b = 15,6777(10) \text{ \AA}$, $c = 17,157(2) \text{ \AA}$, $\beta = 102,172(9)^\circ$, $V = 4152,0(6) \text{ \AA}^3$. Pentru $Z = 4$, compoziția $C_{31}H_{27}Ca_1Co_1N_7O_{12}S_4$, $M_r = 916,84$, $d(\text{calc.}) = 1,467 \text{ g/cm}^3$. Datele experimentale au fost colectate la difractometrul Xcalibur E cu radiație $MoK\alpha$ și monocromator de grafit. La determinarea structurii au fost folosite 7275 reflexe colectate, din care 3651 sunt independente. Structura a fost determinată cu ajutorul metodelor directe și precizată prin metoda celor mai mici pătrate în cadrul complexului de program (SHELX-97) (Sheldrick G.M. A Short History of SHELX. Acta Crystallogr. 2008, A64, p. 112-122). Toți atomii nehidrogenici au fost precizați anizotrop, pe când cei de hidrogen – izotrop. Factorul de divergență final este 0,0656.

Structura compusului $[CaL_3][Co(NCS)_4]$, în care L reprezintă esterul dimetilic al acidului 2,6-piridindicarboxilic, este prezentată în figură. Ca rezultat, acest compus este de tip ionic format din cationul complex $[CaL_3]^{2+}$ și anionul complex $[Co(NCS)_4]^{2-}$. În celula elementară ambele componente ale compusului au simetria C_2 , iar la atomul Ca(1) coordinează tridentat fiecare dintre trei molecule de ligand neutre L prin setul de atomi ONO. Ca urmare numărul de coordinare al Ca(1) este 9. Distanțele interatomice Ca–N din poliedrul de coordinare al atomului

central de metal din cationul complex, formate cu antrenarea atomilor din liganzii L, sunt egale cu 2,942(3) și 2,944(6) Å, iar distanțele Ca–O – sunt cuprinse în intervalul 2,513(3)...2,549(3) Å. În anionul complex distanțele interatomice Co–N din poliedrul de coordinare tetraedric al atomului Co(1) sunt cuprinse în intervalul 1,934(5)...1,952(2) Å. În rețeaua cristalină a compusului revendicat, între componentele sale, au fost depistate doar legături slabe de hidrogen de tipul C–H...S, distanța donor...acceptor fiind 3.539(5) Å, în calitate de acceptor de proton fiind antrenat un atom de S din anionul tiocianat NCS-.

Exemplul 3. Aplicarea compusului revendicat [CaL3][Co(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...3x10⁶ spor/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-968DADI 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 48 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 1-3-a zi 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 18750 U/mL, comparativ cu valoarea de 17930 U/mL, respectiv 5625 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 |
| [CaL3][Co(NCS)4] | 0,005 | 20125 | 112,2/107,3 | 22500 | 120,3 | 1875 | 33,3 |
| | 0,010 | 35583 | 198,4/189,8 | 27500 | 146,7 | 3750 | 66,7 |
| | 0,015 | 26250 | 146,3/140,0 | 35000 | 186,7 | 3750 | 66,7 |
| Martor | - | 17930 | 100,0 | 18750 | 100,0 | 5625 | 100,0 |

*112,2/107,3 – 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 20125 U/mL (0,005 g/L), 35583 U/mL (0,010 g/L) și 26250 U/mL (0,015 g/L) în funcție de concentrația aplicată, depășind nivelul maximal al probei martor, ziua a 2-a de cultivare – cu 7...90%. Totodată, activitatea enzimatică se menține la cote înalte: 22500 U/mL, 27500 U/mL și 35000 U/mL la toate concentrațiile testate și în a doua zi de cultivare, ce crește siguranța obținerii unei cantități superioare de enzime lipolitice comparativ cu martorul.

Cercetările au fost efectuate în cadrul Programului de Stat 2020-2023 al Republicii Moldova prin proiectele 20.80009.5007.28 și 20.80009.5007.15 cu finanțarea de către ANCD.