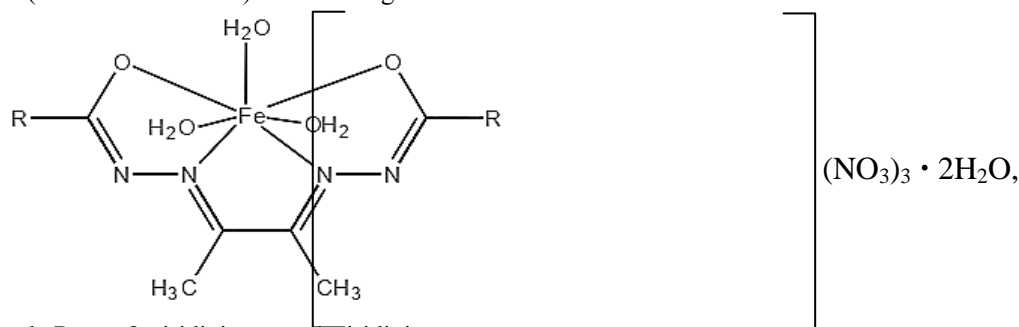


Invenția se referă la chimie, și anume la doi compuși coordinativi noi $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (I) și $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (II) ($\text{H}_2\text{L}^1 = 2,3\text{-butandionă-bis(izonicotinoilhidrazonă)}$ și $\text{H}_2\text{L}^2 = 2,3\text{-butandionă-bis(nicotinoilhidrazonă)}$) cu formula generală:



unde R este 3-piridinium sau 4-piridinium,

precum și la un mediu de cultivare a tulpinii de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, în componența căruia se includ suplimentar în calitate de stimulatori compuși coordinativi revendicați. *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 este producătoare de proteaze și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea unui complex enzimatic cu acțiune hidrolitică cu spectru larg de aplicare.

Dintre compușii coordinativi cu liganzi pe baza izonicotinoilhidrazonelor se cunoaște compusul plumbului cu ligandul 2,3-butandionă-bis(izonicotinoilhidrazonă) (Chun-Li Guo et al. A novel porousmetal-organic framework from a new bis(acylhydrazone) ligand capable of reversibly adsorbing/desorbing water and small alcohol molecules. The Royal Society of Chemistry 2014, vol. 16, p. 4095-4099) cu formula $[\text{Pb}(\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})]_6 \cdot 30\text{H}_2\text{O}$, plumbul fiind un metal greu din blocul p al sistemului periodic. Acest compus reprezintă o carcasă metal-organică poroasă cu capacitate de deshidratare/rehidratare și adsorbție/desorbție a moleculelor mici de alcool.

Compușii fierului (metal de tranziție bloc d) cu liganzii H_2L^1 și H_2L^2 , structura, proprietățile și procedeele de obținere nu sunt descrise în literatură.

Pentru cultivarea tulpinilor fungice producătoare de enzime proteolitice se utilizează medii nutritive, care conțin ca parte minerală diferite modificări ale mediului Czapek și inductori ai sintezei proteazelor (ingrediente naturale cu conținut înalt de proteine – făină de fasole, făină de porumb, tărațe de grâu etc.) și, în dependență de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii, diferiți biostimulatori (Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. Москва, Агропромиздат, 1975, p. 325-327).

Este cunoscut mediul nutritiv propus anterior pentru cultivarea submersă a tulpinii *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, care conține (% mas.): făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO_3 – 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1 și apă de robinet, pH-ul inițial al mediului fiind de 6,25 [1].

În calitate de cea mai apropiată soluție se consideră mediul nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, care conține (% mas.): făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO_3 – 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1; $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot (\text{Thio})_2]\text{F}[\text{PF}_6] \cdot n\text{H}_2\text{O} = 0,0010 \dots 0,0015$ și restul apă de robinet, pH-ul inițial al mediului fiind de 6,25 [2]. Sporul maxim al activității constituind 58,92% (53,13 U/mL) față de martor, înregistrat în ziua a 6-a, la concentrația compusului coordinativ de 0,0015%, martorul reprezintă mediul nutritiv care conține (% mas.): făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO_3 – 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1 și apă de robinet [1].

Dezavantajele acestora constau în faptul că mediul nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al tulpinii și biosinteza enzimelor proteolitice nu atinge valoarea maximă.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii de funghi *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, utilizarea căruia intensifică biosinteza complexului enzimatic și asigură sporirea activității proteazelor neutre și acide, ce extinde sfera de aplicare a complexului enzimatic.

Esența invenției constă în faptul că se propun doi compuși coordinativi noi - azotatul de (2,3-butandionă-bis(izonicotinoilhidrazonă)-tris-aqua)fier(III) dihidrat cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (I) și azotatul de (2,3-butandionă-bis(nicotinoilhidrazonă)-tris-aqua)fier(III) dihidrat cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (II) în calitate de componente ale mediului nutritiv pentru cultivarea tulpinii de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, cu efect biostimulator ai sintezei complexului proteazic.

De asemenea se revendică un mediu de cultivare submersă a tulpinii de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, în componența căruia se includ suplimentar în calitate de stimulatori compuși coordinativi: azotatul de (2,3-butandionă-bis(izonicotinoilhidrazonă)-tris-aqua)fier(III) dihidrat cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și azotatul de (2,3-butandionă-bis(nicotinoilhidrazonă)-tris-aqua)fier(III) dihidrat cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ în următorul raport cantitativ al componentelor (% mas.): făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO_3 – 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1; $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sau $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0,0005 \dots 0,0010$, restul apă de robinet, pH-ul inițial al mediului fiind de 6,25.

Compușii sus-menționați, proprietățile și structura lor, precum și procedeele de obținere nu sunt descrise în literatură.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea biosintezei proteazelor acide și neutre la tulpina de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, cu 16,4...27,0% și, respectiv, 50,8...87,1% în variantele cu aplicarea

compusului coordinativ $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (I) și cu 63,5...100,6% și, respectiv, 57,4...83,5% în variantele cu aplicarea compusului coordinativ $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (II) (Tabelul 2).

Rezultatul invenției este condiționat de aplicarea pentru prima dată a compușilor coordinativi: azotat de (2,3-butandionă-*bis*(izonicotinoilhidrazonă)-*tris*-aqua)fier(III) dihidrat cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și azotatul de (2,3-butandionă-*bis*(nicotinoilhidrazonă)-*tris*-aqua)fier(III) dihidrat cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ în calitate de stimulatori ai procesului de enzimogeneză la cultivarea tulpinii de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – producător de proteaze.

Procedeele de obținere a compușilor coordinativi menționați este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile, randamentul constituie 75% pentru compusul I și 70% pentru compusul II față de cel teoretic. Complecșii sunt stabili la aer, solubili în apă, alcoolii, dimetilformamidă, dimetilsulfoxidă și insolubili în eter dietilic.

*Exemplul 1. Obținerea azotatului de (2,3-butandionă-*bis*(izonicotinoilhidrazonă)-*tris*-aqua)fier(III) dihidrat cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (I)*

La soluția obținută la dizolvarea a 1,62 g (4,0 mmol) de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ în 20 mL de metanol se adaugă la agitare continuă soluția din 1,28 g (4,0 mmol) de H_2L^1 (2,3-butandionă-*bis*(izonicotinoilhidrazonă) în 20 mL de metanol. Imediat soluția capătă culoarea brună, amestecul se încălzește la temperatura de 50...60 °C timp de o oră, agitându-se permanent. Soluția se filtrează și se lasă la temperatura camerei pentru cristalizare. După evaporarea solventului aproape până la sec se formează un produs cristalin de culoare brună, care se separă de soluția-mamă rămasă, se spală cu metanol, apoi cu eter dietilic și se usucă la aer. Compusul este stabil la aer, bine solubil în apă, alcoolii, dimetilformamidă, dimetilsulfoxidă, acetonă, acetonitril și insolubil în eter dietilic. Masa produsului obținut este de 1,94 g. Randamentul – 75%.

Pentru $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{FeN}_9\text{O}_{15}$ s-a determinat, %: Fe-8,42; C-29,80; H-4,13; N-20,66; s-a calculat, %: Fe-8,50; C-29,28; H-3,99; N-19,21.

Structura moleculară a compusului I (Fig.1, a) a fost determinată aplicând metoda difracției razelor X pe monocristal, structura cationului fiind reprezentată în Fig.1, c.

*Exemplul 2. Obținerea azotatului de (2,3-butandionă-*bis*(nicotinoilhidrazonă)-*tris*-aqua)fier(III) dihidrat cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (II)*

Compusul coordinativ II a fost sintetizat, aplicând același procedeu ca și în exemplul 1 cu excepția ligandului, H_2L^1 a fost înlocuit cu H_2L^2 (2,3-butandionă-*bis*(nicotinoilhidrazonă). Masa produsului obținut este de 1,81 g. Randamentul – 70%.

Compusul este stabil la aer, bine solubil în apă, alcoolii, dimetilformamidă, dimetilsulfoxidă, acetonă, acetonitril și insolubil în eter dietilic.

Pentru $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{FeN}_9\text{O}_{15}$ s-a determinat, %: Fe-8,49; C-29,98; H-4,11; N-20,61; s-a calculat, %: Fe-8,50; C-29,28; H-3,99; N-19,21.

Structura moleculară a compusului II (Fig. 1, b) a fost determinată aplicând metoda difracției razelor X pe monocristal, structura cationului fiind reprezentată în Fig. 1, d.

Studiul cu raze X a compușilor I și II efectuat la difractometrul modern Xcalibur E a confirmat că ambii compuși cristalizează în singonia triclinică, având parametrii celulei elementare apropiate, cu toate că conțin liganzi organici diferiți, astfel compușii sunt izostructurali (Tabelul 1).

Analiza structurii compușilor I și II a stabilit că ambii sunt de tip complecși ionici, formați din cationi complecși mononucleari, ce conțin în sfera externă anionii NO_3^- și molecule de apă de cristalizare (Fig 1, a și b). În acești compuși, poliedrul de coordinare al atomului central de metal din cationul complex ia forma unei bipiramide pentagonale, formată de liganzii organici neutri de hidrazonă H_2L^1 sau H_2L^2 , ce coordonează la metal ca liganzi tetradentați prin setul de atomi donori N_2O_2 , formând împreună cu o moleculă de apă planul ecuatorial al bipiramidei, pozițiile apicale fiind ocupate încă de două molecule de apă. Distanțele interatomice din poliedrele de coordinare a compușilor I și II relatează că valorile $\text{Co}-\text{N}(\text{H}_2\text{L}^1 \text{ ori } \text{H}_2\text{L}^2)$ sunt egale cu 2,185(2) și 2,195(2), 2,182(2) și 2,183(2) Å, $\text{Co}-\text{O}(\text{H}_2\text{L}^1 \text{ ori } \text{H}_2\text{L}^2)$ – 2,052(2) și 2,059(2), 2,056(2) și 2,053(2) Å, $\text{Co}-\text{O}(\text{H}_2\text{O})$ – în intervalul 2,025(2)...2,118(2) și 2,020(2)...2,137(2) Å, valorile maxime $\text{Co}-\text{O}(\text{H}_2\text{O})$ fiind cu atomii de oxigen ai moleculelor de apă poziționate în planul ecuatorial. În rezultatul coordinării liganzilor organici la $\text{Co}(\text{II})$ se formează 3 pentametalocicluri planare asociate, unghiurile diedre fiind în compusul I în intervalul 0,9...2,7°, iar în compusul II aceste unghiuri iau valori mai ridicate 2,4...4,9°. Analiza distanțelor din fragmentele piridinice terminale ale liganzilor organici a stabilit că unghiul CNC (N(1) și N(6)) din cationii complecși I și II primesc valori mai mari de 120° (122,3(2), 121,9(3)° în I, 122,5(3) și 123,0(3)° în II), ce confirmă suplimentar faptul protonării ciclului piridinic terminal.

Tabelul 1. Date cristalografice, detalii ale colectării, determinării și precizării structurilor I și II

Compusul	I	II
Formula empirică	$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{Fe}_1\text{N}_9\text{O}_{16}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{Fe}_1\text{N}_9\text{O}_{16}$
M_r	656,31	656,31
T (K)	293	293
Singonia	Triclinică	Triclinică
Grupul spațial	P-1	P-1

a (Å)	8,1897(4)	7,7990(4)
b (Å)	12,7811(9)	12,8684(10)
c (Å)	14,7521(9)	14,8791(8)
α (°)	111,297(6)	108,348(6)
β (°)	98,422(5)	100,697(5)
Γ (°)	103,247(5)	101,007(6)
V (Å ³)	1354,76(14)	1342,04(15)
Z	2	2
D _c (g/cm ³)	1,609	1,624
μ , (mm ⁻¹)	0,648	0,654
F(000)	678	678
Θ_{\min} ; Θ_{\max} (°)	3,06; 25,05	2,99; 25,05
Reflexele colectate/unice	7201/4766	7627/4731
	[R _(int) = 0,0213]	[R _(int) = 0,0172]
Numărul parametrilor	381	381
Dimensiunile cristalului (mm)	0,5x0,4x0,07	0,22x0,14x0,07
R ₁ ; wR ₂ (I>2 σ (I))	0,0436; 0,1127	0,0420; 0,1080
R ₁ ; wR ₂ (pentru toate reflexele)	0,0541; 0,1199	0,0541; 0,1161
GOOF ^c	1,008	1,002
$\Delta\rho_{\max}$ și $\Delta\rho_{\min}$ (eÅ ⁻³)	0,605 și 0,367	0,348 și 0,356

Exemple de aplicare a azotatului de (2,3-butandionă-*bis*(izonicotinoilhidrazona)-*tris*-aqua)fier(III) dihidrat cu formula [Fe(H₂L¹)(H₂O)₃](NO₃)₃·2H₂O (I) în calitate de stimulator al procesului de biosinteză a proteazelor acide și neutre la cultivarea tulpinii de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 (Tabelul 2)

Exemplul 3. Tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 se cultivă în baloane Erlenmayer 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; CaCO₃ – 0,2; (NH₄)₂SO₄ – 0,1; [Fe(H₂L¹)(H₂O)₃](NO₃)₃·2H₂O(I) sau [Fe(H₂L²)(H₂O)₃](NO₃)₃·2H₂O (II) – 0,0005...0,0010; restul apă de robinet; pH-ul inițial al mediului 6,25. Mediul nutritiv se inoculează 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 maț-agar. Cultivarea se realizează în condiții de agitare continuă (180 rot/min) timp de 120 ore, la temperatura de 28 °C.

Tabelul 2. Modificarea activității proteolitice a micromicetei *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 sub influența compușilor coordinați I și II

Proteaze acide (pH 3,6)							
Comp. coord.	conc., mg/L	4 zi		5 zi		6 zi	
		U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%
I	5	17,64	130,92	29,67	116,4	16,21	106,3
	10	25,66	190,5	32,40	127,0	12,83	84,2
	15	10,75	79,8	21,49	84,3	12,19	80,0
II	5	16,20	120,2	41,70	163,5	13,47	88,4
	10	17,64	130,9	51,16	200,6	14,11	92,6
	15	8,09	59,5	17,48	68,6	10,74	70,5
Martor	-	13,47	100,0	25,5	100,0	15,23	100,0
Proteaze neutre (pH 7,4)							
Comp. coord.	conc., mg/L	4 zi		5 zi		6 zi	
		U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%
I	5	20,5	150,9	49,46	150,8	19,35	77,0
	10	21,53	158,5	61,37	187,1	23,57	93,9
	15	18,32	134,9	32,29	98,4	17,17	68,4
II	5	17,17	126,4	51,63	157,4	19,35	77,0
	10	20,5	150,9	60,22	183,5	25,88	103,6
	15	17,17	126,4	27,42	83,7	12,94	51,5
Martor*	-	13,58	100,0	32,8	100,0	12,94	100,0
Proteaze neutre (pH 7,4)							
Comp. coord.	conc., mg/L	5 zi		6 zi			
		U/mL	%	U/mL	%		
I	5	49,46	90,09	19,35	36,42		
	10	61,37	115,51	23,57	44,36		

	15	32,29	60,77	17,17	32,32
II	5	51,63	97,18	19,35	36,42
	10	60,22	113,34	25,88	48,71
	15	27,42	51,61	12,94	24,35
Martor**	-	53,15	100	40,72	100

* martor - mediul clasic – 1 (MD 4186)

** cea mai apropiată soluție – 2 (MD 4234)

Activitatea proteazelor acide (pH-ul 3,6) ale micromicetei, în variantele optimizate ale mediului, determinată în lichidul cultural prin metoda Anson după acțiunea asupra cazeinatului de sodium în ziua a 5-a de cultivare (ziua manifestării maximei de biosinteză în variant martor) variază în limitele 29,67...32,40 U/mL pentru complexul I și 41,70...51,16 U/mL pentru complexul II în funcție de concentrația aplicată a compusului coordonativ, cu manifestarea maximei (32,4 U/mL; 51,16 U/mL) la concentrația de 0,0010%, față de 25,50 U/mL în varianta martor, sporul activității constituind 16,4...27,0% pentru complexul I și 63,5...100,6% pentru complexul II.

Activitatea proteazelor neutre (pH-ul 7,4), determinată similar, variază în limitele 49,46...61,37 U/mL pentru complexul I și 51,63...60,22 U/mL pentru complexul II în funcție de concentrația aplicată a compusului coordonativ, cu manifestarea maximei la concentrația de 0,0010%, față de 32,8 U/mL în varianta martor, sporul activității constituind 50,8...87,1% și 57,4...83,5% respectiv pentru complexul I și complexul II (Tabelul 2).

Proprietățile azotatului de (2,3-butandionă-*bis*(izonicotinoilhidrazonă)-*tris*-aqua)fier(III) dihidrat cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (I) și azotatului de (2,3-butandionă-*bis*(nicotinoilhidrazonă)-*tris*-aqua)fier(III) dihidrat cu formula $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (II) prezintă interes pentru biotehnologie în calitate de stimulatori ai proceselor de enzimogeneză la cultivarea tulpinii de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12.