

Invenția se referă la chimia coordinativă și biotehnologie, și anume, la compusul coordinativ al manganului(II) în baza ligandului - (2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină), care posedă proprietăți pronunțate de stimulator al sintezei proteazelor exocelulare la tulpina de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – producător cu semnificație biotehnologică.

Pentru cultivarea submersă a tulpinii *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 este cunoscut mediul nutritiv cu compoziția, %: făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO₃ - 0,2; (NH₄)₂SO₄ -0,1; restul apă potabilă până la 1L (Brevet de invenție MD 4186 C1 din 2013.06.30. Tulpină de funghi *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12- producătoare de proteaze acide și neutre, xilanaze și β-glucozidaze. Deseatnic-Ciloci A., Tiurina J., Lupașcu G., Clapco S., Labliuc S., Stratan M., Dvornina E., Sașco E.).

În ultimele decenii în scopul sporirii biosintezei enzimelor la micromicete intensiv se studiază compușii coordinativi ai elementelor 3d din care unii s-au manifestat promițător în soluționarea problemei de biosinteză a proteazelor.

Pentru cultivarea tulpinii *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 este cunoscut mediul nutritiv, care implică un compus coordinativ, cu compoziția, %: făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO₃ - 0,2; (NH₄)₂SO₄ -0,1; restul apă potabilă până la 1L și în calitate de biostimulator compusul coordinativ [Co(DH)₂(Thio)₂]F[PF₆]_nH₂O în concentrație de 0,0010... 0,0015, pH-ul inițial al mediului 6,25 [1].

Dezavantajul acestui mediu nutritiv constă în faptul că compusul coordinativ aplicat sporește numai proteazele neutre din complexul proteolitic sintetizat de tulpină ce poate fi determinat de compoziția compusului integrat, dar și a ligandului în parte.

Este cunoscut că ligandul (2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină) (tpt) conține atomi de azot, iar aceștia manifestă diferite activități farmacologice de tipul antivirale, antitumorale, analgezice, antioxidante, antidepresive și antibacteriene (R.Kumar, N. Lumar, R.K. Roy, A. Singh. Triazines-A comprehensive review of their syntheses and diverse biological importance. Current Medical and Drug Research, 2017, 1(1), 1 – 12, Article ID173). În plus, posedă activități catalitice în unele procese de polimerizare și oxidare și este utilizat ca reactiv analitic în determinarea spectrofotometrică și farmaceutică. Utilizarea compușilor coordinativi cu acest ligand în calitate de biostimulatori nu este descrisă în literatura de specialitate.

Cea mai apropiată soluție de invenția propusă pot fi considerați compușii coordinativi ai Fe(III) cu liganzii pe baza izo- și nicotinoilhidrazonelor: azotat de (2,3-butandionă-bis((izonicotinoilhidrazonă)-tris-aqua) Fe(III) dihidrat cu formula [Fe(H₂L¹)(H₂O)₃](NO₃)₃·2H₂O și azotat de (2,3-butandionă-bis(nicotinoilhidrazonă)-tris-aqua) Fe(III) dihidrat cu formula [Fe(H₂L²)(H₂O)₃](NO₃)₃·2H₂O, care sporesc activitatea proteolitică la tulpina de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 [2].

Dezavantajul compușilor menționați constă în faptul că concentrația maximă admisibilă de aplicare a compușilor pentru tulpina producător nu asigură realizarea maximă de biosinteză a proteazelor acide și neutre.

Problema tehnică pe care o soluționează prezenta invenție constă în diversificarea preparatelor proteolitice prin aplicarea compusului coordinativ diaqua-nitrato-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat cu formula [Mn(NO₃)(tpt)(H₂O)₂](NO₃) în calitate de stimulator al activității proteolitice la tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12- producător cu semnificație biotehnologică.

Conform invenției, se revendică aplicarea compusului mononuclear cu formula [Mn(NO₃)(tpt)(H₂O)₂](NO₃) în calitate de biostimulator al activității proteolitice la tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 .

Rezultatul tehnic al invenției constă în aplicarea compusului [Mn(NO₃)(tpt)(H₂O)₂](NO₃) în calitate de stimulator al activității proteolitice la tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, creșterea producerii de proteaze și diversificarea preparatelor proteolitice după ponderea componentelor complexului enzimatic (proteaze acide, neutre și alcaline), în funcție de cerințele specifice ale domeniului de aplicare.

Compusul mononuclear cationic [Mn(NO₃)(tpt)(H₂O)₂](NO₃) se obține la interacțiunea pivalatului de Mn(II, III) cu 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină în prezența nitrului de disprosiu(III) în etanol. Procedul de obținere al acestui compus este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituind 80% față de cel teoretic calculat. Compusul este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în etanol, bine solubil în apă, dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă. Obținerea compusului diaqua-nitrato-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat, [Mn(NO₃)(tpt)(H₂O)₂](NO₃) este descrisă în sursa (Darii M., Kravtsov V., Baca S. Mn(II) coordination complexes based on 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine. Conferința “New trends and strategies in the chemistry of advanced materials with relevance in biological systems, technique and environmental protection”, Timișoara, România, 2017, p.43).

Procedul de obținere a diaqua-nitrato-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat, [Mn(NO₃)(tpt)(H₂O)₂](NO₃) constă din următoarele etape:

S-a adăugat pivalat de Mn(II,III), [Mn₆O₂((CH₃)₃CCO₂)₁₀((CH₃)₃CCO₂H)₄], (0,02 g, 0,01 mmoli), nitrat de disprosiu(III) (0,04 g, 0,09 mmoli) și 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazină (0,007 g, 0,022 mmoli) în 8 ml etanol. În continuare, amestecul reactant se refluxează timp de 30 minute, utilizând un refrigerent ascendent. Soluția obținută a fost filtrată și lăsată într-un flacon acoperit. La răcire și evaporarea lentă în soluție se depun cristale de culoare cafenie, aciforme, care se filtrează, se spală cu etanol și se usucă în aer.

S-a determinat, %: C-40,68; H-3,22; N-21,59. Pentru [Mn(NO₃)(tpt)(H₂O)₂](NO₃), C₁₈H₁₆MnN₈O₈, s-a calculat, %: C-40,99; H-3,06; N-21,25. Spectrul infraroșu pentru compusul revendicat: FT/IR (ν, cm⁻¹): 3731 br/m, 3405 br/m, 3073 m, 2962 br/m, 2909 m, 2821 w, 1662 sh, 1572 v/s, 1545 s, 1532 v/s, 1474 s, 1428 v/s, 1388 v/s, 1377 v/s, 1294 s, 1260 m, 1159 w, 1103 s, 1035 m, 1021 m, 1005 m, 927 w, 859 w, 850 w, 778 m, 679 w, 667 w.

Structura moleculară și cristalină a $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ a fost determinată, aplicând difracția razelor X și este prezentată în figură și tabelul 1.

Tabelul 1

Datele cristalografice și parametrii de structură a compusului coordinativ $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ (I)

	I
Formula	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{MnN}_8\text{O}_8$
M_r	527,33
Dimensiunea cristal, mm^3	0.400 x 0.200 x 0.120
Temperatura, K	293(2)
Singonia	monoclinic
Grupul spațial	$C 2/c$
a , (Å)	20,4359(8)
b , (Å)	13,3612(4)
c , (Å)	16,7266(6)
α , grad	90
β , grad	107,782(4)
γ , grad	90
V , (Å ³)	4348,9(3)
Z	8
D_{calc} (g/cm ⁻³)	1,611
μ , mm ⁻¹	0,672
$F(000)$	2152
Numărul reflexelor colectate	7918
Date / restricții / parametri	4029 / 0 / 332
R_1 , wR_2 [$I > 2\sigma(I)$]	0,0455, 0,0999
R_1 , wR_2 (pentru toate datele)	0,0719, 0,1118

Compusul $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ se cristalizează în grupul spațial monoclinic $C2/c$, având parametrii $a = 20,436(1)$, $b = 13,361(1)$, $c = 16,727(1)$ Å, $\beta = 107,782(4)^\circ$, $Z = 8$, $V = 4348,9(3)$ Å³.

În complex molecula de 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină servește ca un ligand tridentat NNN care formează două metalocicluri cu distanțele Mn–N de 2,231 – 2,379 Å. Adicional, atomul de mangan coordonează cu anionul NO_3^- și două molecule de apă, rezultând o bipiramidă pentagonală în jurul atomului de metal. În complex anionii NO_3^- au o coordonare bidentată cu distanțele Mn–O de 2,269 și 2,412 Å. Distanțele Mn–O se disting cu moleculele de apă în poziție apicală egale cu 2,139 și 2,193 Å.

Compusul coordinativ diaqua-nitrato-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat cu formula $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ posedă proprietăți pronunțate de stimulator al procesului de enzimizare la microorganisme fapt stabilit prin testarea efectului exercitat asupra sintezei proteazelor exocelulare la tulpina de fungi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12.

Exemplu de realizare a invenției

Tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 se cultivă în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 0,75 L, care conțin 0,2 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție, %: făină de porumb - 2,0; făină de soia - 1,0; CaCO_3 - 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,1; $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ - 0,0005-0,0015; restul apă potabilă până la 1L; pH-ul inițial al mediului 6,25. Mediul nutritiv se însămânțează cu suspensie de spori și miceliu în cantitate de 5% v/v, obținută prin spălare cu apă distilată sterilă a culturii de 12-14 zile, crescută pe suprafețe înclinate de malț-agar. Soluția apoasă a compusului biostimulator $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ cu o concentrație bine determinată, reieșind din intervalul revendicat 0,0005...0,0015 %, nemijlocit înainte de utilizare, se agită discret timp de 2...5 min pe baie de apă cu ultrasunet de tip DA-968 DADI, după care se adaugă la mediul nutritiv concomitent cu materialul semincer. Cultivarea se realizează în condiții de agitare continuă (200 rot/min), timp de 144 ore, la temperatura de 28°C.

Activitatea proteazelor acide (pH 3,6) determinată în lichidul cultural prin metoda Anson (Грачева И.М. и др. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М., Лёгкая и пищ. пром., 1982, с. 41-43), după acțiunea asupra caseinatului de sodiu în ziua a 5-a de cultivare (ziua manifestării maximei de biosinteză în varianta martor) a constituit 63,69...41,48 U/mL în funcție de concentrația aplicată a compusului coordinativ $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ cu manifestarea maximei (63,69 U/mL) la concentrația de 0,0005 % față de 51,16 U/mL în varianta poxim, la concentrația 0,0010%, cu un spor de 24,5%.

Maxima activității proteazelor neutre (pH 7,4) determinată similar în variantele experimentale cu aplicarea biostimulatorului $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ s-a marcat în ziua a 5-a, constituind 25,52...67,47 U/ml față de 60,22 U/mL în varianta proxim, marcând sporul de 12 % la concentrația biostimulatorului 0,0010% (tabelul 2).

Tabelul 2

Modificarea activității proteolitice a micromicetei *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 sub influența compusului coordinativ diaqua-nitrato-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$ (I)

Comp. coord.	Conț., %	Proteaze acide (pH 3,6)		Proteaze neutre (pH 7,4)			
		5 zi		5 zi		6 zi	
		U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%
I	0,0005	63,69	124,5	25,52	43,38	25,52	77,3
	0,0010	43,85	89,1	67,47	112,0	33,01	100,0
	0,0015	41,48	81,1	56,51	93,8,2	36,04	109,2
Proxim	0,0010	51,16		60,22		25,88	

Proxim – cea mai apropiată soluție [2], compusul II

Datorită proprietăților biologice pe care le manifestă compusul coordinativ diaqua-nitrato-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) nitrat cu formula $[\text{Mn}(\text{NO}_3)(\text{tpt})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)$, prezintă interes pentru industria producătoare de produse biotehnologice în calitate de biostimulator al proceselor de enzimogeneză la cultivarea tulpinii de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12.