

UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 582.282+577.152.3

CONDRUC VIORICA

SINTEZA ORIENTATĂ A AMILAZELOR EXOCELULARE
LA TULPINA DE FUNGI
***ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 06**

163.04. MICROBIOLOGIE

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific

CILOCI Alexandra, doctor în științe biologice, cercetător conferențiar

Consultant științific

RUDIC Valeriu, academician, profesor universitar, Om emerit al Republicii Moldova

Autor

CONDRUC Viorica

CHIȘINĂU, 2024

© Condruș Viorica, 2024

CUPRINS

ADNOTARE (în română, rusă și engleză)	5
LISTA TABELELOR	8
LISTA FIGURILOR	10
LISTA ABREVIERILOR	11
INTRODUCERE	12
1. ASPECTE GENERALE PRIVIND ENZIMELE AMILOLITICE, PRODUCĂTORII PERSPECTIVI ȘI METODE DE SINTEZĂ ENZIMATICĂ AMELIORATĂ	19
1.1. Caracteristica complexului enzimatic amilolitic	19
1.2. Fungii miceliali ca producători efectivi și de perspectivă ai complexului amilolitic	24
1.3. Sinteza orientată a complexului enzimatic amilolitic de către micromicete	30
1.3.1 Undele milimetrice de intensitate joasă ca factor reglator al sintezei microbiene	35
1.3.2 Rolul compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție în sinteza orientată a enzimelor	36
1.3.3 Nanoparticulele și rolul lor în dirijarea metabolismului microbial	39
1.4. Concluzii la capitolul 1	43
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	45
2.1. Materiale și obiectul de cercetare	45
2.2. Metode de cercetare	50
2.2.1. Determinarea parametrilor optimi de cultivare a tulpinii în studiu	52
2.2.2. Selectarea mediului optim de cultivare și producere a amilazelor de către tulpina în studiu	53
2.2.3. Validarea rezultatelor la nivel de stație pilot	56
2.2.4. Metode de separare și studiu al proprietăților fizico-chimice ale complexului enzimatic amilolitic sintetizat de tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06	57
2.3. Prelucrarea statistică a datelor	57
2.4. Concluzii la capitolul 2	58
3. STABILIREA PARTICULARITĂȚILOR MORFO-CULTURALE ȘI FIZIOLOGO-BIOCHIMICE ALE TULPINII <i>A. NIGER</i> CNMN FD 06	59
3.1. Evaluarea comparativă a capacității de sinteză a amilazelor exocelulare și selectarea mediului optim de cultivare a tulpinii <i>A. niger</i> CNMN FD 06	59
3.2. Aspecte morfo-culturale și fiziologo-biochimice ale micromicetei în studiu	65
3.3. Stabilirea dependenței biosintezei amilolitice de valorile de $t^{\circ}\text{C}$ și durata de cultivare a micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06	73
3.4. Concluzii la capitolul 3	76
4. AMELIORAREA POTENȚIALULUI DE BIOSINTEZĂ A COMPLEXULUI AMILOLITIC DE CĂTRE TULPINA DE FUNGI <i>A. NIGER</i> CNMN FD 06	77
4.1. Influența undelor milimetrice cu intensitate joasă asupra biosintezei enzimelor amilolitice de către tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06	77
4.2. Influența compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție asupra procesului de biosinteză a amilazelor de către tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06	81
4.2.1. Influența compușilor coordinativi ai Zn (II), Cu (II), Co (II) și Cr (II)	82

asupra potențialului de biosinteză a tulpinii <i>A. niger</i> CNMN FD 06	
4.2.2. Influența compușilor heterometalici ai metalelor de tip „s” asupra biosintezei enzimelor amilolitice la tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06	91
4.3. Influența nanooxidilor metalici asupra activității enzimatică la tulpina în studiu	98
4.4. Validarea pilot a biotehnologiilor avansate de obținere a preparatelor enzimatică amilolitice sintetizate de tulpina în studiu	106
4.4.1. Stabilirea parametrilor tehnologici principali la cultivarea submersă avansată a tulpinii <i>A. niger</i> CNMN FD 06 cu aplicarea compușilor coordinațivi ai bariului și stronțului în condiții de stație pilot	108
4.4.2. Stabilirea parametrilor tehnologici principali la cultivarea avansată cu aplicarea nanooxidilor cuprului și titanului, în condiții de stație pilot	110
4.5. Concluzii la capitolul 4	113
5. PROCEDEE TEHNOLOGICE INOVATIVE DE OBȚINERE A PREPARATELOR ENZIMATICE AMILOLITICE LA CULTIVAREA AVANSATĂ A TULPINII DE MICROMICETE <i>A. NIGER</i> CNMN FD 06	116
5.1. Selectarea condițiilor de separare a complexului enzimatic amilolitic din lichidul cultural al tulpinii <i>A. niger</i> CNMN FD 06	116
5.2. Cercetări privind particularitățile de acid-stabilitate a amilazelor sintetizate de producător și de implimentare a preparatului amilazic ca ameliorator în panificație	118
5.3. Concluzii la capitolul 5	125
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	127
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	133
ANEXE	155
Declarația privind asumarea răspunderii	177
CV-ul autorului	178

ADNOTARE

Condruș Viorica „Sinteza orientată a amidazelor exocelulare la tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 06”, teza de doctor în științe biologice, Chișinău, 2024.

Structura tezei: introducere, cinci capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia din 223 de titluri, 22 de anexe, 123 pagini de text de bază, 23 de figuri, 32 de tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 29 de lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: micromicete, enzime hidrolitice/enzime amidolitice extracelulare, activitate amidolitică, medii nutritive, sinteză enzimatică, *Aspergillus niger* CNMN FD 06, compuși coordinațivi, unde milimetrice, nanoparticule.

Scopul lucrării: elaborarea procedeeelor inovative de sinteză orientată a amidazelor extracelulare la cultivarea submersă a tulpinii fungice *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

Obiectivele cercetării: stabilirea exigențelor nutritive, particularităților morfoculturale și condițiilor optime de cultivare a tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 06 ca obiect cu potențial biotehnologic; optimizarea condițiilor de sinteză orientată a amidazelor amidolitice de către tulpina producătoare, utilizând ca stimulatori și reglatori de creștere influența iradierii electromagnetice de intensitate joasă în diapazon milimetric, compușilor coordinațivi ai metalelor și nanoparticulelor; stabilirea parametrilor optimi de separare a preparatului enzimatic amidolitic din lichidul cultural al tulpinii în studiu.

Noutatea și originalitatea științifică: industriei microbiologice se propune o tulpină nouă de fungi - *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - cu potențial înalt de sinteză a amidazelor amidolitice exocelulare. Se recomandă o variantă nouă de mediu nutritiv, pentru cultivarea submersă a producătorului, ce conține stimulator de origine chimică și asigură eficiența economică esențială prin majorarea randamentului de amidaze și reducerea duratei de cultivare (**Brevet de invenție MD Nr. 2836. BOPI. Nr.8. 2005**). A fost stabilită influența compușilor coordinațivi în calitate de stimulatori ai sintezei microbiene la tulpina fungică în studiu (**Brevet de invenție MD Nr. 2833. BOPI. Nr.8. 2005**). A fost demonstrată influența nanocompozitelor în scopul sporirii biosintezei amidazelor (**Brevet de invenție MD Nr. 4847 BOPI Nr.2.2023**). A fost obținut un preparat enzimatic amidolitic cu activitate înaltă necesar în diverse ramuri ale economiei naționale (**Act de experimentare**).

Problema științifică soluționată: fundamentarea științifică a capacității de sinteză orientată a amidazelor amidolitice de către tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 06 și de ameliorare a potențialului de biosinteză enzimatică prin aplicarea efectului biostimulator al undelor milimetrice, utilizarea selectivă a compușilor coordinațivi ai metalelor și a nanocompozitelor în calitate de stimulatori ai sintezei principiilor biologice active, ceea ce a condus la sporirea activității amidazelor acid-stabile (pH 2,5) și acid-labile (pH 4,7) sintetizate de producător și la elaborarea unor procedee noi de sinteză ameliorată în cadrul unui singur flux tehnologic pentru obținerea preparatelor enzimatice noi de importanță biotehnologică.

Semnificația teoretică: rezultatele obținute contribuie la elucidarea mecanismelor de stimulare a procesului de sinteză microbiologică a amidazelor amidolitice și posibilitatea utilizării radiației electromagnetice în diapazon milimetric, compușilor coordinațivi și nanoparticulelor ca factor de sporire a biosintezei amidazelor la tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 06 care asigură capacități sporite de sinteză enzimatică.

Valoarea aplicativă: au fost elaborate trei tehnologii de sinteză orientată a amidazelor amidolitice de către tulpina fungică *Aspergillus niger* CNMN FD 06 cu potențial înalt de sinteză a amidazelor amidolitice exocelulare. A fost stabilită schema tehnologică de obținere a preparatelor enzimatice cu activitate amidolitică la cultivarea submersă a micromicetei *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

Implementarea rezultatelor științifice: capacitatea de sinteză orientată a amidazelor amidolitice de către *Aspergillus niger* CNMN FD 06, la nivel de laborator, a fost testată în Laboratorul de Enzimologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie și în cadrul Laboratorului Central de Control al Asociațiilor Fabricilor de Pâine al S.A. „Franzeluța”.

АННОТАЦИЯ

Кондрук Виорика «Направленный синтез внеклеточных амилаз штаммом грибов *Aspergillus niger* CNMN FD 06», докторская диссертация по биологии, Кишинев, 2024.

Структура диссертации: введение, пять глав, общие выводы и рекомендации, библиография из 223 наименований, 22 приложения, 123 страницы основного текста, 23 рисунка, 32 таблицы. Полученные результаты опубликованы в 29 научных работах.

Ключевые слова: микромицеты, гидролитические ферменты/внеклеточные амилотические ферменты, амилотическая активность, питательные среды, синтез ферментов, *Aspergillus niger* CNMN FD 06, координационные соединения, миллиметровые волны, наночастицы.

Цель работы: разработка инновационных методов направленного синтеза внеклеточных амилаз при глубинном культивировании штамма *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

Задачи исследования: установление питательных потребностей, морфокультуральных особенностей и оптимальных условий культивирования штамма *Aspergillus niger* CNMN FD 06 как объекта с биотехнологическим потенциалом; оптимизация условий направленного синтеза амилотических ферментов штаммом-продуцентом; использование в качестве стимуляторов роста и регуляторов воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона, координационных соединений металлов и наночастиц; установление оптимальных параметров выделения амилотического ферментного препарата из культуральной жидкости исследуемого штамма.

Научная новизна и оригинальность: микробиологической промышленности предложен новый штамм грибов - *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - с высоким потенциалом синтеза внеклеточных амилотических ферментов. Для глубинного культивирования продуцента рекомендован новый вариант питательной среды, содержащий стимулятор химического происхождения и обеспечивающий существенную экономическую эффективность за счет увеличения выхода амилаз и сокращения сроков культивирования (Патент на изобретение МД № 2836. БОПИ. 8. 2005). Установлено влияние координационных соединений как стимуляторов микробного синтеза исследуемым штаммом гриба (Патент на изобретение МД № 2833. БОПИ. № 8. 2005 г.). Показано влияние нанокмполитов на усиление биосинтеза ферментов (Патент на изобретение МД № 4847 ВОПИ № 2.2023). Получен амилотический ферментный препарат высокой активности, необходимый в различных отраслях народного хозяйства (Акт экспериментирования).

Решенная научная задача: научное обоснование возможности направленного синтеза амилотических ферментов штаммом *Aspergillus niger* CNMN FD 06 и повышения потенциала биосинтеза ферментов за счет применения биостимулирующего воздействия миллиметровых волн, избирательного использования координационных соединений металлов и нанокмполитов в качестве стимуляторов синтеза биологически активных веществ, что привело к повышению активности кислотоустойчивых (рН 2,5) и кислотолабильных (рН 4,7) амилаз, синтезируемых производителем и разработке новых усовершенствованных методик синтеза в едином технологическом потоке для получения новых ферментных препаратов биотехнологического значения.

Теоретическая значимость: полученные результаты способствуют выяснению механизмов стимуляции процесса микробиологического синтеза амилотических ферментов и возможности использования электромагнитного излучения миллиметрового диапазона, координационных соединений и наночастиц в качестве фактора повышения биосинтеза амилаз у штамма *Aspergillus niger* CNMN FD 06, обеспечивающий повышенные возможности синтеза ферментов.

Практическое значение: разработаны три технологии направленного синтеза амилотических ферментов штаммом грибов *Aspergillus niger* CNMN FD 06. Разработана технологическая схема получения ферментных препаратов с амилотической активностью при глубинном культивировании микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

Внедрение научных результатов: способность к направленному синтезу амилотических ферментов штаммом *Aspergillus niger* CNMN FD 06 на лабораторном уровне была проверена в Лаборатории энзимологии Института микробиологии и биотехнологии и в Центральной контрольной лаборатории Ассоциации производителей хлеба А.О. «Franzeluța».

ANNOTATION

Condruș Viorica "Directed synthesis of exocellular amylases from the stem of micromycete *Aspergillus niger* CNMN FD 06", doctoral thesis in biology, Chisinau, 2024.

Structure of the thesis: introduction, five chapters, general conclusions and recommendations, bibliography of 223 titles, 22 appendices, 123 pages of basic text, 23 figures, 32 tables. The obtained results are published in 29 scientific works.

Key words: micromycetes, hydrolytic enzymes/extracellular amylolytic enzymes, amylolytic activity, nutrient media, enzyme synthesis, *Aspergillus niger* CNMN FD 06, coordination compounds, millimeter waves, nanoparticles.

The aim of the work: the development of innovative procedures for oriented synthesis of extracellular amylases in the submerged cultivation of the fungal strain *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

The objectives of the research: establishing the nutritional requirements, the morphocultural peculiarities and the optimal cultivation conditions of the strain *Aspergillus niger* CNMN FD 06 as an object with biotechnological potential; optimizing the conditions for the oriented synthesis of amylolytic enzymes by the producing strain, using as growth stimulators and regulators the influence of low-intensity electromagnetic radiation in the millimeter range, coordinating compounds of metals and nanoparticles; establishing the optimal parameters for separating the amylolytic enzyme preparation from the culture liquid of the strain under study.

Scientific novelty and originality: a new strain of fungi - *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - with high potential for the synthesis of exocellular amylolytic enzymes is proposed to the microbiological industry. A new variant of nutrient medium is recommended for the submerged cultivation of the producer, which contains a stimulator of chemical origin and ensures essential economic efficiency by increasing the yield of amylases and reducing the duration of cultivation (**Invention Patent MD No. 2836. BOPI. No. 8. 2005**). The influence of coordinating compounds as stimulators of microbial synthesis in the fungal strain under study was established (**Invention Patent MD No. 2833. BOPI. No. 8. 2005**). The influence of nanocomposites in order to increase the biosynthesis of enzymes was demonstrated (**Invention Patent MD No. 4847 BOPI No. 2.2023**). An amylolytic enzyme preparation with high activity needed in various branches of the national economy was obtained (**Act of experimentation**).

The scientific problem solved: scientific substantiation of the ability of the directed synthesis of amylolytic enzymes by the *Aspergillus niger* CNMN FD 06 strain and of improving the enzyme biosynthesis potential by applying the biostimulatory effect of millimeter waves, the selective use of coordinating metal compounds and nanocomposites as synthesis stimulators of biologically active principles, which led to increased activity of acid-stable (pH 2.5) and acid-labile (pH 4.7) amylases synthesized by the producer and the development of new improved synthesis procedures within a single technological flow to obtain new enzyme preparations of biotechnological importance.

Theoretical significance: the obtained results contribute to the elucidation of the mechanisms of stimulation of the process of microbiological synthesis of amylolytic enzymes and the possibility of using electromagnetic radiation in the millimeter range, coordinating compounds and nanoparticles as a factor to increase the biosynthesis of amylases by the *Aspergillus niger* CNMN FD 06 strain that ensures increased capacities of enzyme synthesis.

Application value: three technologies were developed for the directed synthesis of amylolytic enzymes by the fungal strain *Aspergillus niger* CNMN FD 06 with high potential for the synthesis of exocellular amylolytic enzymes. The technological scheme for obtaining enzyme preparations with amylolytic activity during submerged cultivation of the micromycete *Aspergillus niger* CNMN FD 06 was established.

Implementation of scientific results: the directed synthesis capacity of the amylolytic enzymes of *Aspergillus niger* CNMN FD 06, at the laboratory level, was tested in the Enzymology Laboratory, the Institute of Microbiology and Biotechnology and in the Central Control Laboratory of the Bread Manufacturers' Associations of S.A. „Franzeluța”.

LISTA TABELELOR

Nr. tab.	Denumirea tabelor	Numărul paginii
2.1.	Compușii coordinativi ai metalelor utilizați ca stimulatori ai procesului de sinteză enzimatică la tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06	49
3.1.	Evaluarea comparativă a unor tulpini de fungi miceliali după criteriul de sinteză a amidazelor exocelulare	60
3.2.	Activitatea amidolitică a micromicetelor selectate la etapa preliminară de cercetare	61
3.3.	Evaluarea comparativă a unor tulpini de fungi miceliali după criteriul de sinteză a amidazelor exocelulare pe mediul ce conține inductor (0,3% amidon)	63
3.4.	Activitatea amidolitică a tulpinii <i>A. niger</i> CNMN FD 06 pe medii cu diferite surse de amidon	64
3.5.	Creșterea și sporularea tulpinii <i>A. niger</i> CNMN FD 06 pe medii nutritive agarizate	65
3.6.	Particularitățile morfologice ale coloniilor micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06 pe diferite medii nutritive	66
4.1.	Influența duratei de acțiune a UMM, în regim periodic, asupra activității amidolitice la tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06	78
4.2.	Modificarea activității amidolitice a tulpinii <i>A. niger</i> CNMN FD 06, în funcție de influența UMM de intensitate joasă, în diferite regimuri de emitere, (pH 4,7)	79
4.3.	Influența UMM de intensitate joasă asupra acid-stabilității amidazelor sintetizate de tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06	80
4.4.	Influența compușilor coordinativi ai Zn (II)-ului asupra biosintezei amidazelor de către tulpina fungică <i>A. niger</i> CNMN FD 06	83
4.5.	Influența compușilor coordinativi ai Cu (II)-ului asupra activității enzimatice a tulpinii fungice <i>A. niger</i> CNMN FD 06	84
4.6.	Influența compușilor coordinativi ai Co (II)-ului și Cr (II)-ului asupra activității enzimatice a tulpinii fungice <i>A. niger</i> CNMN FD 06	85
4.7.	Influența dioximaților Co (III)-ului cu F (I) asupra activității enzimatice a micromicetei în studiu	86
4.8.	Influența compușilor coordinativi ai Co (III) cu liganzi oximici asupra activității amidolitice a tulpinii de micromicete <i>A. niger</i> CNMN FD 06	87
4.9.	Influența compusului coordinativ $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot (\text{Thio})_2] \text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ asupra duratei de cultivare a micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06	88
4.10.	Modificarea activității amidolitice a tulpinii <i>A. niger</i> CNMN FD 06, în cultură submersă, sub influența compușilor coordinativi ai elementelor „s”	91
4.11.	Modificarea activității amidolitice la micromiceta <i>A. niger</i> CNMN FD 06 sub influența nanoparticulelor de titan în dinamica cultivării submerse	98
4.12.	Modificarea activității amidolitice a tulpinii de fungi miceliali <i>A. niger</i> CNMN FD 06, în cultură submersă, sub influența nanoparticulelor oxidului de fier și zinc	99
4.13.	Influența nanoparticulelor de cupru, cu dimensiuni diferite, asupra activității amidolitice a micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06, la cultivarea submersă, în dinamică	100
4.14.	Influența nanoparticulelor oxidului de Cu și Ti, în diferite concentrații, asupra activității amidolitice a micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06	102
4.15.	Influența nanoparticulelor de CuO < 50 nm și Cu 60-80 nm, în concentrație	103

	optimă selectată (5 mg/L), asupra activității amilolitice a micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06, în funcție de diferite valori ale pH-ului mediului de cultivare	
4.16.	Dinamica activității amilolitice la tulpina de micromicete <i>A. niger</i> CNMN FD 06, la cultivare avansată, cu aplicarea compusului coordinativ $[\text{Ba}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{SCN})_4]$, conc. 1 mg/L, NaNO_3 - 9,0 g/L, în condiții de stație pilot	109
4.17.	Dinamica activității amilolitice la tulpina de micromicete <i>A. niger</i> CNMN FD 06, la cultivare avansată, cu aplicarea compusului coordinativ $[\text{Sr}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{SCN})_4]$, conc. 5 mg/L, NaNO_3 - 9,0 g/L, în condiții de stație pilot	109
4.18.	Dinamica activității amilolitice la tulpina de micromicete <i>A. niger</i> CNMN FD 06, la cultivare avansată, cu aplicarea nanoparticulelor de cupru (60-80 nm), conc. 10 mg/L, NaNO_3 - 9,0 g/L, în condiții de stație pilot	111
4.19.	Dinamica activității amilolitice la tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06, la cultivare avansată, cu aplicarea nanoparticulelor TiO_2 , conc. 15 mg/L, NaNO_3 - 9,0 g/L, în condiții de stație pilot	112
5.1.	Randamentul precipitatului proteic (g/L) din lichidul cultural al micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06 în dependență de raportul LC:S	117
5.2.	Activitatea amilolitică a amilazelor produse de micromiceta în studiu în condiții de aciditate sporită	118
5.3.	Influența concentrației solventului și durata de contact asupra activității amilazelor produse de micromiceta <i>A. niger</i> CNMN FD 06 (U/g)	119
5.4.	Randamentul (g/L) și activitatea amilazelor (U/mL) micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06 în funcție de pH-ul lichidului de cultură	120
5.5.	Randamentul și activitatea amilazelor din lichidul de cultură al tulpinii <i>A. niger</i> CNMN FD 06 în funcție de temperatură (raportul LC:S de 1:4)	121
5.6.	Influența preparatului amilazic, sintetizat de tulpina fungică <i>A. niger</i> CNMN FD 06 asupra indicilor tehnologici în procesul fermentativ al pâinii.	125

LISTA FIGURILOR

Nr. fig.	Denumirea figurilor	Numărul paginii
1.1.	Structura α -amilazei, β -amilazei și glucoamilazei	20
1.2.	Modelul ipotetic al mecanismului de acțiune al amilazelor asupra polizaharidelor	23
2.1.	Aspectul macroscopic (A) și aspectul microscopic (B) al tulpinii de fungi miceliali <i>A. niger</i> CNMN FD 06, cultivată pe mediul malț-agar	45
2.2.	Cultivarea tulpinii <i>A. niger</i> CNMN FD 06, în condiții de stație pilot, în fermentatorul BIOSTAT ^R A plus (Sartorius, Germania)	56
3.1.	Aspectul culturii <i>A. niger</i> CNMN FD 06 pe diferite medii agarizate	67
3.2.	Tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06 crescută pe tuburi înclinate (A) și pe mediu agarizat (B)	67
3.3.	Aspecte ale variațiilor morfologice la tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06, ziua a 3-ea de cultivare	70
3.4.	Dinamica activității amilolitice (U/mL) a variantelor identificate la tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06 (etapa I)	70
3.5.	Dinamica activității amilolitice (U/mL) la variantele separate la tulpina fungică <i>A. niger</i> CNMN FD 06 (etapa II)	71
3.6.	Dinamica activității amilolitice (U/mL) la variantele separate la tulpina fungică <i>A. niger</i> CNMN FD 06 (etapa III)	72
3.7.	Biosinteza amilazelor extracelulare la tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06 la temperatura de 20 ⁰ C	74
3.8.	Biosinteza amilazelor extracelulare la tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06 la temperatura de 30 ⁰ C	75
3.9.	Biosinteza amilazelor extracelulare la tulpina <i>A. niger</i> CNMN FD 06 la la temperatura de 40 ⁰ C	75
4.1.	Schema de realizare a procedurii de sinteză orientată pentru evaluarea efectului UMM de intensitate joasă asupra activității biosintetice a tulpinii în studiu	81
4.2.	Influența compusului coordonativ [Co(DH) ₂ ·(Thio) ₂] BF ₄ ·3H ₂ O, în diferite concentrații, asupra activității amilolitice a tulpinii fungice <i>A. niger</i> CNMN FD 06	89
4.3.	Schema de realizare a procedurii de cultivare a tulpinii de micromicete <i>A. niger</i> CNMN FD 06 în prezența biostimulatorilor de origine chimică	90
4.4.	Influența compușilor coordonativi ai Ba și Sr, în diferite concentrații, asupra activității amilolitice a micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06	94
4.5.	Influența compușilor Ba și Sr, în concentrațiile optime selectate (Ba - 1 mg/L; Sr - 5 mg/L), asupra activității amilolitice a micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06, în funcție de diferite valori ale pH-ului mediului de cultivare	96
4.6.	Influența nanoparticulelor oxidului de Cu și Ti, în diferite concentrații, asupra activității amilolitice a micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06	104
4.7.	Schema de realizare a procedurii de cultivare a tulpinii de micromicete <i>A. niger</i> CNMN FD 06 în prezența compușilor biostimulatori	106
4.8.	Dinamica parametrilor de t ⁰ C, pH și O ₂ dizolvat, la cultivarea tulpinii fungice <i>A. niger</i> CNMN FD 06, în condiții de stație pilot	111
5.1.	Randamentul global a unităților enzimactice din 1L de lichid cultural, al micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06 în coraport cu durata de precipitare	122
5.2.	Schema tehnologică de obținere a preparatului enzimatic cu acțiune amilolitică la cultivarea submersă a micromicetei <i>A. niger</i> CNMN FD 06.	124

LISTA ABREVIERILOR

AE	alcool etilic (C ₂ H ₅ OH)
Ala	alanină
An	anilină
CC	compuși complecși coordinativi
CNMN FD 06	Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene Fungi Dimorfi 06
DH₂	dimetilglioximă
LC	lichid cultural
NP	nanoparticule
PC	picolinați
Py	pyridine
S	solvent
Ser	serină
Thio	thiourea (tiocarbamidă)
Thr	treonină
UMM	unde milimetrice

INTRODUCERE

Întreaga chimie microbiană, precizia și eficacitatea sa se bazează pe calitățile celor aproximativ două mii de enzime care catalizează reacțiile metabolismului celular.

F. Jacob

Actualitatea și importanța temei abordate:

În contextul preocupărilor globale de mediu, enzimele contribuie la condiții de sinteză mai sigure prin modernizarea tratamentelor chimice ale proceselor de producție, iar tehnologia enzimatică oferă alternative mai ecologice și mai puțin costisitoare, comparativ cu practicile și procesele convenționale.

În biotehnologiile moderne cele mai largi utilizări cunosc hidrolazele. Capacitatea biocatalitică remarcabilă ale enzimelor de a media fin, în condiții moderate de pH, temperatură și presiune, multitudinea reacțiilor biochimice complexe și variate, argumentează avantajele proceselor catalizate de fermenți, față de cataliza chimică, influențând considerabil extinderea sferei de aplicare. Marcate prin particularitatea specifică de a degrada polimerii naturali (amidonul, celuloza, pectina, lipidele) în substanțe simple - materii prime pentru multe produceri, hidrolazele constituie baza tehnologiilor moderne de procesare a materiilor vegetale.

Piața globală a enzimelor, evaluată în 2021 la peste 11 miliarde USD, rămâne a fi dominată de hidrolaze, în particular de amilaze, lipaze și celulaze. Printre acestea amilazele, catalizatori a reacției de scindare a amidonului în zaharuri cu masă moleculară mică, prezintă cea mai importantă grupă de enzime pentru biotehnologiile performante [45, 90, 103, 112, 116, 139, 201]. Ele constituie 30% din volumul total al enzimelor produse la scară industrială [148].

Pentru intensificarea proceselor tehnologice, în ultimul timp, sunt utilizate pe larg amilazele de origine microbiană care, datorită productivității înalte a microorganismelor, accesibilității și prețului redus al materiei prime microbiologice, consecvent substituie și reduc utilizarea amilazelor de origine vegetală și animală [10, 14, 75, 104, 110, 112, 165].

Consumatori ai amilazelor sunt producerile de mare tonaj ca fabricarea pâinii și a berii, producerea glucozei cristaline și a alcoolului. Enzimele complexului amilolitic sunt solicitate pe larg la fabricarea hidrolizatelor de amidon și a siropurilor, în agricultură la producerea furajelor combinate, în industria textilă și cea a detergentilor biodegradabili etc. [75, 110, 123, 128, 201]. Amilazele cu grad înalt de purificare se folosesc în cercetări științifice la stabilirea topografiei centrului activ și a mecanismului de acțiune al acestui grup de fermenți.

α - Amilazele, fiind metaloenzime tipice, prezintă modele comode în studierea însușirilor fizico-chimice și capacităților biosintetice ale metaloenzimelor [52, 104, 148, 161].

Amilazele înalt purificate sunt în centrul atenției și în aspectul importanței lor pentru medicină. Ele se aplică în enzimoterapie în cazul insuficienței cronice de amilaze și a unor patologii ale ficatului, pancreasului, altor organe ale tractului gastro-intestinal, provocate de acumularea anomală a glicogenului.

Dintre microorganisme, performanți producători ai complexului amilolitic (α - și β - amilaza, glucoamilaza) sunt recunoscuți fungii miceliali, îndeosebi reprezentanții genului *Aspergillus* [41, 59, 64, 81, 99, 104, 114, 142, 164, 172, 215]. Avantajele fungilor, ca producători ai complexului amilolitic, față de alte microorganisme, o constituie capacitatea lor de a secreta enzimele în mediu de nutriție, simplificând mult tehnicile de recuperare a fermenților din filtratele de cultură [215].

Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemelor de cercetare.

În Republica Moldova enzimele amilolitice sunt antrenate în majoritatea ramurilor tradiționale ale economiei: la fabricarea pâinii și produselor de patiserie, producerea glucozei cristaline și a alcoolului, producerea conservelor și sucurilor din fructe și legume, în vinificație, în producerea berii și alcoolului, în zootehnie, în medicina umană și veterinară, în procesarea amidonului și a materialelor amidonoase [70]. Totodată, preparate enzimatică în Republica Moldova nu se produc, iar necesitățile industriilor în enzime se acoperă prin import.

Spectrul larg de utilizare a amilazelor de natură microbială, rezultat cu intensificarea și perfecționarea proceselor tehnologice, îmbunătățirea calității produselor finale, cât și lipsa producerii preparatelor enzimatică autohtone argumentează cercetările orientate spre evidențierea, studierea și introducerea în cultură ca obiecte biotehnologice competitive a unor tulpini de microorganisme înalt producătoare, elaborarea unor procedee moderne de sporire și stabilizare a biosintezei enzimatică.

Cercetările din domeniu atestă posibilitatea valorificării potențialului biosintetic al tulpinilor fungice prin utilizarea diferitor regulatori ai sintezei microbiene, inclusiv efectul biostimulator al undelor milimetrice de intensitate joasă, compușilor coordinativi ai metalelor, nanocompozitelor [2, 4-9, 66, 87, 93, 109, 119, 124].

Elaborarea tehnologiilor de producere a preparatelor enzimatică prin sinteză orientată cu tulpini selectate de fungi, în calitate de surse de enzime, stabilirea căilor de dirijare calitativă și cantitativă a potențialului biosintetic, crearea procedeeleor economic avantajoase, ecologic inofensive de reglare și control ale proceselor microbiene sunt actuale, oportune, corespund tendințelor mondiale de dezvoltare ale științelor biologice și ale societății.

Scopul lucrării: Elaborarea procedeele inovative de sinteză orientată a amilazelor extracelulare la cultivarea submersă a tulpinii fungice *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

Obiectivele cercetării:

1. stabilirea exigențelor nutritive, particularităților morfo-culturale și condițiilor optime de cultivare a tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 06 ca obiect cu potențial biotehnologic;
2. optimizarea condițiilor de sinteză orientată a enzimelor amilolitice de către tulpina producătoare, utilizând ca stimulatori și reglatori de creștere influența iradierii electromagnetice de intensitate joasă în diapazon milimetric, compușilor coordinativi ai metalelor și nanoparticulelor;
3. stabilirea parametrilor optimi de separare a preparatului enzimatic amilolitic din lichidul cultural al tulpinii în studiu.

Ipoteza de cercetare: Capacitatea de biosinteză orientată a amilazelor exocelulare la tulpina de fungi miceliali *Aspergillus niger* CNMN FD 06, selectată destinat ca producător de enzime amilolitice, valorificată prin evidențierea și argumentarea perspectivei utilizării compușilor coordinativi ai metalelor de tipul „s” și „d”, a compușilor cobaltului (III) cu anioni fluorurați din clasa dioximelor, a nanoparticulelor metalelor Ti, Fe, Cu, Zn și iradierii electromagnetice în diapazon milimetric, asigură creșterea capacității de sinteză microbiană orientată a producătorului și elaborarea strategiilor de sporire a performanțelor tehnologice în cultivarea fungilor miceliali.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese: Setul de metode selectate în cercetare sunt cele aplicate în microbiologie și enzimologie și a inclus un șir de tehnici și procedee analitice adaptate la obiectul de studiu [51, 57, 63, 67, 77, 82, 88, 89]. În cercetări au fost aplicate:

- metode microbiologice de identificare a particularităților morfo-culturale și fiziologo-biochimice a culturilor de micromicete;
- metode fizico-chimice (gravimetrice, fotocolimetrice, spectrofotometrice, potențiometrice), biochimice și microbiologice clasice și moderne de apreciere a parametrilor tulpinii în studiu, a activității și calității compușilor biologici sintetizați;
- metode microbiologice de cultivare și păstrare a tulpinilor biologice-potențiali producători de produse biologice active;
- metode standardizate, conform reglementărilor normative, de obținere și evaluare a calității enzimelor amilolitice obținute;

- metode de valorificare a cercetărilor, la nivel de stație pilot și metode matematice de planificare a experimentelor, de analiză comparativă și de evaluare statistică a rentabilității preparatelor amilolitice obținute și tehnologiilor elaborate.

Analiza comparativă a potențialului de biosinteză a enzimelor amilolitice s-a realizat prin cercetări de screening a tulpinilor de micromicete din Colecția laboratorului de Enzimologie, criteriu de selectare a servit nivelul activității amilolitice a tulpinilor evaluate. Studiarea particularităților morfologice și culturale s-a efectuat în baza determinantului pentru *Aspergilli*, recomandat de autorii Bilai V.I., Covali Ȃ.Z., (1988) [58], cu utilizarea microscopului optic SK 14 PZO Warszawa, Poland, cu diferite obiective.

Cercetările de optimizare a mediului s-au efectuat cu selectarea mediilor de nutriție recomandate în literatura de specialitate [1, 67, 68] cu aplicarea parametrilor optimi de cultivare stabiliți pentru producere experimentală. Stabilitatea în timp a capacității de producere a enzimelor amilolitice a coloniilor de *A. niger* CNMN FD 06 a fost verificată prin pasaje repetate pe medii solide, urmate de inocularea acestora în mediul lichid și determinarea a două tipuri de amilaze: *acid-labile* (pH 4,7) și *acid-stabile* (pH 2,5), prin metoda colorimetrică cu iod, după gradul de hidroliză a amidonului solubil până la dextrine [64, 65, 75].

Ameliorarea potențialului biosintetic s-a realizat prin metode, recomandate de literatura de specialitate: aplicarea undelor milimetrice de intensitate joasă, utilizarea biostimulatorilor de natură chimică și a nanoparticulelor [66, 91, 119, 134]. Influența undelor milimetrice de intensitate joasă ($1 \text{ mW/cm}^2 \div 10 \text{ mW/cm}^2$) s-a studiat utilizând în calitate de generator de unde milimetrice de intensitate joasă dispozitivul „ЯВЬ-1” cu destinație terapeutică, care emite unde milimetrice cu $\lambda=5,6$ (53,8 GHz) în regim periodic și continuu, produs în or. Freazino (Federația Rusă) și dispozitivul UEM-3 (Republica Moldova).

Efectul biologic al compușilor complexi ai metalelor de tranziție și nanoparticulelor a fost evaluat după gradul de modificare a activității enzimatică la micromica în cercetare, fiind adăunați în mediile nutritive sterile odată cu materialul de inoculare. Suspensiile de nanoparticule din formele inițiale ale preparatelor (lichide sau solide) au fost pregătite cu utilizarea apei deionizate cu pH-6,25. Valorile pH-ului mediului de cultivare au fost determinate prin metode potențiometrice cu utilizarea pH-metrului Ino Lab.pH-720 WTW Germania (2010).

Prelucrarea statistică a datelor s-a efectuat conform metodelor acceptate pentru efectuarea cercetărilor medico-biologice [83].

Structura și volumul tezei: Teza este expusă pe 123 de pagini, inclusiv 32 de tabele, 23 de figuri și constă din introducere, sinteza literaturii, materiale și metode de cercetare, 5 capitole

ce reflectă rezultatele cercetărilor și tratarea lor științifică, concluzii, bibliografie cu 223 de surse științifice citate, adnotarea tezei în limbile română, rusă și engleză, 22 de anexe.

Cuvinte-cheie: *Aspergillus*, micromicetă, enzime hidrolitice, enzime amilolitice extracelulare, activitate amilolitică, medii nutritive, unde milimetrice, compuși coordinativi, nanoparticule.

Sumarul compartimentelor tezei:

CAPITOLUL 1. ASPECTE GENERALE PRIVIND ENZIMELE AMILOLITICE, PRODUCĂTORII PERSPECTIVI ȘI METODE DE SINTEZĂ ENZIMATICĂ AMELIORATĂ

Cuprinde sinteza celor mai relevante și de ultimă oră cercetări în domeniul tehnologiilor microbiologice, valorificării potențialului de biosinteză enzimatică a microorganismelor, în particular a fungilor miceliali, ca producători efectivi și de perspectivă a complexului amilolitic. Este expusă caracteristica complexului enzimatic amilolitic, proprietățile biochimice a preparatelor amilolitice și bazele științifice ale regimurilor de utilizare în procesele tehnologice abordate ca problemă actuală, atât în plan teoretic, cât și practic. Sunt descrise modelele de valorificare al potențialului de sinteză orientată a enzimelor amilolitice sub acțiunea undelor milimetrice de intensitate joasă, ai compușilor coordinativi a metalelor și nanocompozitelor cu valoare științifico-practică, precum și căile de optimizare a procesului de sinteză orientată pentru a îmbunătăți producerea de enzime și de a satisface cerințele diferitor industrii în preparate enzimatic.

CAPITOLUL 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Prezintă obiectele de cercetare, metodele și tehnicile de determinare a potențialului biosintetic și de optimizare a condițiilor de creștere și de valorificare a capacității de sinteză a produselor biologice, în baza rezultatelor altor cercetători din domeniul de referință.

Pentru realizarea obiectivelor propuse a fost utilizată tulpina fungică *Aspergillus niger* CNMN FD 06, identificată prin metode de screening ca perspectiv producător de amilaze. Obiecte de cercetare au servit compușii coordinativ ai metalelor și nanoparticulele de diferite dimensiuni și compoziție chimică.

Metodele microbiologice clasice și moderne de cercetare au fost aplicate pentru studiul particularităților morfo-fiziologice ale micromicetei în studiu, identificarea parametrilor de creștere pe diferite medii de cultură, la diferite temperaturi și capacitatea acesteia de a produce două tipuri de amilaze: acid-stabile (pH 4,7) și acid-labile (pH 2,5).

Studierea proprietăților morfo-culturale ale tulpinii în studiu și vizualizarea coloniilor a fost efectuată cu utilizarea microscopului optic SK 14 PZO Warszawa, Poland, cu diferite obiective.

Prelucrarea statistică a datelor privind rezultatele a 3-5 repetări obținute s-a efectuat prin calcularea mediei, abaterii standard și intervalului de încredere. Prelucrarea matematică a datelor experimentale și interpretarea grafică a rezultatelor a fost efectuată cu ajutorul programului MS Office (Excel).

CAPITOLUL 3. STABILIREA PARTICULARITĂȚILOR MORFO-CULTURALE ȘI FIZIOLOGO-BIOCHIMICE ALE TULPINII A *NIGER* CNMN FD 06

Conține rezultatele cercetărilor de valorificare a microorganismelor ca surse de substanțe biologice active, date privind selectarea și studierea tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 06 cu însușiri productive majore, introducerea acesteia în cultură ca obiect de perspectivă pentru biotehnologiile moderne. Este prezentată descrierea procesului de stabilire a particularităților morfo-culturale și fiziologo-biochimice a tulpinii în studiu cu accent pe cerințele față de mediu de nutriție, în comparație cu alte tulpini de micromicete, modificarea parametrilor de temperatură, pH, particularitățile de dezvoltare în dinamică pe diferite medii de nutriție, aspecte ale variabilității naturale și modul de manifestare a acestora la micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

CAPITOLUL 4. AMELIORAREA POTENȚIALULUI DE BIOSINTEZĂ A COMPLEXULUI AMILOLITIC DE CĂTRE TULPINA DE FUNGI A. *NIGER* CNMN FD 06

Rezultatele unui șir de cercetători confirmă faptul că, problema esențială a utilizării microorganismelor ca obiecte biotehnologice este sporirea capacității lor biosintetice [2-11, 15, 24, 33, 44, 78, 119, 130, 144, 188]. În acest capitol sunt prezentate rezultatele cercetărilor de ameliorare a potențialului biosintetic a tulpinii *Aspergillus niger* CNM FD 06 în trei direcții de bază:

- identificarea mecanismelor de modificare a potențialului de biosinteză, la utilizarea factorilor de natură fizică, prin iradierea cu unde milimetrice de intensitate joasă;
- stabilirea influenței factorilor chimici - compușilor coordinați ai metalelor de tranziție asupra dinamicii și randamentului de sinteză orientată a enzimelor amilolitice la tulpina în studiu;
- stabilirea influenței nanoparticulelor metalelor Ti, Fe, Cu, Zn, cu structură și dimensiuni diferite, asupra activității amilolitice a tulpinii de fungi miceliali *A. niger* CNMN FD 06 în cultură submersă.

Sunt expuse rezultatele validării pilot a biotehnologiilor avansate de obținere a preparatelor enzimaticke amilolitice în baza tulpinii de fungi miceliali *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

CAPITOLUL 5. PROCEDEE TEHNOLOGICE INOVATIVE DE OBȚINERE A PREPARATELOR ENZIMATICE AMILOLITICE LA CULTIVAREA AVANSATĂ A TULPINII DE MICROMICETE A. NIGER CNMN FD 06.

Regimurile de precipitare și separare a enzimelor din soluții se stabilesc individual, pentru fiecare producător, tip de enzime, caz concret, în funcție de particularitățile tulpinii fungice și complexului enzimatic sintetizat. În acest capitol sunt prezentate rezultatele cercetărilor asupra procedeeleor de recuperare a enzimelor amilolitice și de selectare a condițiilor optime de separare a complexului enzimatic amilolitic din lichidul cultural al tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 06. O bună separare a enzimelor se asigură la precipitarea diferită cu utilizarea solvenților organici, substanțelor stabilizatoare cu concentrații diferite. Conform datelor din literatură [49, 77, 222] pentru sedimentarea complexelor enzimaticke sunt folosiți solvenți sau amestecul acestora: alcool etilic, alcool izopropilic, acetona etc, iar activitatea enzimelor și randamentul lor este puternic influențat de valoarea pH-ului mediului de reacție, temperatură și durata contactului cu solvenul.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI conțin rezultatele lucrării, formulate concis și reflectă rezultatele științifice principale care au contribuit la soluționarea problemei științifice (aspect teoretic și aplicativ), originalitatea științifică și valoarea practică a cercetărilor.

BIBLIOGRAFIA include 223 de surse care au servit în expunere și au fost citate în teză.

Compartimentul **ANEXE** include copiile titlurilor de brevet de invenție, actele de implementare a rezultatelor obținute, copiile diplomelor și medaliilor obținute în cadrul expozițiilor și saloanelor internaționale de invenții.

1. ASPECTE GENERALE PRIVIND ENZIMELE AMIOLITICE, PRODUCĂTORII PERSPECTIVI ȘI METODE DE SINTEZĂ ENZIMATICĂ AMELIORATĂ

Tehnologia enzimelor este un domeniu interdisciplinar recunoscut de Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (OCDE) ca o componentă importantă de dezvoltare industrială durabilă. Tratarea cu preparate enzimatică se utilizează pe larg în majoritatea proceselor tehnologice de prelucrare a materiei prime vegetale în scopul sporirii randamentului produselor finale, perfecționării proceselor tehnologice și dezvoltării tehnologiilor prietenoase mediului.

Aplicațiile industriale ale enzimelor reprezintă inima biotehnologiilor moderne, care nu pot fi concepute astăzi fără valorificarea, în continuă expansiune, a microorganismelor în calitate de biocatalizatori cu proprietăți îmbunătățite sau noi [1, 8, 9, 15, 45, 46, 49, 56, 136-137, 165, 206].

1.1. Caracteristica complexului enzimatic amilolitic

Amilazele (EC 3.2.11, 3.2.12, 3.2.13) reprezintă o familie de enzime din clasa hidrolazelor care degradează amidonul și polimerii înrudiți, generând diverse produse fine, inclusiv dextrine și polimeri mai mici alcătuiți din unități de glucoză [40, 45, 46, 49, 148, 161].

În conformitate cu clasificarea modernă amilazele, aderate la subclasa Carbohidrazelor (KФ 3.2) - una din subclasele cu multiple aplicări în industrie și medicină [37, 45-46, 75, 148], hidrolizează legăturile α -1,4- și/sau α -1,6 -glucozidice în amidon, glicogen, în poli- și oligozaharidele înrudite. Fiind biocatalizatori de natură organică cu structură complexă și specificitate largă față de substrat, amilazele asigură consecutivitatea transformărilor biochimice a amidonului, glicogenului și a derivaților lor în celulele vii. Aceste enzime sunt de mare importanță în biotehnologia actuală datorită ariei extinse de aplicare potențială, de la alimentație, fermentație, subțierea și lichefierea amidonului în alcool, fabricarea berii și zahărului, industria textilă și a hârtiei până la sectorul farmaceutic, medical și clinic [103]. Deși amilazele provin din surse diferite (plante, animale și microorganisme), amilazele microbiene sunt cele mai produse și utilizate în industriile moderne [121].

Complexul amilolitic include enzimele individuale α -amilaza (EC 3.2.1.1), β -amilaza (EC 3.2.1.2), glucoamilaza (EC 3.2.1.3), oligo - 1,6 - glucozidaza (EC 3.2.1.10), dextrin - 1,6 - glucozidaza (EC 3.2.1.33), pullulanaza (EC 3.2.1.41) și izoamilaza (EC 3.2.1.68) [64, 110,111].

După însemnătatea practică în prim plan se evidențiază α -amilaza (1,4 - α - D - Glucan glucanohidrolaza), β -amilaza - (1,4 - α - D - Glucan maltohidrolaza) și glucoamilaza - (Glucan 1,4 - α - glucohidrolaza), având structuri spațiale diferite (Fig 1.1).

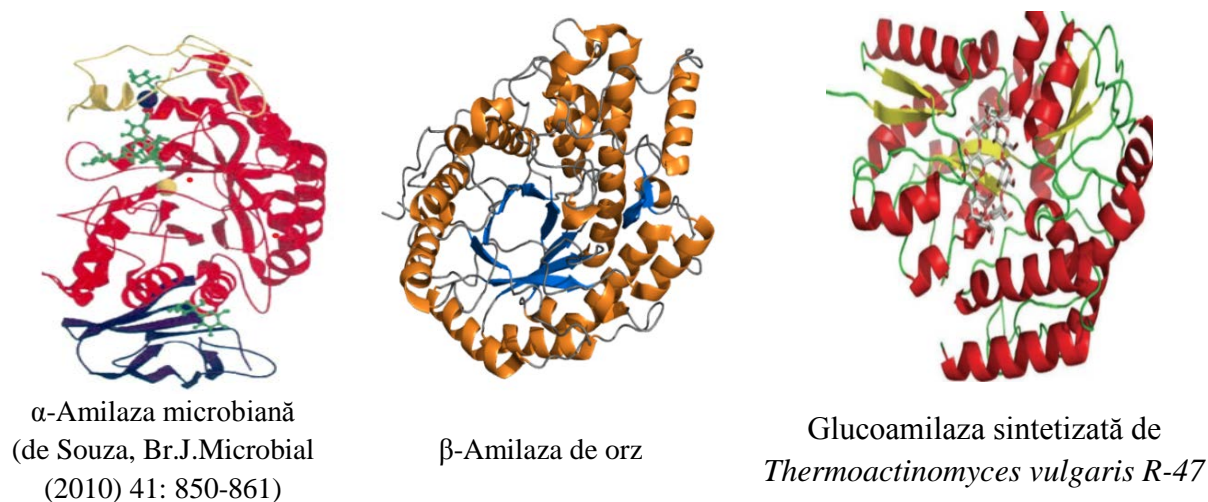


Fig. 1.1. Structura α -amilazei, β -amilazei și glucoamilazei

Adaptat de autor, sursa: <https://en.wikipedia.org/wiki/Amylase>

α -Amilaza (1,4 - α - D - Glucan glucanohidrolaza, EC 3.2.1.1) este cea mai importantă enzimă de degradare a carbohidraților pentru toate industriile pe bază de amidon și anume: industria alimentară, farmaceutică, textilă, de panificație și de bere, obținerea hârtiei, detergentilor [148].

După modul de a ataca substratul α -amilaza este o endoenzimă care haotic rupe legăturile intramoleculare α -1,4 glucozidice din substrat, cu formarea unei cantități esențiale de α -dextrine liniare și ramificate cu masă moleculară mare (conțin 6-13 resturi glucozidice și dextrine-limită cu o cantitate mare de legături α -1,6). Din acest motiv α -amilazele sunt numite dextrinogene sau de lichefiere. Sub o altă denumire originală - *diastaza*, α -amilaza a fost prima enzimă detectată, izolată și științific studiată de către remarcabilul savant rus K.C. Кирхгоф (1814) și mai târziu de francezii A. Payen și Pers, (1833) [85]. Enzima a fost numită α -amilaza de către Kun (1924) astfel cum la acțiune asupra amidonului eliberează glucoza în forma α -mutomeră. α -Amilazele sunt bogate în tirozină și triptofan, sunt proteine active, solubile în apă, soluții de săruri și alcool etilic. Masele moleculare (M.m.) a α -amilazelor fungice și bacteriene puțin variază și sunt cuprinse în limitele 50000 - 60000 dalton (Dal), excepție prezentând α -amilaza sintetizată de *Bacillus macerans* cu M.m. de 130000 Dal [56]. α -Amilazele se întâlnesc frecvent la fungii microscopici și bacterii, fiind sintetizate de unii reprezentanți în cantități mari ca exoenzime. α -Amilazele microorganismelor, ordinar, manifestă activitate catalitică în mediu slab acid la pH 4,5-4,7. Totodată, în complexe amilolitice sintetizate de aspergillii negri se conține α -amilaza stabilă în mediu extrem de acid cu pH-ul 2,0-2,8. α -Amilazele de origine fungică, atât acid-

labile, cât și acid-stabile manifestă viteză maximă de hidroliză a substratului în mediu mai acid în comparație cu α -amilazele sintetizate de bacterii. Masa moleculară a α -amilazei fungice acid-stabile este de 58000 Dal, iar a α -amilazei acid-labile 51000 Dal [49].

Toate α -amilazele cunoscute sunt metaloenzime și conțin în calitate de cofactor catalitic și stabilizator al activității enzimaticice ionul de Ca^{2+} (de la 1 până la 30 gram-atom de Ca^{2+} la o moleculă de enzimă). A fost demonstrat că toate α -amilazele, indiferent de origine, fungică sau bacteriană, conțin cel puțin 1 gram-atom de Ca^{2+} la o moleculă de enzimă. La înstrăinarea totală a Ca^{2+} din moleculă, enzima își pierde complet capacitatea de a hidroliza substratul. Ionii de Ca^{2+} conferă stabilitate macromoleculei de α -amilază, consolidându-le suprastructura. Prin ei se stabilizează structura secundară și terțiară a proteinei și enzima devine rezistentă la denaturarea prin căldură, pH și uree. α -amilaza din mucegaiuri fixează Ca^{2+} foarte puternic, încât acesta nu poate fi îndepărtat nici prin dializă îndelungată față de EDTA, iar α -amilaza din malț pierde ușor ionii de Ca^{2+} prin dializă. Prin îndepărtarea ionilor de Ca^{2+} α -amilaza se inactivează [121].

Totodată α -amilaza se caracterizează prin termostabilitate mai înaltă în comparație cu alte tipuri de amilaze, fapt atribuit de către cercetători conținutului sporit de Ca^{2+} în moleculă. Cele mai termostabile sunt α -amilazele produse de bacterii, urmate de cele din malț, apoi cele fungice. Avantajele α -amilazelor termostabile sunt determinate de capacitatea de a hidroliza substraturile la temperaturi mai crescute de 70°C [121]. Un bun producător de α -amilaze termostabile este cultura bacteriană *Bacillus stearothermophilus*, care posedă și activitatea de lichefiere a amidonului mai superioară decât a amilazelor din malț și a celor fungice [10].

β -Amilaza (α -1,4-glucan - maltohidrolaza, 3.2.1.2.) - exoferment care manifestă afinitate către penultima legătură α -1,4 a terminalului nealdehidic al sectoarelor liniare din moleculele de amiloză și amilopectină cu acumularea în mediul de reacție a unităților de β -maltoză și de maltotrioză [45, 64].

Centrul catalitic al β -amilazei conține grupele sulhidrilice, carboxilice și ciclul imidozolic al radicalului de histidină. Spre deosebire de α -amilază, β -amilaza nu hidrolizează amidonul nativ și manifestă stabilitate înaltă în lipsa ionilor de calciu. β -Amilaza este rezistentă la aciditatea sporită, astfel, la incubare, timp de 4 ore, la pH 4,2 și 20°C α -amilaza se inactivează complet, pe când β -amilaza, în aceste condiții, nu suferă schimbări. În practică această însușire se utilizează pentru separarea β -amilazei de α -amilază. pH-ul optim de activitate al β -amilazei este 5,2, iar pH-ul de stabilitate maximă 4,5-8,0. β -Amilaza este afectată de temperaturile ridicate. Pentru separarea α -amilazei de β -amilază în extrasul de malț se adaugă 0,2% de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ și se încălzește la 70°C , timp de 15 min. Sarea de Ca^{2+} adăugată protejează α -

amilaza de inactivare. Ambele forme de amilază conțin o grupă sulfhidrică (-SH) la o moleculă de enzimă și 1-10 g atomi de Ca^{2+} /mol enzimă [64, 75, 96].

Glucoamilaza (α -1,4-glucoan glucohidrolaza) este o enzimă cu acțiune exogenă asupra substratului, care catalizează scindarea consecutivă a rămășițelor de D-glucoză a terminalelor nereducătoare ale lanțului polizaharidic cu eliberarea glucozei, manifestă afinitate către legăturile α -1,6 din polizaharidele ramificate (amilopectină, glicogen, β -dextrine), hidrolizându-le cu aceeași viteză ca legăturile α -(1-4), fiind capabilă de a hidroliza legăturile α -(1-2), și α -(1-3). Conform datelor din literatură enzima se întâlnește în toate obiectele biologice și este cunoscută sub diferite denumiri - γ -amilaza, amiloglucozidaza, exo- 1,4- α -glucozidaza [45, 49, 64, 85].

Glucoamilaza este sintetizată de multe microorganisme și de plante. Masa moleculară a glucoamilazelor fungice constituie 97000 Dal. Structura terțiară a proteinei este stabilizată de 6 grupe sulfhidrilice (-SH) și 4 legături disulfidice (-S-S-). Studiul nivelului supramolecular de organizare a glucoamilazei a arătat prezența structurii cuaternare, constituită din două subunități identice catalitic active cu Mm de 53600 Dal fiecare [81]. Se disting două tipuri de glucoamilaze - acide cu optimul activității la pH-ul 4,8 și neutre cu valoarea optimă a pH-ului de activitate 6,5-7,2, sintetizate mai frecvent de levuri. Glucoamilazele de origine fungică au optimul de activitate la pH-ul 4,5-5,0 și temperatura de 45⁰C.

Mecanismele de acțiune enzimatică caracteristice, implicit și pentru amilaze, sunt explicate, în general, prin două ipoteze:

1) Mecanismul „lacăt-cheie”, propus de Fischer (1894), care susține că, atât un substrat cât și o enzimă prezintă forme geometrice specifice care se potrivesc. Acesta specifică faptul că situs-ul activ al unei enzime are o conformație unică și este complementar structurii substratului (cheia) și, prin urmare, permite celor două molecule să se potrivească [166]. Conform acestui model, structurile manifestă rigiditate, rămânând fixate pe tot parcursul procesului de legare [64].

2) Mecanismul ajustării induse, propus de Koshland (1958), care aduce unele modificări în ipoteza mecanismului „lacăt-cheie” și sugerează că, grupările funcționale esențiale pe situs-ul activ al enzimei libere nu sunt în pozițiile lor optime pentru desfășurarea catalizei. Deoarece enzimele sunt destul de flexibile, atunci când molecula de substrat se leagă de acestea, situs-ul activ al enzimelor adoptă o formă geometrică favorabilă pentru a forma starea de tranziție. Deci, conform sugestiei Koshland, substratul induce o modificare conformațională a enzimelor care aliniaza reziduurile de aminoacizi sau alte grupări pentru legarea și cataliza substratului [64].

Drept urmare, Kuddus, (2018) [165] expune algoritmul mecanismului de cataliză a substratului de către enzime în următoarele etape:

- a) molecula de substrat intră în contact cu locul activ al enzimei prin legături necovalente. Situs-ul activ este regiunea enzimei care se combină cu substratul;
- b) substratul și enzima formează un complex enzimă-substrat (ES);
- c) molecula de substrat este transformată într-un produs de reacție fie prin rearanjarea atomilor, fie prin descompunerea substratului sau îmbinarea acestuia cu altă moleculă;
- d) desfacerea complexului enzimă-substrat (ES) duce la formarea produsului de reacție, care este eliberat de situs-ul activ al enzimei;
- e) natura enzimei este neschimbată și poate cataliza o nouă reacție.

Pentru amilaze substratul natural este amidonul, glicogenul și produsele degradării lor parțiale. Structura grăuncioarelor de amidon rămâne obiect de studii și acest fapt crează dificultăți la studierea mecanismului de acțiune a amilazelor asupra granulei întregi de amidon, moment important pentru utilizarea practică a enzimelor. De remarcat că, mecanismul de acțiune al amilazelor poate fi influențat de natura substratului și de însușirile amilazelor.

În literatura de specialitate [73, 187] sunt expuse două ipoteze asupra mecanismului acțiunii amilazelor. Prima presupune că amilazele acționează conform mecanismului în lanț, formând complexul intermediar „enzimă-substrat” prin asimilarea capătului neredus al lanțului (fig.1.2.b). Mișcarea ulterioară a enzimei pe acest lanț are loc conform mecanismului de pluriatac (fig. 1.2.a și 1.2.c), adică enzima formează un complex cu molecula substratului apoi, peste câteva etape, acest complex se dezintegrează și enzima se leagă cu o altă moleculă din substrat. β -amilaza, ca rezultat, eliberează o moleculă de maltoză, iar glucoamilaza - o moleculă de glucoză [189].

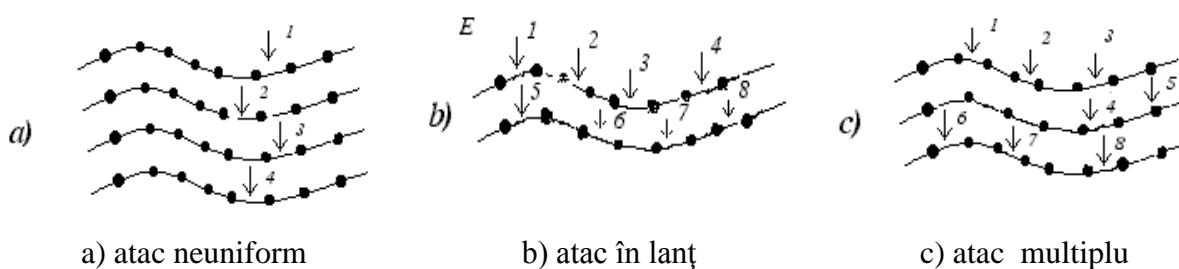


Fig. 1.2. Modelul ipotetic al mecanismului de acțiune al amilazelor asupra polizaharidelor

[preluat: <http://www.scribube.com> > Amidonul, glucoza, zaharul, mierea de albine]

Astfel, mecanismul acțiunii amilazelor favorizează utilizarea enzimelor complexului amilolitic în producerea hidrolizatelor de amidon, berii, alcoolului, sucurilor și conservelor din fructe și legume, în vinificație, în panificație, la fabricarea detergenților, industria textilă, zootehnie [46, 64, 85, 97, 116, 139, 166, 187, 201]. Pe larg se utilizează amilazele înalt purificate în medicină, ca remedii medicamentoase, la tratarea bolilor tractului gastro-intestinal etc. În cercetări științifice amilazele cu grad înalt de purificare se folosesc la cercetarea topografiei

centrului activ și mecanismului de acțiune al acestui grup de fermenți, cât și în studierea însușirilor fizico-chimice caracteristice metaloenzimelor [189, 195].

1.2. Fungii miceliali ca producători efectivi și de perspectivă ai complexului amilolitic

Enzimele amilolitice prezintă unul din cele mai răspândite complexe enzimatică din natură, fiind identificate la animale, ciuperci, plante, eucariotele unicelulare, bacterii și arhee. Cele mai importante surse de amilaze din lumea vegetală prezintă grupa cerealielor, boabele cărora, în deosebi în stare germinată, conțin cantități semnificative de amilaze și se utilizează ca surse de amilaze în producerea alcoolului. Amilazele malțului din orz au rol principal în tehnologia producerii de bere, amilazele făinei de grâu și seară - în tehnologia produselor de panificație.

Surse bogate de α -amilaze sunt suc pancreatic, pancreasul și saliva unor animale omnivore și rozătoare. Cea mai activă este amilaza din saliva omului. La animale primul loc după activitate îl ocupă amilaza pancreasului de porc, care servește drept materie primă pentru fabricarea preparatelor de amilază pancreatică, pe larg utilizate în medicină, pH-ul optim de acțiune al amilazelor pancreatice este 6,8. Amilazele de origine animală sunt activate de ionul de Cl⁻. Amilazele din semințele germinate și din culturile de mușgaiuri nu necesită ionul de Cl⁻ pentru activare [45]. Nerentabilitatea amilazelor de origine animală este motivată de randamentul produsului finit, care constituie 5-6% față de pancreasul proaspăt, proprietățile fizico-chimice variabile, tehnologia de extragere destul de complicată și, respectiv, prețul de cost foarte înalt al preparatelor obținute [46].

Deși plantele și animalele produc amilaze, în procesele industriale sunt utilizate enzimele din surse microbiene datorită unor factori importanți ca: productivitatea, stabilitatea termică a enzimei, precum și tehnologiile simple de cultivare a microorganismelor [1, 14, 25, 46].

Microorganismele, ca orice organisme vii, sunt sisteme specifice, complex organizate, dotate cu continuitate genetică, deci cu capacitatea de a se reproduce independent. În cazul în care sunt aprovizionate cu hrană ele își sintetizează constituenții proprii, folosind pentru aceasta energia eliberată din degradarea enzimatică a substratului lor nutritiv. Prin urmare microorganismele sunt capabile de o activitate fiziologică neîntreruptă, mai mult sau mai puțin intensă, în cursul căreia cresc, se divid și își modifică structura, compoziția chimică, poziția în mediu etc. [49, 50, 56, 64, 85, 177].

Microorganismele, în principal fungii și bacteriile, mai rar drojdiile, prezintă una din cele mai importante surse pentru obținerea preparatelor enzimatică, deoarece pot sintetiza selectiv și dirijat componenții complexului amilolitic: α -amilaza, β -amilaza și glucoamilaza [166].

Levurile, în calitate de perspectivii producători ai complexului amilolitic, au fost studiate de un șir de autori ca: Stepanov și col., (1999) [90], care face cercetări privind reglarea biosintezei enzimelor amilolitice de către *Endomycopsis fubuliger 20-9*, Wilson ș.a. (1982) izolează și caracterizează complexul amilolitic sintetizat de *Schawanniomyces alluvius*, Tubb R. (1986) caracterizează levurile amilosintetizatoare cu aplicație comercială, Mot și Verachtert (1986) descriu procesul de enzimogeneză a amilazelor la diferite specii de drojdii așa ca: *Filobasidium capsuligenium* (1985), *Trichosporon pullulans* (1986), *Candida antarctica CBS* (1987), Kelly și col. (1985) prezintă capacitatea de sinteză a α -amilazei termostabile de către *Lipomyces starkeyi*. Linardi și Machado, (1990) [169] prezintă rezultatul screening-ului a 228 de specii de levuri izolate din medii naturale: rezultate superioare au prezentat speciile *Aureobasidium pullulans*-100 AA/ml, *Candida famata* -162 AA/ml și *Candida kefir* - 128 AA/ml [169, 203].

Totuși cele mai avantajoase surse de amilaze prezintă bacteriile și fungii miceliali. Aceste microorganisme întrunesc înalte însușiri tehnologice și economice, asigurând, la cultivarea în condiții controlate, biosinteza întregului complex de amilaze, în scurt timp și în cantități considerabile [56, 64, 68, 79].

Selectarea unor tulpini noi de microorganisme producătoare de enzime, cu productivitate înaltă e dificilă, deoarece majoritatea metodelor de cercetare microbiologică nu sunt perfecte, mediile nutritive nu corespund cerințelor respective, identificarea culturilor necesită un volum mare de muncă [31]. Conform datelor din literatură producătorii de amilaze, pe medii ce conțin inductori (amidon, dextrine, lactoză, tărâțe de grâu și orz, făină de porumb etc.), manifestă maximul sintezei enzimatică la a 3-ea - 6-a zi de cultivare. Prin cercetări multiple este constatat, de asemenea, că majoritatea fungilor miceliali intensiv sintetizează amilaze la valoarea pH-lui 4,5-5,0 [172, 177, 195].

Multiple cercetări au raportat că, amilazele sunt produse de o serie de ciuperci, inclusiv *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Thermomucor bazidiomicet*, *Fomitopsis*, și *Thermomyces* [1, 25, 41, 59, 64, 85, 104, 110, 122, 141, 176]. Superioritatea amilazelor microbiene constă în activitatea lor înaltă și specificitatea largă de substrat. Datorită acestor performanțe amilazele microbiene, în ultimele decenii, pe larg se aplică în perfecționarea multor procese tehnologice, substituind consecvent amilazele de provenință vegetală și animală.

Față de preparatele enzimatică amilolitice de origine vegetală, obținute din malț și față de cele de origine animală, obținute din pancreas, preparatele enzimatică microbiene prezintă mai multe avantaje:

- sunt mai ieftine, deoarece se prepară din materii prime care sunt subproduse ale industriei alimentare: tărâțe de grâu, extract de porumb, melasă etc., la care se adaugă uneori și mici cantități de săruri nutritive care sunt de asemenea ieftine, iar prețul de cost, la care se pot obține, le face competitive cu produsele similare din alte surse;
- se pot produce în cantități nelimitate, fabricarea lor nefiind legată de cantitatea de materie primă disponibilă;
- în funcție de specia de microorganisme se pot obține preparate enzimatiche amilolitice care corespund mai bine diferitor scopuri practice;
- în afară de enzimele amilolitice, în dependență de scop, pot fi extrase și alte enzime hidrolitice: carboxilesteraze, fosfoesteraze, sulfataze, nucleotidaze, hemicelulaze, celulaze și desigur enzime proteice;
- randamentul de producere enzimatică a microorganismelor poate fi mărit prin selectarea mediului de nutriție, prin obținerea de mutanți înalt productivi, prin inducție și influență asupra condițiilor de biosinteză.

Pentru biosinteza industrială se utilizează microorganisme selecționate, înalt producătoare de α -amilază. Printre bacterii, în calitate de buni producători, se pot remarca cele din genul *Bacillus* și *Streptomyces*, așa ca: *B. macerans* ATCC 8517, *B. stearothermophilus* ATCC 7954, *B. subtilis* sp., *B. amyloliquefaciens* ATCC 15841, *B. subtilis* NRRL B-3411, *B. licheniformis* NCIB 8059, ATCC 6598, 11945, *Bacillus* sp. ATCC 21596, *Bacillus* sp. KCA102, *S. tosaensis* ATCC 21723, *S. albus* ATCC 21725 [10, 14, 75, 77, 79, 95, 101, 157, 162].

Producători buni de amilaze sunt recunoscuți fungii microscopici din genurile *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. flavipes*, *A. ochraceus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. terreus*), *Rhizopus* (*R. delemar*, *R. niveus*), *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. fenicullosum*, *P. notatum*), pentru care se menționează metabolismul deosebit privind capacitatea de a metaboliza o gamă largă de diverse substraturi, reprezentate adesea de subproduse sau reziduuri industriale, potențialul înalt și caracterul adaptiv de biosinteză, ritmul rapid de multiplicare și consumul relativ mic de energie [49, 56, 59, 73, 75, 123].

În industriile moderne în calitate de principali producători ai enzimelor amilolitice sunt utilizate tulpinile *A. niger* ATCC 10864, 15475, *A. niger* FAB-211, *A. oryzae* ATCC 1011, 10196, 11488, 11491, 11601, 12892, 14156, 14605, *A. alliaceus* ATCC 10060, *A. awamori*, *Paecilomyces subglobosus* ATCC 16493, *R. oryzae* ATCC 12883 [64, 79-81, 96, 114]. Producătorii industriali se caracterizează prin diferită capacitate de sinteză a complexului amilolitic integrat sau una din componentele acestuia în dependență de tulpina fungică și

condițiile de cultivare. Studiile arată că, frecvent formele industriale ale amilazelor sunt obținute cu utilizarea micromicetelor din genul *Aspergillus*. Fungii microscopici din genul *Aspergillus* ca producători de amilaze se cunosc relativ demult. Pentru prima dată Atchinson în 1881, apoi Kelner, Modi și Nagoca în 1890 au descris capacitatea tulpinii fungice *A. oryzae* de a descompune amidonul [85, 142]. Reprezentanții acestui gen după natura pigmentării se subdivizează în aspergili negri și galben - verzi.

A. niger este unul dintre cele mai importante microorganisme utilizate în biotehnologie, fiind folosit deja de multe decenii pentru a produce enzime extracelulare (alimentare) și acid citric. Aspergili negri se caracterizează printr-un spectru mai larg de informație genetică în ce privește biosinteza enzimelor hidrolitice (proteaze, celulaze, pectinaze, nucleaze etc). În plus, *A. niger* este folosit pentru biotransformări și tratarea deșeurilor [153, 171]. În ultimele două decenii, *A. niger* a fost dezvoltat pentru potențialul de sinteză a enzimelor alimentare. Aspergili negri sunt utilizați pe scară largă, datorită capacităților lor de sinteză a metaboliților celulari: enzime extracelulare și acizi organici, care sunt utilizați în prelucrarea alimentelor și în producerea alimentelor tradiționale, în special în Orient. Produsele sintetizate de tulpini de *A. niger* dețin statutul GRAS (General Recognized As Safe) [206].

Unii reprezentanți ai aspergililor negri, așa ca: *A. niger*, *A. batatae*, *A. usarii*, *A. awamori* la cultivare submersă sintetizează α -amilaza, glucoamilaza și transglucozidaza [56, 64, 75, 85, 148].

Majoritatea culturilor care se referă la aspergili galben-verzi, așa ca: *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. glaucus*, *A. ochraeus*, *A. nidulans*, *A. fumigatus* și alte specii produc α -amilază, iar glucoamilaza și transglucozidaza în cantități infime [75]. În Japonia pentru producerea glucoamilazei se cultivă *A. awamori* var. *Kawachi*, care sintetizează pe substratul cu amidon complexul amilolitic format din α -amilaza-14-20 U/g, dextrinază 8000-1000 U/g, glucoamilază 120-150 U/g [81, 146, 176].

Referitor la α -amilaza, sintetizată în condițiile cultivării submerse a fungilor din genul *Aspergillus*, indicii din literatură atenționează asupra existenței a două forme de α -amilază:

- α -amilază aspergililor verzi - galbeni: grupul *flavus* - *oryzae* produc forme acid-labile;
- α -amilaza aspergililor negri, grupul *niger*, produc forme acid-stabile, care în condițiile pH 2,5 timp de 30 de minute își păstrează 90% din activitatea inițială;
- α -amilaza acid-stabilă are aminoacid N-terminal alanina, iar α -amilaza acid-labilă - leucină. Ca aminoacizi C-terminali α -amilaza acid-labilă posedă serină, glicină, alanină, iar α -amilaza acid-stabilă- valină;

- α -amilaza acid-stabilă produsă de *A. niger* conține 24 moli de manoză și 4 moli de hexozamină pe 1 mol de enzimă, în timp ce α -amilaza *A. oryzae* nu conține resturi de
- carbohidrați [137, 161].

În prezent microorganismele cele mai folosite pentru producerea de preparate enzimaticice amidolitice și, în general, pentru alte preparate enzimaticice hidrolitice sunt speciile de mucegaiuri *A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. terricola*, *A. flavipes*, diferite specii de *Penicillium*, *Rhizopus* și *Mucor* și bacteriile speciei *Bacillus*: *Bacillus sp.*, *B. subtilis* și *B. licheniformis* [10, 14, 15, 36, 39, 44, 59, 64, 73, 77, 79, 81, 95, 103, 110].

Dintre α -amilazele fungice și bacteriene interes practic sporit prezintă patru α -amilaze: α -amilaza produsă de *B. subtilis* cu optimul pH de activitate 6,0, α -amilaza *A. oryzae* cu optimul pH de activitate 4,7, α -amilaza bacteriilor termofile și α -amilaza acid-stabilă sintetizată de *Aspergillus niger*.

Ultimele două forme de α -amilaze susțin temperatura de 70-75°C și aciditate sporită, pH 2,5-3,0 practic fără pierderi în activitate. Între timp alte α -amilaze, cunoscute în condițiile menționate, complet și fără restabilire își pierd însușirile catalitice.

Sistemele enzimaticice hidrolitice ale diferitor specii de mucegaiuri diferă între ele foarte mult, atât prin natura enzimelor pe care ele le pot elabora, cât și prin coraportul dintre diferite enzime, unele enzime fiind sintetizate în cantități mult mai mari decât altele [56, 96]. Diferența în sinteza enzimelor există chiar și în cadrul speciilor. Acest fapt a fost demonstrat experimental de datele prezentate în literatura de specialitate [25, 86, 148, 203] în procesul screeningului prin analiza comparativă a activității amidolitice la diferite tulpini.

În cazul utilizării fungilor în calitate de producători de enzime este important să ținem cont de faptul că pentru fungi, ca și pentru alte microorganisme, este caracteristică variabilitatea naturală, care condiționează adaptarea organismului la condițiile de mediu [6, 9] care, la rândul ei, complică lucrul de cercetare și diminuează eficiența utilizării microorganismelor în producere, datorită înlocuirii variantelor active prin cele ne active sub acțiunea factorilor selectivi ai mediului [14, 17, 41, 79]. Variabilitatea naturală poate duce la pierderea proprietăților biosintetice prețioase și degenerării tulpinii, cât și la asigurarea posibilității de selectare a celor mai active variante din populații [105].

Mecanismul disocierilor pe subpopulații are la bază transformări intergenotipice reversibile. După datele din literatură [79] la bacterii disocierea constituie existența asociativă în populații a celulelor, care la divizarea ulterioară generează variante ce se deosebesc după particularitățile morfologice, fiziologo-biochimice și genetice, cât și prin capacitatea de a se modifica cu intensitatea de 10^{-2} - 10^{-4} la o divizare celulară. Aceasta determină modificarea multor

proprietăți morfologice și fiziologo-biochimice a celulei: producerea hidrolazelor extracelulare și eficiența degradării biopolimerilor, capacitatea de a sintetiza compuși biologic activi, rezistența la influența factorilor externi [59].

Schimbările fenotipului la microorganismele cu același genotip (variabilitatea naturală) au loc sub influența anumitor factori de mediu sau stresorici și se păstrează pe perioada acțiunii acestor factori. Modificările nu acționează asupra genotipului, nu se moștensec, dar se controlează și se limitează de către genotip. Particularitățile morfo-culturale apărute la variabilitatea naturală pot fi păstrate în generații o oarecare perioadă de timp. Durata păstrării modificărilor este condiționată de faptul că celulele-fiice în procesul înmulțirii nu transmit doar structurile moștenite, dar și produsele schimbului de substanțe a celulei [59]. Aspectele variabilității naturale apărute sub influența factorilor de mediu nu au o importanță cardinală în evoluția microorganismelor, dar asigură variabilitatea populațiilor de microbi în condițiile variabile ale mediului înconjurător [6, 86, 122].

Identificarea, selectarea și menținerea modificărilor pozitive îndelungate permit de a spori eficiența proceselor enzimactice industriale realizate de microorganismele. Totodată, în condițiile naturale procesul de disociere asigură adaptarea populațiilor microbiene la condițiile de mediu și lărgeste hotarele de supraviețuire a speciei [6, 42].

Cele relatate argumentează importanța studierii variabilității naturale la tulpinile fungice - producătoare de enzime, în particular la tulpina în studiu. Variabilitatea naturală în cadrul populațiilor de microorganismele generează apariția în colonii a variantelor morfologice noi. Mulți autori susțin că acest proces la microorganismele are importanță adaptivă [6, 42] și se manifestă mai accentuat decât la organismele superioare reieșind din perioada scurtă de generație, mutații frecvente, recombinări și schimb de material genetic.

Principiile și metodele de bază de selecție și apreciere a stabilității tulpinilor de funghi de importanță industrială utilizate în procesul lucrului experimental sunt:

1. analiza culturilor prin utilizarea diferitor medii nutritive agarizate;
2. evaluarea comparativă a tulpinilor, obținute prin inocularea din diferite colonii separate morfologic din cultura paternă (metoda Das Gupta);
3. metoda citologică (metoda Mațhevici, 1981).

Utilizarea acestor metode permite de a separa și caracteriza variantele spontan apărute, de a determina condițiile de stabilizare și menținere a activității producătorului, precum și particularitățile lui cultural morfologice și biochimice.

Progresele remarcabile realizate de enzimologie, în cunoașterea căilor de sinteză și de degradare a substanțelor organice de către materia vie, au permis numeroase aplicații practice ale fermenților în domenii de activitate diferite [37].

Diapazonul larg și necesitatea extremă a amilazelor fungice și bacteriene în diferite ramuri industriale și medicină crează deficit nu numai a preparatelor tehnice, dar și a celor cu grad de purificare înalt, a formelor omogene de amilaze. Tratarea cu preparate enzimatică se utilizează pe larg în majoritatea proceselor tehnologice de prelucrare a materiei prime vegetale (fructelor, legumelor, strugurilor, a produselor cerealiere, biomasei plantelor medicinale și eterooleaginoase, etc.) în scopul sporirii randamentului produselor finale, extinderii sortimentului și îmbunătățirii calității lor, perfecționării proceselor tehnologice, creării tehnologiilor cu volum redus de deșeuri sau fără deșeuri [140, 141, 166]. Enzimele complexului amilolitic se utilizează pe larg în producerea hidrolizatelor de amidon, berii, alcoolului, sucurilor și conservelor din fructe și legume, în vinificație, în panificație, la fabricarea detergenților, industria textilă, zootehnie. Pe larg se utilizează amilazele înalt purificate în medicină ca remedii medicamentoase la tratarea bolilor tractului gastro-intestinal etc. În cercetări științifice amilazele cu grad înalt de purificare se folosesc la cercetarea topografiei centrului activ și a mecanismului de acțiune al acestui grup de fermenți, cât și în studierea însușirilor fizico-chimice caracteristice metaloenzimelor [103, 107, 110].

Reieșind din cele expuse studierea proprietăților biochimice a preparatelor amilolitice și elaborarea bazelor științifice a regimurilor utilizării lor în procesele tehnologice este o problemă actuală atât în plan teoretic cât și practic.

Mai perspective pentru economia națională a Republicii Moldova sunt elaborările de obținere și utilizare a enzimelor amilolitice de natură microbială, datorită spectrului larg de utilizare, acțiunii de intensificare a proceselor de producere, îmbunătățirea calității produselor finite. Cultivarea microorganismelor-producători în Moldova poate fi realizată pe substrat ieftin și accesibil, în special valorificând deșeurile producției agricole, care se acumulează anual circa 2 mln. tone, asigurând astfel redresarea situației ecologice din țară. Trebuie de menționat că, reieșind din capacitatea lor de a se biodezintegra, enzimele sunt produși ecologic puri [70].

1.3. Sinteza orientată a complexului enzimatic amilolitic de către micromicete

Din cele expuse deducem că, surse avantajoase de amilaze sunt recunoscuți fungii miceliali, caracterizați prin capacitate de a produce în cantități semnificative o gamă largă de amilaze exocelulare, manifestă receptivitate înaltă la schimbările condițiilor de cultivare ce creează o platformă perfectă de dirijare a proceselor biosintetice în vederea sporirii activității enzimatică.

Totodată stabilitatea enzimelor este un factor deosebit de important care trebuie luat în considerare odată cu administrarea acestora în procesul tehnologic. Reacțiile enzimatice sunt influențate de factori precum: prezența și concentrația enzimei și a substratului, nivelul pH-ului, temperatura, presiunea, prezența inhibitorilor și a activatorilor [112, 116, 128, 139, 165].

Pentru selectarea tulpinii fungice care să producă enzimă sau sistemul enzimatic dorit, ne vom ghida de aspectele elucidate de Zarnea G. în *Biotehnologia preparatelor enzimatice microbiene* (1980) [49] și anume: trebuie să se testeze dacă microorganismul metabolizează substanța biologic activă, nu manifestă putere patogenă, nu elaborează micotoxine, să nu posede potențial alergen, să producă cu precădere și în cantități mari enzima sau complexul enzimatic dorit, să se dezvolte autoprotejat pe medii de cultură ieftine, procesul de dezvoltare și biosinteza a enzimelor să dureze cât mai puțin etc. [49, 50].

Tulpinile de microorganisme special selectate trebuie să posede proprietăți fiziologice-biochimice atractive: activitate fermentativă înaltă, viteză de creștere mare, stabilitate a proprietăților culturale și biochimice, rezistență la infecții, disponibilitate mică spre disociere cu formare de variante mai puțin prețioase, dar, foarte important, să fie netoxice și ecologice [1, 22, 39, 79, 85, 103, 112, 123].

Creșterea culturilor de microorganisme, producători ai enzimelor amilolitice, se realizează prin două metode: cultivare în suprafață și cultivare submersă. Prin metoda „în suprafață” se produc mai puțin de 10% din preparatele amilolitice comercializate. Prioritate se dă metodei de cultivare submersă, care prezintă un șir de avantaje:

- permite de a obține enzime extracelulare, astfel depășind procesul extragerii acestora din țesuturi;
- putem dirija procesul de sinteză individuală a complexului enzimatic prin modificarea parametrilor de creștere;
- permite planificarea și automatizarea totală a procesului de creștere, simplificarea obținerii enzimelor și posibilitatea creșterii, în flux continuu, a microorganismelor, deoarece pentru obținerea randamentului maximal de enzime important este nu numai de a selecta producătorul activ, dar și de a crea condiții optime de cultivare.

Tulpinile microbiene, susține Cristesco Dumitru în *Bacterii și enzime în biotehnologia țesutului colagenic* (1989) [13], necesită o compoziție a mediului de cultură cu rol triplu, care:

- să asigure necesarul de nutrienți pentru o creștere accelerată și o activitate biologică normală;
- să stimuleze biosinteza enzimelor induse și să crească nivelul enzimelor constitutive;

- să asigure acumularea enzimelor biosintetizate în stare activă sau inactivate reversibil.

Biosinteza amilazelor variază considerabil în funcție de tulpină fungică, de starea fiziologică a microorganismului producător, precum și de parametrii de biosinteză: compoziția mediului nutritiv, caracteristicile fizico-chimice ale mediului: pH, temperatura, rata de aerație, viteza de agitație, durata cultivării etc.

Dintre factorii care influențează modificarea proceselor biologice în celula microbiană remarcabil este mediul nutritiv. Anume compoziția și abundența mediului nutritiv reglează dezvoltarea și activitatea biosintetică a celulei microbiene.

Datele unor savanți Cristescu D., (1989) [13], Zarnea G., (1994) [50] indică asupra faptului că, compoziția mediului de cultură trebuie:

- să asigure necesarul de nutrienți pentru o creștere accelerată și activitate biologică normală;
- să stimuleze biosinteza enzimelor induse și să crească nivelul enzimelor constitutive;
- să asigure acumularea enzimelor biosintetizate în stare activă.

Mediile de cultură utilizate pentru biosinteza enzimelor trebuie să conțină în raport optim sursa de carbon și de azot, care pot juca și rol de inductori ai enzimelor, precursori și cofactori.

Ipoteza creșterii microorganismelor pe medii de cultură ieftine nu a fost justificată, fiind demonstrat faptul că pe medii îmbogățite procesul de biosinteză a enzimelor este mai eficient.

Acest fapt nu exclude utilizarea ca substrat pentru creșterea microorganismelor a deșeurilor industriei alimentare așa ca: tărâțele de orez, făină de porumb și grâu, extracte de porumb și drojdii bogate în compuși organici, care sporesc activitatea enzimatică în lichidul cultural.

Microorganismele pot folosi atât sursele de azot organic cât și mineral. Metabolismul azotului asigură în special sinteza proteinelor, acizilor nucleici și polimerilor peretelui celular. După datele prezentate de Zarnea G., (1994) [50], azotul constituie 10% din masa miceliului uscat. Sărurile minerale din mediul nutritiv determină creșterea intensivă a tulpinilor fungice. Lipsa din mediul de cultură a unor elemente minerale poate modifica brusc schimbul de substanțe din cultură. Astfel, lipsa $MgSO_4$ subminează sinteza α -amilazei, iar cantitatea de glucoamilază sintetizată se micșorează de zeci de ori. Micșorarea concentrației acestei sări, duce la micșorarea sintezei enzimei, concentrația optimală a $MgSO_4$ urmează a fi de 0,05%.

Sinteza amilazelor e favorizată de prezența anionilor acidului fosforic în concentrații de 0,15M. Fosforul acționează asupra multiplicării tulpinilor fungice și altor microorganisme asigurând astfel sinteza enzimelor amilolitice. Viteza de filtrare a mediilor de cultură, după

biosinteza enzimelor, constituie un factor important în fazele de prelucrare pentru obținerea preparatelor enzimatiche purificate. Însăși calitatea enzimelor recuperate este condiționată de compoziția mediului de biosinteză.

Majoritatea studiilor asupra amilazelor fungice se bazează pe mezofile, rareori pe termofile facultative [152, 171]. Este cunoscut faptul că amilazele pot fi sintetizate atât de organisme mezofile cât și de cele termofile. Temperatura optimală pentru mezofili 24-38⁰C, termofili >40⁰C.

Alături de compoziție pentru mediul de cultură, important în procesul de biosinteză este concentrația ionilor de hidrogen și oxigen dizolvat.

Creșterea culturii de microorganisme are loc numai într-un anumit diapazon al pH-ului, determinat de aerație activă și coeficientul de utilizare a substratului de creștere. Schimbarea pH-ului mediului de cultură, în timpul creșterii tulpnilor fungice, depinde de direcția proceselor metabolice, în particular de schimbul energetic și de sursele de nutriție și energie, dacă acestea sunt hidrocarburile are loc acumularea produselor acide ale metabolismului.

În contextul celor expuse remarcăm că mediul de nutriție și condițiile de creștere influențează esențial procesul de enzimogeneză la culturile de microorganisme ceea ce argumentează necesitatea studierii lor și stabilirii parametrilor optimi de cultivare pentru tulpina în studiu.

Una din direcțiile de cercetare este utilizarea undelor electromagnetice în diapazon milimetric. Rezultatele unui șir de cercetători [24, 54, 66, 78, 115, 119, 131, 145] confirmă faptul că, iradierea cu unde milimetrice a culturilor microorganismelor eucariote intensifică creșterea celulelor, micșorează lag-faza, stimulează sinteza enzimelor amilolitice, proteolitice și celulozolitice. D. Ghițu și col., [66] susțin că iradierea obiectelor biologice cu unde milimetrice nu provoacă denaturarea celulelor, dar totodată, în condiții determinate de acțiune, pot influența metabolismul celulei microbiene, inclusiv și sinteza compușilor biologic activi.

Sinteza microbială orientată a substanțelor bioactive la microorganisme este o direcție nouă de cercetare în microbiologie și biotehnologie fondată de academicianul Valeriu Rudic, doctor habilitat, profesor universitar, prin aplicarea ca obiecte biotehnologice a microalgelor și cianobacteriilor, cu utilizarea în calitate de stimulatori a compușilor coordinați ai metalelor de tranziție [7, 18, 29-35]. Această direcție are ca suport concepția științifică conform căreia sinteza substanțelor bioactive se realizează prin reglarea compoziției mediului și a condițiilor de cultivare în corespundere cu specificul activității biosintetice a microorganismelor la diferite etape de creștere și multiplicare [31].

Cercetările au fost extinse și aprofundate și asupra altor microorganisme din diverse grupe taxonomice, inclusiv levuri [47, 48], streptomicete [188] și fungi [8, 9, 11, 15, 16, 39, 41, 117]. O metodă unică de manipulare și dirijare a proceselor biosintetice este aplicarea în calitate de stimulatori a compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție [2, 5, 7, 8, 17, 32, 35, 47, 134].

Nanotehnologia este un domeniu multidisciplinar care poate revoluționa un număr mare de aplicații în diferite arii ale științei și tehnologiei. Nanoparticulele sunt privite ca elemente fundamentale ale nanotehnologiei. Dezvoltarea procesului experimental inspirat biologic pentru sinteza nanoparticulelor evoluează într-o ramură importantă a nanotehnologiei cu multe aplicații. În ultimele decenii domeniul nanotehnologiilor s-a impus ca un domeniu de mare actualitate cu un impact revoluționar industrial și social. Acest fapt este confirmat de existența programelor de cercetare internaționale în domeniul nanotehnologiilor precum Inițiativa Națională în Nanotehnologie (SUA) și Programul Cadru 7 sau Orizont 2020 (Uniunea Europeană), în care se pune accent pe dezvoltarea nanotehnologiilor și aplicațiile acestora.

Nanoparticule metalice sunt printre cele mai utilizate pe scară largă, însă există mai multe studii in vitro care au demonstrat efecte toxice nedorite [127, 159], iar interacțiunea acestora cu sistemele biologice este încă neclară. Conform unor autori, efectele adverse ale nanoparticulelor trebuie, în mod evident, să fie evaluate pe diferite organisme celulare [165, 167, 181, 207, 209]. De asemenea sunt importante și actuale cercetările detaliate ale efectelor nanoparticulelor asupra dezvoltării și producerii de metaboliți cu destinație biotehnologică. Totodată, pentru a utiliza nanoparticulele în biotehnologie, pentru biosinteza produselor bioactive de diversă natură, sunt necesare cercetări privitor la reacția celulelor la acțiunea acestora.

Nanoparticulele reprezintă o clasă de materiale ultrafine cu dimensiuni situate în diapazonul de 1-100 nm [210], care au câștigat atenția în progresele tehnologice, datorită proprietăților fizico-chimice reglabile, cum ar fi dimensiunea, punctul de topire, conducerea electrică și termică, care pot fi manipulate și modificate pentru a obține rezultatele necesare [27]. O atenție deosebită este orientată spre utilizarea nanoparticulelor metalice care pot fi aplicate cu succes în diverse domenii cum ar fi medicină, cosmetologie, alimentație, biotehnologie etc. [109, 149, 196].

În cercetările ulterioare, alături de compușii coordinativi au fost evaluați și nanocompozitele metalelor la acțiunea cărora a fost constatată intensificarea sintezei diferitor principii bioactive și reducerea ciclului tehnologic.

1.3.1. Undele milimetrice de intensitate joasă ca factor reglator al sintezei microbiene

Problema esențială a utilizării microorganismelor ca obiecte biotehnologice este sporirea capacității lor biosintetice. În acest aspect este actuală studierea tulpinilor de fungi și posibilităților de dirijare a proceselor de ontogeneză cu scopul modificării etapelor separate ale metabolismului și intensificării biosintezei compușilor biologic activi [87].

Se cunosc cercetări privind stabilirea efectului radiațiilor electromagnetice în diapazon milimetric de intensitate joasă ($0,1-10 \text{ mW/cm}^2$) și frecvențe înalte de ordin GHz asupra unor specii de microalge, fungi și levuri. Experimentele au demonstrat un efect multiplu al undelor milimetrice, observându-se o creștere, dar și o deșcreștere a proliferării celulare și biosintezei metaboliților, în funcție de frecvența, regimul și durata iradierii. Datele din literatură [115, 145] prezintă rezultate privind sporirea de 2,8 a factorului de creștere și de 2,0 ori a productivității carporilor la bazidiomiceta *Hypsizygus ulmarius* după tratarea sporilor cu radiații EHF (extremely high frequency - frecvențe extra înalte) de la 30 GHz la 300 GHz, cât și creșterea de 2,0 ori a intensității procesului de mitoză.

Un șir de publicații marchează acțiunea stimulatorie a radiației milimetrice de intensitate joasă asupra productivității biomasei și sporirii biosintezei unor metaboliți la cianobacteria *Spirulina platensis* (Nords) Geitl (procariot), la alga verde monocelulară *Platymonas viridis* Rouch (eucariot), producători de proteină alimentară și furajeră [66] a activității enzimatică la bacteria *Bacillus firmus*, producător de proteaze și asupra drojdiilor [24].

Tratarea cu radiație milimetrică de intensitate joasă a fungului *A. awamori* 466, a condus la sporirea activității α -amilazelor cu 67% și, simultan, la inhibarea activității glucoamilazelor cu 30% se menționează că prin selectarea parametrilor radiației se poate obține și represia α -amilazelor [87]. Prin urmare radiația milimetrică cu intensitate mică poate fi utilizată ca reglator al activității biosintetice la microorganismele, fapt care poate fi aplicat la elaborarea biotehnologilor de sinteză orientată a principiilor bioactivi de către microorganismele.

În acest scop a fost studiată intensiv posibilitatea utilizării radiației milimetrice de intensitate mică [54].

Interes deosebit prezintă efectul acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă în dependență de regimul de emisie. Conform rezultatelor cercetărilor expuse de Usatîi A., și col., (2002) [24] influența undelor milimetrice de intensitate joasă asupra activității funcționale a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-16 aplicate în regimuri de emisie continuu și periodic acționează asupra multiplicării drojdiei în variantele experimentale efectuate în regim periodic (măsurări după 24 ore de cultivare în profunzime) și este mai accentuată în primele 10 minute de impact al UMM. Rezultatele obținute după 48 ore de cultivare în profunzime, a levurii

Saccharomyces cerevisiae CNMN-Y-16, demonstrează că efectul de iradiere depinde de fazele de dezvoltare a culturii, consecințele pozitive evidențiindu-se pentru regimul continuu [24].

În rezultatul evaluării acțiunii UMM de intensitate joasă asupra microalgelor și cianobacteriilor, unii cercetători [87, 91] au scos în evidență faptul că efectele provocate de acțiunea UMM au un caracter prolongat, se păstrează pe parcursul a mai multor generații, scăzând treptat (posibil din cauza revenirii membranelor celulare la starea funcțională normală). Totodată a fost demonstrat efectul UMM asupra bacteriilor, astfel la *B. mucilaginosus* s-a remarcat creșterea cantității de biomasă acumulată, la *B. firmus* creșterea activității enzimaticе, activitatea reacțiilor radicalilor liberi la *Salmonella typhimurium*, sporirea transferului de protoni la *Holobacterium holobium* [211]. Caracterul de durată al acțiunii UMM a fost detectat și la microorganismele heterotrofe - *E. coli*, micromiceta de tip levurian *Endomyces fibuliger*, la drojdiile de bere și alcool. Cu toate că, mecanismul persistenței efectului stimulator pe parcursul mai multor pasaje ale culturii nu este complet dezvăluit, efectul utilizării undelor electromagnetice ca direcție de perspectivă în cercetările biotehnologice este argumentat de rezultate remarcante expuse în lucrările colaboratorilor Institutului de Microbiologie și Biotehnologie [24, 78, 93, 129, 130].

1.3.2. Rolul compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție în sinteza orientată a enzimelor

Extinderea domeniilor de aplicare a preparatelor enzimaticе justifică lărgirea investigațiilor de explorare a noi posibilități de intensificare a proceselor de biosinteză microbiană. Din acest punct de vedere prezintă interes utilizarea stimulatorilor de natură chimică, în special a compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție [8, 9, 11, 12, 16, 41, 117, 126, 134, 144].

Cercetările din ultimii ani arată că un rol important în sinteza orientată a substanțelor bioactive, inclusiv a enzimelor amilolitice, de către microorganismе au compușii coordinativi, alte substanțe cu compoziție complexă, care includ în componența lor ioni ai metalelor.

Este demonstrat că, activitatea de biosinteză a enzimelor poate fi inhibată și de diverși compuși chimici, fie de natură endogenă (diverși metaboliți) sau exogenă (diverși agenți toxici, medicamente) [103]. Ionii și compușii metalici activi ca grupări protetice care asigură stabilizarea conformației enzimei sau a complexului enzimă-substrat, constituie activatori ai reacțiilor enzimaticе [110]. Inhibitorii enzimelor reprezintă compuși chimici cu greutate moleculară mică care prezintă capacitatea de a reduce sau a inhiba complet activitatea catalitică a enzimei, în mod reversibil sau ireversibil (permanent) [38].

Compușii coordinativi ai metalelor au un rol important pentru obiectele biologice. După structura lor, combinațiile coordinative sunt apropiate de compușii biologici naturali (clorofila, hemoglobina), responsabili de activitatea vitală a organismului, îndeplinind funcții bine determinate de transport, de catalizatori ai diverselor procese, de acumulare, etc. Elementele legate coordinativ sunt mai active, mai puțin toxice pentru microorganism și posedă acțiune înaltă catalitică [7, 125-126, 134].

Din 900 de enzime cunoscute 200 sunt metaloenzime [201]. Majoritatea metalelor fac parte din elementele indispensabile pentru microorganisme, participând la procesele metabolice. Lipsa sau prezența lor în mediu pot influența multe caracteristici ale celulei microbiene la nivel de ADN, ARN, sinteza proteinelor, enzimelor ș.a. Ioni multor metale - Mg, Co, Zn, Cd, Cr, Cu, Mn, Fe, Ca, Ni și altele sunt activatori ai sistemelor enzimatică [2, 8, 9, 16, 47, 72, 126, 144].

Cele mai multe informații disponibile despre funcționarea microelementelor se concentrează asupra rolului lor în calitate de metaloenzime, servind drept grupe proteice necesare în centrii activi, sau drept coenzime pentru metaloenzime indispensabile, sau enzime metal-ion activate. S-a estimat că, de la 1/4 până la 1/3 din toate enzimele cunoscute, necesită ca component funcțional un ion metalic. Exemplu principal de metaloenzime pot fi considerate proteinele care conțin, în centrele lor active, ioni de Fe, Zn sau Cu.

Enzime cu conținut de ioni de Zn au fost identificate pentru toate cele 6 clase importante de enzime: oxido-reductaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze și ligaze. Catalazele și multe peroxidaze sunt hem-enzime tipice care necesită fier. Metaloenzima superoxididismutaza, izolată din citoplasma eucariotică conține doi atomi de cupru și doi atomi de zinc. Metalele mangan, molibden, cobalt și nichel au fost identificate în mod cert ca părți componente ale metaloenzimelor. Manganul este prezent în enzimele: superoxididismutaza (mitochondrială), arginaza, piruvat carboxilaza și glicoziltransferaza. Se presupune că Mn^{2+} este implicat în mecanismul enzimatic al metabolismului carbohidraților și lipidic. În plante și microorganisme nichelul funcționează în câteva metaloenzime - ureaze, hidrogenaze și dehidrogenaze. Atât vitamina B₁₂ cât și alte coenzime conțin atomi de cobalt [44, 117, 143].

Încă la începutul anilor 80 a fost stabilit că bioelementele, legate coordinativ cu substanțe bioactive sunt mai puțin toxice și posedă o acțiune catalitică mult mai superioară [86], inclusiv clorofila și hemoglobina sunt compuși coordinativi [23].

În prezent sunt sintetizați un număr mare de compuși coordinativi cu structură diferită. Rolul lor biologic se stabilește în funcție de efectul și gradul de influență asupra proceselor metabolice la om, animale, plante și microorganisme [26, 124]. În literatură există puține date,

privind acțiunea compușilor coordinativi asupra biosintezei enzimelor de către microorganisme [8, 16, 41, 124-126, 134, 144, 179], ceea ce determină originalitatea studierii influenței metalocompușilor asupra biosintezei hidrolazelor exocelulare de către fungi.

Complexitatea structurală și de compoziție, prezența metalelor, în calitate de atom central, atestă perspectiva utilizării compușilor coordinativi în calitate de stimulatori și reglatori ai biosintezei enzimelor de către microorganisme. Astfel, metalele au un rol important în enzimologie.

În nutriția minerală a mucegaiurilor Cu^{2+} are un rol important, intervenind în constituția cupru-enzimă și a sistemelor de oxido-reducere celulară. În metal-enzime (polifenoloxidaza, tirozinaza) ionul de Cu^{2+} este ferm legat, îndeplinind un rol structural sau funcțional încât îndepărtarea sa determină pierderea sau reducerea activității enzimatică. Se consideră că în prezența Cu^{2+} este facilitată absorbția fierului și încorporarea sa în citocromi. La concentrații mari Cu^{2+} devine inhibitor și poate avea, în funcție de concentrație și capacitatea de adaptare a microorganismelor, un efect fungistatic sau fungicid [35].

Prezența microelementelor stimulează formarea amilazei. Ionii multor elemente: Zn, Cd, Ni sporesc acțiunea enzimelor asupra schimbului de hidrocarburi. O funcție principală a zincului este stabilizarea structurilor celulare: ribozomilor, mitocondriilor în vivo. Este stabilit că ionii de Zn^{2+} ca și alte metale de tranziție stabilizează structura cuaternară a AND-ului și a proteinelor [2, 16].

Mineralele necesare organismelor vii în cantități minime au un rol important în procesul de înmulțire și activitate vitală a tulpinilor fungice: Cu, Mo, Zn, B, Mn, Fe, Co, I, Se, V măresc activitatea multor enzime și sisteme enzimatică ale organismelor vii. Enzimele formează cu metalele diverși compuși metaloorganici, interacționând cu ionii lor participă la procesele de transfer al electronilor și la reacțiile redox, fiind o parte componentă a enzimelor ele servesc ca activatori [7, 9, 124-126, 219].

Compusul bioactiv $\text{trans-[Co(DH)}_2(\text{Thio})_2\text{]2F[PF}_6\text{]}$ (fluorură de hexafluorofosfat-bis[di(tiocarbamidă)bis(dimetilglioximato)cobalt(III)]), unde DH este anionul de dimetilglioximă, iar Thio - tiocarbamida posedă proprietăți de stimulator al creșterii microorganismelor și catalizator în diferite procese biotehnologice și chimice. Analiza roentgenostructurală a acestui compus a relevat o îmbinare neobișnuită a diferitelor tipuri de legături chimice și interacțiuni nevalente, precum și o poziționare a liganzilor, care permite introducerea într-un singur compus chimic individual a trei microelemente – Co, P și F, necesare pentru dezvoltarea unor microorganisme, în particular a tulpinilor de micromicete din genurile *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* (BOPI 2836/2005).

Datele din literatură susțin că, biomasa de *Spirulina platensis*, obținută prin cultivarea în prezența compușilor coordinați ai cobaltului se caracterizează prin conținut înalt de cianocobalamină, proteină, carotenoizi și este balansată după celelalte componente [7, 18, 34, 35, 72].

1.3.3. Nanoparticolele și rolul lor în dirijarea metabolismului microbial

Dezvoltarea continuă a nanotehnologiilor include și crearea noilor metode de sinteză a materialelor la scara nanometrică (sub 100 nm), care să permită controlul riguros al dimensiunii, dispersității, omogenității și compoziției chimice ale acestor nanostructuri, dar și cercetarea acestora pentru definirea potențialelor aplicații. Materialele de dimensiuni nanometrice prezintă interes atât pentru cercetările fundamentale cât și pentru cele cu caracter aplicativ. Acest interes se datorează fenomenelor și proprietăților interesante, și uneori neașteptate, care apar la materialele de dimensiuni nanometrice. Cele mai frecvente aplicații pentru aceste produse sunt protecție antimicrobială (381 de produse), acoperiri (188 de produse) și produse utilizate în scopuri medicale (142). Estimările orientative pentru 2020 susțineau că producția totală de nanomateriale va atinge jumătate de milion tone pe an [210], dintre care majoritatea vor fi argint, dioxid de titan, oxid de zinc, siliciu și nanomateriale de carbon (nanotuburi de carbon cu un singur perete, nanotuburi de carbon multistrat și fulerene) [166, 210].

O atenție deosebită este orientată spre utilizarea nanoparticulelor metalice care pot fi aplicate cu succes în diverse domenii cum ar fi medicină, cosmetologie, alimentație, biotehnologie etc. [3, 4, 5, 61, 92, 94, 167, 174, 196, 210]. Însă există o serie de riscuri asociate atât producerii, cât și utilizării nanoparticulelor asupra mediului și sănătății oamenilor în egală măsură. Conform studiilor recente s-a demonstrat că nanoparticulele din cauza dimensiunilor mai mici decât cele ale celulelor și organelor celulare, sunt extrem de mobile, atât în organismele vii, cât și în mediul înconjurător, fiind capabile să pătrundă în structurile biologice, afectând funcționarea normală a acestora [209]. Organizațiile mondiale și europene iau măsuri de precauție pentru a oferi reglementări de evaluare a riscurilor nanomaterialelor. Riscurile legate de utilizarea nanoparticulelor pot fi evitate prin testarea modificărilor proprietăților morfologice, gradului de inhibare a creșterii și dezvoltării populației celulare, de modificare a activității biochimice a organismelor vii și componentelor celular

În ceea ce privește aplicarea biologică a nanoparticulelor se cunoaște că metodele de sinteză prin sisteme biologice, adică microorganisme, inclusiv bacterii, drojdii, ciuperci și diatomeele, care sintetizează materiale anorganice, fie intra sau extracelular, ar face nanoparticulele mai biocompatibile. Mecanismele biochimice și moleculare care stau la baza sintezei microbiologice nu sunt pe deplin cunoscute, deoarece celulele microorganismelor se

comportă în mod diferit față de ionii metalelor prezenți în mediul celular, iar procesele metabolice implicate diferă și ele între speciile microorganismelor. Microorganismele sintetizează cantități mari de proteine responsabile de reducerea ionilor metalici și legarea acestora în mediul extracelular. Studiarea mecanismului interacțiunii structurilor proteice cu ionii metalelor contribuie la înțelegerea și optimizarea procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor, ceea ce asigură un potențial sporit în cercetările aplicative.

Influența nanoparticulelor asupra organismelor vii prezintă interes datorită celor trei parametri de bază: compoziția chimică, dimensiunile la nivel nano- și concentrația aplicată [127, 174, 175, 196, 200].

Compoziția chimică determină proprietățile și caracteristicile de bază a nanoparticulelor. Cercetările efectuate în ultimii ani au stabilit corelarea structurii nanoparticulelor și influența acestora asupra organismelor vii, unii cercetători demonstrând că nanoparticule oxizilor de Zn, în funcție de dimensiune și concentrații, sunt mai eficiente comparativ cu substanțele convenționale împotriva bacteriilor *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* și *Lactobacillus* [196, 207, 209, 210]. De asemenea s-a constatat că acestea sunt, în general, mai puțin toxice decât nanoparticulele de argint la aplicarea concentrațiilor dozate asupra levurilor [181, 220]. În literatura de specialitate sunt prezentate dovezi asupra faptului că efectul stimulator asupra proceselor biosintetice a nanoparticulelor depinde de compoziția chimică a acestora [174, 175, 200]. Astfel, identificarea caracterului de acțiune a nanoparticulelor de fier asupra viabilității streptomicetelor a evidențiat că sensibilitatea tulpinilor variază în funcție de forma chimică a NP și de particularitățile individuale ale fiecărei tulpini în cele mai multe cazuri, atât NP Fe₃O₄ cât și fierul zero valent au înregistrat un efect stimulator [220].

Studiile prezentate de mai mulți cercetători [61, 192, 220] au demonstrat că efectul nanoparticulelor de TiO₂ depinde în mare măsură atât de compoziția chimică cât și de obiectul biologic cercetat.

Dimensiunea nanoparticulelor. Cercetările efectuate în ultimii ani au arătat că nanoparticule prezintă o toxicitate mai mare comparativ cu substanțele convenționale dimensiunea este unul dintre factorii cheie care influențează efectul toxic [155, 159]. Rezultate relevante au fost prezentate de către Hund-Rinke acțiunea nanoparticulelor TiO₂ cu dimensiunile de 25 nm și 100 nm acționează diferit asupra algei verzi *Desmodesmus subspicatus*. Autorii susțin că, nanoparticulele cu dimensiunea de 25 nm au inhibat creșterea într-un grad mai mare decât nanoparticulele cu dimensiunea de 100 nm [155].

Aplicarea nanoparticulelor de ZnO cu mărimi de 30 nm a stimulat capacitatea de sinteză a carbohidraților β -glucanilor și proteinelor la tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, fapt ce nu a fost remarcat în cazul unor concentrații mai mici (10 nm). Astfel, tratamentul tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 cu nanoparticule ZnO cu dimensiunile 30 nm au evidențiat capacitatea de a stimula sinteza carbohidraților, β -glucanilor și proteinelor efecte care nu au fost înregistrate la aplicarea NP ZnO cu dimensiuni de 10 nm [48].

Nanoparticulele datorită dimensiunilor mici dețin și importante proprietăți antifungice fiind aplicate pentru a stabili capacitatea de inhibare a efectelor fungilor paraziți *A. flavus* și *A. niger* [181, 191].

Totuși elucidarea dependenței efectelor și mecanismelor de acțiune a NP oxizilor metalici asupra organismelor vii de dimensiunile NP necesită studii suplimentare detaliate.

Concentrația nanaoparticulelor. În lucrările mai multor autori [3, 180, 181] sunt expuse rezultatele cercetărilor asupra efectelor diferitor concentrații de nanoparticule asupra celulei microbiene din care concluzionăm că influența depinde de concentrația utilizată [3, 180].

Biosinteza lipazelor exocelulare la tulpina *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 a depășit de 3 ori nivelul probei control (30000 U/mL) atingând valori de 95576 - 101068 U/mL urmare a efectului stimulator al nanoparticulelor de Fe_3O_4 (70 nm) în concentrații de 5 și 10 mg/L [94].

Cercetările realizate de Jing Hu asupra influenței nanocompozitelor de Fe_2O_3 asupra parametrilor fiziologici, cum ar fi procentul de germinare a semințelor, lungimile rădăcinilor, conținutul de malonaldehidă (MDA), conținutul de clorofilă, activitatea reductazei ferice și conținutul de fier al lăstarilor și rădăcinilor au arătat că 20 mg/L $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ NP au promovat germinarea semințelor de pepene verde cu 14,5% și, respectiv, a semințelor de porumb cu 10,1%. Totodată, susține autorul, și concentrațiile de 20 și 50 mg/L $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ NP ar putea accelera alungirea rădăcinilor la pepene verde și la porumb, iar concentrația de 20 - 100 mg/L $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ NP ar putea crește conținutul de clorofilă al pepenelui verde pe durata expunerii, în timp ce conținutul de clorofilă al expunerii porumbului la $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ NP a fost mai mare decât controlul în prima săptămână, dar nu au fost observate efecte pozitive în următoarele două săptămâni [154, 155].

De asemenea aplicarea NP ZnO în concentrații de 200 mg/L și 300 mg/L au crescut semnificativ activitatea antioxidantă a superoxid dismutazei (SOD, EC 1.15.1.1) la alga *C. vulgaris* [159]. A fost demonstrat efectul nanoparticulelor de Fe_3O_4 și TiO_2 asupra activității catalazei la *Rhodotorula gracilis*, conținutul de β -caroten și enzimă antioxidantă depinde de concentrația și dimensiunile nanoparticulelor aplicate. Analiza statistică a rezultatelor cercetărilor au evidențiat că conținutul de β -caroten a fost redus cu 34,5-73,4% comparativ cu

proba martor la cultivarea în prezența nanoparticulelor de Fe_3O_4 cu dimensiunea de 10 nm și redusă cu 36,4 - 81,8% în cazul utilizării Fe_3O_4 NP cu dimensiunea de 30 nm. Raportul de corelare a confirmat dependența dintre conținutul de β -caroten și concentrația de Fe_3O_4 (10 și 30 nm) NP utilizate la cultivarea tulpinii *R. gracilis* CNMN-Y-30 [220].

Așa dar, complexitatea metabolică a microorganismelor complică analiza și identificarea caracterului interacțiunii nanoparticule-celule. Compoziția chimică, dimensiunea și concentrațiile nanoparticulelor condiționează amploarea și specificitatea gradului de acțiune asupra caracterelor morfologice, fiziologice și biochimice ale microorganismelor. Astfel, aceste rezultate explică importanța cercetării modului în care celulele din diferite grupe taxonomice interacționează cu nanoparticule pentru evaluarea riscului și consecințelor grave asupra organismelor și ecosistemului. De asemenea prezintă interes pentru elaborarea procedeele eficiente de producere a noi bioproduse, destinate diferitor ramuri ale economiei naționale, pentru dezvoltarea biotehnologiilor microbiene.

Perspective de utilizare a nanoparticulelor oxizilor metalici. Nanoparticule Fe_3O_4 și ZnO prezintă interes, pentru cercetările fundamentale cât și pentru cele aplicative, datorită proprietăților pe care le au și anume biocompatibilitate, stabilitate, proprietățile magnetice și prepararea simplă [3, 4, 94, 127, 174, 175, 196, 200, 208, 210]. Astfel, ele devin atractive pentru aplicații în diferite domenii precum biomedicină, industria alimentară, cosmetologie, farmaceutică, protecția mediului, biotehnologie. În continuare vor fi remarcate principalele aplicații ale nanoparticulelor Fe_3O_4 și ZnO care au fost raportate în literatura de specialitate.

Interesul general sporit este justificat și de importanța deosebită a enzimelor microbiene pentru industria fermentativă, farmaceutică și medicală, iar obținerea de preparate enzimatică cu utilizarea nanoparticulelor și aplicarea acestora în diferite domenii ale industriei alimentare permite corectarea deficiențelor de calitate a materiei prime, îmbunătățirea proceselor tehnologice, asigură indicii superiori de calitate și randamente crescute ale produselor finite, facilitând valorificarea progresului tehnico-științific [139, 149, 165, 175].

Totodată există un interes continuu îndreptat spre aplicabilitatea particulelor de dimensiuni nanometrice. Nanoparticulele pe bază de fier ca și nanoparticulele în general se pot prepara prin metode fizice, chimice sau biologice [196]. Tehnicile biologice de sinteză a materialelor constau în utilizarea enzimelor microbiene, substanțelor fitochimice cu proprietăți oxidante sau reducătoare, sau utilizarea directă a microorganismelor pentru sinteza nanoparticulelor [61, 109].

Un alt compus de interes biotehnologic este dioxidul de titan care este, în principal, în trei faze cristaline și anume anataza (tetragonală), rutil (tetragonal) și brookite (ortorombic) [190].

Dintre acestea, rutilul este cea mai comună și naturală formă, deoarece este o parte integrantă a mineralelor grele. Deoarece brookitul este deficitar în natură, această formă nu are o importanță economică semnificativă. Toxicitatea nanoparticulelor de dioxid de titan se datorează activității lor fotocatalitice, care contribuie la creșterea efectului inhibitor după tratarea obiectului cu radiații UV [192]. S-a descoperit că, efectul fotocatalitic al nanoparticulelor de dioxid de titan este îmbunătățit semnificativ atunci când sunt expuse la UV-C cu lungime de undă scurtă în comparație cu radiațiile UV-A și UV-B au raportat că niveluri relativ scăzute de radiații ultraviolete, în concordanță cu radiația solară naturală, pot contribui la toxicitatea nanoparticulelor de dioxid de titan pentru fitoplancton, în timp ce blocarea radiațiilor UV provoacă un efect toxic observat. Proprietățile toxice ale nanoparticulelor de dioxid de titan pot varia în funcție de structura lor cristalină [109, 210]. Două forme alotrope de nanoparticule: anataza și rutilul au proprietăți de suprafață și reactivitate diferite [209]. În timp ce combinațiile lor pot prezenta atât efecte antagoniste, cât și aditive [207- 210].

1.4. Concluzii la capitolul 1

1. Microorganismele, ca orice organisme vii, sunt sisteme specifice, complex organizate, dotate cu continuitate genetică, deci cu capacitatea de a se reproduce independent. În cazul în care sunt cultivate în condiții optime, sunt provizionate cu hrană, ele își sintetizează constituenții proprii, folosind pentru aceasta energia eliberată din degradarea enzimatică a substratului lor nutritiv. Prin urmare, microorganismele sunt capabile de o activitate de biosinteză enzimatică neîntreruptă, mai mult sau mai puțin intensă, care poate fi reglată prin utilizarea stimulenților de creștere și biosinteză enzimatică.

2. Tulpinile de microorganisme, selectate din natură, manifestă capacități scăzute de sinteză a compușilor bioactivi. Sporirea potențialului biosintetic constituie o etapă importantă în cercetările microbiologice și biotehnologice.

3. Elaborarea unor metode efective de identificare a producătorilor activi, care să posede nu numai o activitate fermentativă înaltă, ci și viteza de creștere mare, stabilitate a proprietăților culturale și biochimice, rezistență la infecții, disponibilitate mică spre disociere, cu formare de variante mai puțin prețioase, este una din sarcinile biotehnologiilor moderne.

4. Identificarea și valorificarea producătorilor de perspectivă, studierea condițiilor de cultivare a acestora, deschide perspectiva obținerii unor preparate enzimatică cu activități amilolitice înalte și sporirea randamentului de enzime, iar utilizarea microorganismelor ca biocatalizatori enzimatici s-a dovedit a fi cea mai avantajoasă pentru diferite tipuri de industrii.

5. Studiarea influenței stimulatoarelor de creștere și sinteza orientată a enzimelor amilolitice prin iradierea cu unde milimetrice de intensitate joasă, utilizarea complexelor

metalici și nanoparticulelor pentru ameliorarea proprietăților biochimice a preparatelor amilolitice și elaborarea bazelor științifice a regimurilor utilizării lor în procesele tehnologice este o problemă actuală atât în plan teoretic, cât și practic.

Problema de cercetare: Elaborarea unor procedee argumentate de sporire a eficienței de sinteză și a biotehnologiilor avansate de producere a preparatelor enzimatică amilolitice competitive cu cele utilizate la scară mondială.

Reieșind din problema de cercetare și în contextul celor expuse în reviu literaturii de specialitate care determină fungii miceliale ca principalii producători ai biotehnologiilor secolului, sfera largă de aplicare a hidrolazelor, inclusiv și a amilazelor în diverse domenii ale economiei, medicinei, cercetării științifice, lipsa producerii autohtone de preparate enzimatică, necesitățile fiind acoperite prin import, evidențiază ca actuale și oportune în domeniul microbiologiei și biotehnologiei **direcțiile de cercetare:**

- valorificarea, din rândul fungilor miceliale a tulpinilor noi, producătoare de amilaze, cu capacități înalte și stabile de biosinteză, care îndeplinesc criteriile de producători comerciali, utili pentru fundamentarea principiilor de sinteză orientată a enzimelor de către fungi și utilizarea lor în biotehnologii;
- investigații de explorare a noi metode și căi de intensificare a proceselor de biosinteză microbiană a amilazelor exocelulare.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Cercetările au fost efectuate în cadrul Laboratorului „Enzimologie” al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei (actualmente „Biotehnologia fungilor” al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei).

2.1. Materiale și obiectul de cercetare

Obiect de studiu a fost tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 06 A (în continuare *A. niger* CNMN FD 06) producătoare de amilaze, păstrată în colecția laboratorului Enzimologie și depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie (Adeverință de depozitare, Anexa 1).

În figura 2.1. este prezentat aspectul macroscopic (A) și aspectul microscopic (B) al tulpinii de funghi miceliali *A. niger* CNMN FD 06, cultivată pe mediul malț-agar.

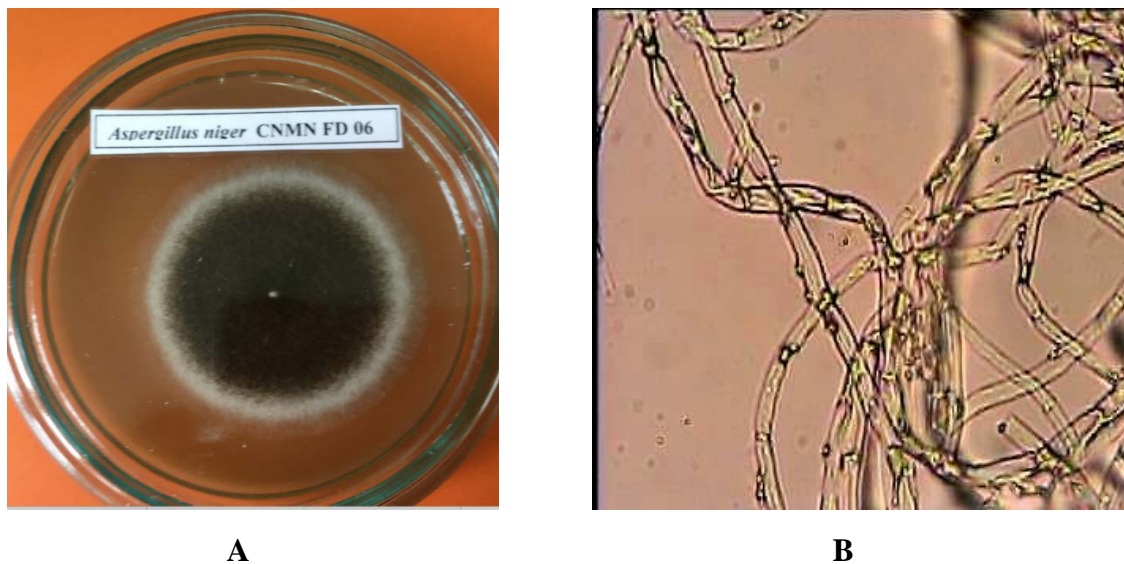


Fig. 2.1. Aspectul macroscopic (A) și aspectul microscopic (B) al tulpinii de funghi miceliali *A. niger* CNMN FD 06, cultivată pe mediul malț-agar

Tulpina *A. niger* CNMN FD 06 a fost cercetată de comun cu colaboratorii laboratorului Enzimologie prin cultivarea, în mai multe etape, pe medii lichide și agarizate, având ca material primar tulpina *Aspergillus niger* 33. Originea tulpinii *A. niger* 33 este Institutul „Oswald Cruz”, Rio de Janeiro, Brazilia, transmisă apoi Institutului Tehnologic de Cercetări Științifice a Antibioticelor (or. Sanct- Petersburg, Federația Rusă) unde a fost înregistrată, sub numărul 33, în Catalogul culturilor de microorganisme [74].

Particularitățile morfologo-culturale ale tulpinii: Formează colonii albe-cenușii cu dimensiunile de 5-6 cm, în diametru, netede sau pufoase, sporulează abundent, pe mediu de malț-agar. Odată cu formarea conidioforilor cu conidii coloniile capătă o culoare cenușie-închisă

având o suprafață uniformă catifelată. După 5 zile de cultivare bordura coloniei este de culoare albă, rar cu nuanțe gălbuie. Reversul este de culoare galben-cafenie cu striuri radiale. Pe mediu agarizat Czapek formează colonii limitate de 2,5-3,5 cm. Miceliul de substrat este compact, alb sau galben-pal, submers sau distribuit pe suprafața mediului, sub aspect de substrat afinat. Capetele conidiilor sunt negre, conglomerate, inițial centrate apoi radiale, la maturizare se risipesc în câteva septuri afânate dar bine conturate de 700-800 mkm. Înălțimea conidioforilor variază între 1,5-3,0 mm, Lățimea 15-20 mcm cu membrane netede, groase cu nuanță cafenie, scufundat în strat spongios, măciuliile conidiale sunt concentrate în centrul coloniei divizându-se în câteva colonii spongioase bine conturate. Conidioforii incolori sau cafenii în partea superioară, lipsește exsudatul, miros tipic de mușgai. Studiarea particularităților tulpinii s-a făcut în conformitate cu determinantul autorilor Bilai V.I., Coval Ț. Z. (1988) [57].

Proprietățile fiziologo-biochimice: Tulpina crește și se dezvoltă bine pe mediu cu compoziția (g/L) făină de fasole-9,0; amidon- 3,0; tărâțe de grâu -18,0; MgSO₄ - 0,5; KH₂ PO₄ - 2,0; KCl -0,5; apă de robinet până la 1litru, pH-ul inițial 5,5. Temperatura optimă de creștere și biosinteză -28-30⁰C. Tulpina *A. niger* reglează efectiv aciditatea mediului submers prin utilizarea anumitor cationi cât și prin eliminarea metaboliților care influențează valoarea pH-ului, acesta variind de la 3,62 până la 7,2. Micromiceta asimilează amidonul și derivatele lui.

Originalitatea tulpinii: Tulpina sintetizează complexul amilolitic cu capacitatea de a hidroliza substratul bogat în amidon în condiții moderate de aciditate (pH 4,7) cât și în mediu puternic acid (pH 2,5), posedă acid-stabilitate caracteristică aspergililor negri.

Metoda, condițiile și componența mediului de nutriție pentru păstrarea îndelungată a tulpinii: Cultura se păstrează pe tuburi înclinate de malț (7B) la temperatura de +4-5⁰C. Recultivările ulterioare se efectuează prin porțiuni de miceliu cu conidii, odată la două luni. Creșterea se asigură prin menținerea în termostat la +30⁰C timp de 10-14 zile.

Informații despre prezența proprietăților patogene: Cultura nu este patogenă.

În anul 2004 tulpina *Aspergillus niger* 33 este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neopatogene din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie ca producător perspectiv de amilaze și obiect de interes biotehnologic cu indexul de înregistrare CNMN FD 06 (Adeverință de depozitare, Anexa 1).

La etapa de screening a tulpinilor de micromicete din colecția laboratorului, după capacitatea de a sintetiza enzime amilolitice, în cercetare au fost utilizate 37 de tulpini de microorganisme: *Alternaria alternata*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus terreus* 65, *Aspergillus terreus* 67, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus flavus* 76, *Aspergillus flavus* 76 (miceliu), *Aspergillus niger* USA MV (România), *Aspergillus niger* 33, *Aspergillus niger* 412, *Aspergillus sp.*,

Aspergillus niger 33-19, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* 57, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Botrytis cinerea* 70, *Gliocladium venosum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium nivale*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium corylophilium*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium nigricans* 0671, *Penicillium nigricans* 0719, *Penicillium expansum* F 1703, *Penicillium viride*, *Rhizopus arrhizus* 67, *Rhizopus arrhizus* C, *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus* IX, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma viride*, precum și 14 tulpini izolate din solurile din zona centrală a Republicii Moldova: Nr.12, Nr.13, Nr.14, Nr.10T, Nr. 47, Nr. 57, Nr. 77, Nr. 209, Nr. 222, Nr. 223, Nr. 1T, Nr. 228, Nr. 229, Nr. 231.

Medii nutritive de cultivare.

Pentru păstrarea tulpinii A. niger CNMN FD 06 în condiții de laborator a fost utilizat mediul malț-agarizat cu următoarea compoziție: extract de malț (7⁰B) - 500 ml; agar-agar -20,0g; apă distilată până la un litru (pH 4,8-5,0). Autoclavarea are loc la temperatura de 115-120⁰C timp de 20 minute.

Pentru studierea caracterelor morfo-culturale au fost utilizate mediile, aplicate la cercetări similare [57]:

- *Czapek*, (g/L): zaharoza - 30,0; NaNO₃ - 2,0; KH₂PO₄ - 1,0; MgSO₄ x 7H₂O - 0,5; KCl - 0,5; FeSO₄ - 0,01; agar - 20,0, apă distilată până la un litru.
- *Reistrich*, (g/L): glicerină - 7,0; fructoză- 5,0; maltoză- 5,0; zaharoză-5,0; peptonă- 10,0; NaCl- 4,0; MgSO₄ x 7H₂O - 0,05; KH₂PO₄ - 0,05; FeSO₄ - 3ml (0,1N); agar - 20,0; apă distilată până la un litru.
- *malț-agar*, (g/L), extract de malț (7⁰B) - 500,0 ml; agar- 20,0 g, apă distilată până la un litru (pH 4,8-5,0);
- *malț-agar +1% amidon*, (g/L): extract de malț (7B) -500,0 ml, agar- 20,0 g; amidon - 10,0 g; apă distilată până la un litru (pH 7,0).

Pentru selectarea mediului optim de cultivare și producere a amilazelor au fost utilizate următoarele medii, recomandate în literatura de specialitate, cu următoarea compoziție (g/L):

- **Nr.1.** amidon - 4; extract de porumb - 10; MgSO₄ - 0,5; KCl - 1,5; CaCl₂ - 0,1; (NH₄)₂HPO₄ - 9,0 [68];
- **Nr.2.** amidon - 4,0; malț - 2,0; MgSO₄ - 0,5; KCl - 1,5; CaCl₂ - 0,1; (NH₄)₂HPO₄ - 9,0 [68];

- **Nr.3.** amidon - 4,0; făină soia - 2,0; MgSO₄ - 0,5; KCl - 1,5; CaCl₂ - 0,1; (NH₄)₂HPO₄ - 9,0 [68];
- **Nr.4.** făină de porumb - 6,0; extract de porumb - 10,0; MgSO₄ - 0,5; KCl - 1,5; CaCl₂ - 0,1; (NH₄)₂HPO₄ - 9,0 [68];
- **Nr.5.** făină de porumb - 6,0; malț - 2,0; MgSO₄ - 0,5; KCl - 1,5; CaCl₂ - 0,1; (NH₄)₂HPO₄ - 9,0 [68];
- **Nr.6.** făină de porumb - 6,0; boabe de soia - 2,0; MgSO₄ - 0,5; KCl - 1,5; CaCl₂ - 0,1; (NH₄)₂HPO₄ - 9,0 [68];
- **Nr. 7.** făină de porumb - 4,0; făină de fasole - 0,6; tărâțe de grâu - 1,4; KH₂PO₄ - 0,5; CaCl₂ - 0,5 [1];
- **Nr.8.** amidon - 0,6; făină de fasole - 1,8; tărâțe de grâu - 3,6; MgSO₄ - 0,4875; KCl - 0,4875; KH₂PO₄ - 1,05 [1];
- **Nr.9.** Czapek îmbogățit cu amidon (mediu de **control**), în următorul raport (g/L): amidon - 3,0; NaNO₃ - 0,9; FeSO₄ - 0,001; KH₂PO₄ - 0,1; MgSO₄ - 0,05; KCl - 0,09; apă din robinet.

Mediul *Czapek* modificat (9), în compoziția căruia zaharoza a fost înlocuită cu amidon, a servit ca mediu de control în cercetările ulterioare.

Compuși coordinativi.

Compușii coordinativi ai elementelor 3d incluși în cercetări au fost oferii de colaboratorii laboratoarelor: Chimia Compușilor Coordinativi (conducător N Gărbălău - academician, profesor universitar), Chimia Bioanorganică (conducător C. Turtă – membru-corespondent al A.Ș.M, profesor universitar) al Institutului de Chimie al A.Ș.M.

Cercetările de stabilire a efectelor unor complecși heterometalici ai metalelor de tipul „s” și „d” Ba, Sr, cu liganzi polidentati și argumentarea perspective aplicării acestora în cultivarea tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 s-au realizat în cadrul proiectului 20.80009.5007.28 *Elaborarea noilor materiale multifuncționale și tehnologii eficiente pentru agricultură, medicină, tehnică și sistemul educational în baza complecșilor metalelor „s” și „d” cu liganzi polidentati* (2020-2023), conducător de proiect: dr. hab. Bulhac Ion, coordonator de proiect al organizației partener, compartimentul: Tehnologii inovative de obținere a preparatelor enzimactice microbiene cu proprietăți avansate pentru aplicare în medicină, industria farmaceutică, alimentară, agricultură (2020-2023), Ciloci Alexandra, dr. în biologie, conf. cercet.

Pentru evidențierea unor stimulatori ai sintezei amilazelor la tulpina în studiu a fost testată influența a 32 de compuși coordinativi, structurați în 6 grupe, după cum urmează:

Tabelul 2.1. Compușii coordinativi ai metalelor utilizați ca stimulatori ai procesului de sinteză enzimatică la tulpina *A. niger* CNMN FD 06

Grupa compușilor complecși	Denumirea compușilor complecși	
Compuși coordinativi ai Zn (II) cu aminoacizi în diferite forme	1. DL Serinat Zn (II) 2. L Serinat Zn (II) 3. L Serinat Zn (II) 4. DL Alaninat Zn (II) 5. L Alaninat Zn (II) 6. D Alaninat Zn (II)	7. DL Alaninat DL Serinat Zn(II) 8. Glicinat DL Serinat Zn (II) 9. Glicinat D Serinat Zn (II) 10. Glicinat L Serinat Zn (II) 11. Zn (PC) ₂ 4H ₂ O
Compuși coordinativi ai Cu (II) cu acetyl acetona și picolinați	12. Cu (ac.ac) ₂ 2αPC 13. Cu (ac.ac) ₂ 2βPC 14. Cu (TTA) ₂ 2αPC	15. Cu (ac.ac) ₂ 16. Cu (PC) ₂ H ₂ O
Compuși coordinativi ai Co (II)-ului și Cr (II)-ului	17. Co (PC) ₂ 4H ₂ O 18. Co (PC) ₃ H ₂ O 19. Co (benzoat) ₂	20. Co (ac.ac) ₃ 21. Cr (PC) ₂
Dioximați ai Co (III) cu F (I)	22. Co(DH) ₂ (Thio) ₂]3F[SiF ₆] 1,5H ₂ O	23. [Co(DH) ₂ (Thio) ₂]2[SiF ₆] 3H ₂ O
Compuși coordinativi ai Co (III) cu liganzi oximici și F	24. [Co(DH) ₂ (Thio) ₂]F 3H ₂ O 25. Co(DH) ₂ (Thio) ₂]BF ₄ 3H ₂ O 26. Co(DH) ₂ (Thio) ₂]3F[SiF ₆] 1,5H ₂ O (I)	27. [Co(DH) ₂ (Py) ₂]BF ₄ H ₂ O
		28. [Co(DH) ₂ (Thio) ₂]2[SiF ₆]3H ₂ O (II)
Compuși coordinativi heterometalici ai elementelor „s”	29. [BaL ³ μ(NCS) ₂ -Co(NCS) ₂] – tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di- μ-(izotiocianato-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II) 30. [Sr L ³] [Co(NCS) ₄] - tetra (izotiocianat)cobalt(II) de tris(dietil piridin-2,6-dicarboxilat)stronțiu 31. [CaL ³] [Co (NCS) ₄] – tetra (izotiocianat)cobalt(II) de tris(dietilpiridin-2,6-dicarboxilat)calciu	32. Ligandul L ³ - esterul dimetilic a acidului 2,6-piridindicarboxilic

Nanooxizi metalici. Evaluarea impactului nanoparticulelor asupra biosintezei amilazelor la tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06 a fost realizată în cadrul proiectului *Utilizarea nanomaterialelor în biotehnologia cultivării fungilor miceliali și levurilor ca strategii de sporire a performanțelor biotehnologice*, conducător de proiect doctor în științe fizico-matematice, conf. cercet., Zastavițchi Efim, șeful Laboratorului Structuri cu corp solid, Institutul de Inginerie Electronică și Nanotehnologii „D.Ghițu” în baza unui contract de colaborare științifică.

Pentru stabilirea acțiunii nanooxizilor metalici asupra dezvoltării tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 și sintezei orientate a enzimelor amilolitice, precum și în vederea verificării parametrilor optimi de aplicare a nanoparticulelor în diferite concentrații au fost utilizate nanoparticulele anorganice cu precădere în baza oxizilor metalici: TiO₂, TiSiO₄, CuO, Cu metalic (99,5%), ZnO

și nanoparticulele oxizilor de Fe (II și III) - în starea inițială, în formă de soluții coloidale sau suspensii, Fe₃O₄, TiO₂, și ZnO, în formă de praf, oferite de Institutul de Inginerie Electronică și Nanotehnologii „D. Gițu” și procurate ca reagenți (firma Aldrich):

Nanoparticule de titan: dioxid de titan (TiO₂), nanopulbere, cu dimensiuni inițiale de 21 nm; TiSiO₄ < 50 nm și TiO₂ < 100 nm < 100 nm;

- *Nanoparticule de cupru:* oxid de (CuO) nanopulbere, cu dimensiuni de < 50 nm și Cu metalic (99,5%) < 60-80 nm;
- *Nanoparticulele oxidului de zinc:* oxid de Zn (II) (ZnO ≤ 50 nm), nanopulbere;
- *Nanoparticulele oxidului de fier:* Fe (II, III) oxid (Fe₃O₄ 50 - 100 nm) nanopulbere.

2.2. Metode de cercetare

În cercetări au fost aplicate metode clasice și moderne acceptate în cercetările microbiologice și biochimice [51, 57, 62, 63, 65, 67, 71, 82, 83, 88, 89, 173].

Determinarea activității amilolitice (AC)

Activitatea amilolitică s-a determinat prin metoda colorimetrică cu iod, utilizând ca substrat soluția de 1% de amidon solubil [63, 65, 67]. Metoda se bazează pe hidroliza amidonului de către enzimele complexului amilolitic până la dextrine cu diferită masă moleculară. Ca unitate de activitate amilolitică a fost admisă cantitatea de enzimă care, în condiții determinate de pH, temperatură și durată de acțiune, catalizează hidroliza unui gram de amidon până la dextrine cu masa moleculară diferită.

Masa amidonului hidrolizat se calculează după formula:

$$C = (D_1 - D_2) / D_1 \times 0,1 \text{ (g), unde}$$

0,1 - masa amidonului luat pentru analiză;

D₁ - densitatea optică a soluției control;

D₂ - densitatea optică a soluției studiate.

Dacă C este mai mic de 0,02g sau mai mare ca 0,06g, analiza se repetă, alegând alte rapoarte de diluare.

Activitatea amilolitică s-a calculat după formula:

$$AC_1 = (7,264 \times C - 0,03766) / M \times 1000 \text{ (U/g), unde}$$

7,264 și 0,03766 - sunt coeficienți de calcul;

M - masa preparatului enzimatic, ce se conține în 5 cm³ soluție de lucru, în mg [65].

Activitatea a două tipuri de amilaze: *acid-labile* (standarde sau ordinare, pH 4,7) și *acid-stabile* (care își păstrează activitatea la valoarea de pH 2,5), a fost determinată prin metoda menționată supra. Pentru dozarea amilazelor acid-stabile în probele soluțiilor de preparat pH-ul a

fost ajustat prin adăugarea soluției de 0,1 N de HCl până la valoarea pH 2,5 și menținută (în lipsă de substrat) timp de 30 min. la temperatura 37⁰C. După expirarea termenului pH-ul a fost ajustat la valoarea 4,7 cu dozarea ulterioară a activității amilazelor în conformitate cu metoda standard de determinare a activității amilolitice.

Condiții și parametri de cultivare. Analiza comparativă a potențialului de biosinteză a enzimelor amilolitice s-a realizat prin cercetări repetate a capacității de sinteză a enzimelor amilolitice la tulpinile de micromicete din Colecția laboratorului de Enzimologie prin cultivarea submersă a micromicetelor în condiții de agitare continuă timp de 6 zile, la temperatura 28-30⁰C. Mediul de cultivare a constituit mediul Czapek cu amidon. Cultivarea s-a realizat în retorte Erlenmayer cu capacitatea de 1000 ml cu câte 200 ml de mediu nutritiv în fiecare, pH-ul inițial al mediului de cultivare - 5,0. Material de inoculare a servit suspensia apoasă de spori cu densitatea de 1,5x10⁶, obținută prin spălarea culturii crescute pe mediul agarizat înclinat, la t⁰C de 28-30⁰C, timp de 12-14 zile. Criteriu de selectare a servit nivelul activității amilolitice a tulpinilor evaluate.

Condiții de păstrare. Micromiceta *A. niger* CNMN FD 06 se cultivă pe medii înclinate de malț-agar și se menține în termostat, la temperatura de 30⁰C. După atingerea vârstei de 12-14 zile, se transferă pentru păstrare, prin conservare, în camere frigorifice, la temperatura de +4⁰C - + 5⁰C. Menținerea viabilității culturii este asigurată prin trecerea pe mediu de nutriție proaspăt la fiecare 3-6 luni.

Obținerea materialului de inoculare. În calitate de material de inoculare a servit suspensia apoasă de spori obținută prin spălarea culturii de micromicetă, crescută timp de 14 zile în tuburi înclinate pe medii agarizate [67, 82, 83].

Separarea lichidului de cultură de biomasă s-a obținut prin filtrare, la cultivarea submersă a micromicetei, cu utilizarea filtrelor de hârtie cu lenta albă. În lichidul de cultură a fost determinat pH și activitatea amilolitică a amilazelor exocelulare.

Determinarea capacității de sinteză a enzimelor amilolitice.

Studierea caracterelor de cultură. Tulpina în studiu a fost cultivată pe medii nutritive agarizate. Prin metoda diluțiilor în serie au fost pregătite diluții zecimale de spori spălați cu apă distilată sterilă de pe suprafața unei culturi bine sporulate crescută în tuburi cu mediul malț-agar înclinat. Din diluțiile 10⁻¹⁰, 10⁻¹² s-au dispersat câte 0,1 ml pe medii solide agarizate în cutii Petri. S-au pregătit câte 5 repetări pentru fiecare variantă de mediu în conformitate cu metoda aplicată. Cutiile Petri au fost incubate la temperatura de 30⁰C, urmărindu-se zilnic dinamica creșterii și sporulării coloniilor. La a 3-a și a 6-a zi de cultivare s-a măsurat diametrul și înălțimea coloniilor (mm), iar densitatea s-a apreciat conform gradației: 1-rară, 2-medie, 3-densă.

Estimarea coeficientului de creștere s-a efectuat conform formulei:

$$CC=dhg/t, \text{ unde}$$

d - diametrul coloniei (mm), h - înălțimea coloniei (mm), g-densitatea (1, 2, 3) și t-vârsta coloniei (zile).

Coloniile selectate au fost transferate în tuburi cu mediul de malț-agar înclinat și menținute în termostat la temperatura de 30⁰C timp de 14 zile.

La a 4-a și a 12-a zi de cultivare s-au realizat măsurări ale dimensiunilor coloniilor. Examinarea coloniilor s-a făcut direct și cu lupa.

Studierea caracterelor morfologice.

Studierea particularităților morfologice s-a efectuat cu utilizarea microscopului optic SK 14 PZO Warszawa, Poland, cu diferite obiective, în baza determinantului pentru *Aspergilli*, recomandat de autorii Bilai V.I., Kovali Ā.Z. [58].

2.2.1. Determinarea parametrilor optimi de cultivare a tulpinii în studiu.

Temperatura este un factor care exercită influență semnificativă atât asupra creșterii fungilor, cât și asupra producerii metaboliților. Este cunoscut că pentru majoritatea micromicetelor producătoare de amilaze sunt mezofile, iar temperatura optimă de cultivare variază între 24-36⁰C [67]. În conformitate cu aceasta s-a studiat influența a trei temperaturi de cultivare - 20, 30 și 40⁰C asupra procesului de sinteză a enzimelor amilolitice la tulpina *A. niger* CNMN FD 06. La temperatura de 14-15⁰C tulpina nu crește. Determinarea activității amilolitice în lichidul cultural s-a efectuat în dinamică timp de 9 zile.

pH-ul mediului a fost determinat prin metoda potențiometrică în lichidul cultural și pe parcursul fazelor de dezvoltare a micromicetei în studiu. În scopul stabilirii pH-ului optim de biosinteză a amilazelor pentru tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06 s-au testat medii cu următoarele valori ale pH-ului inițial: 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0 și 8,0. Valorile pH-ului ale mediului de cultivare au fost determinate cu utilizarea pH-metrului Ino Lab.pH-720 WTW Germania (2010). S-a constatat că valoarea pH-ului inițial cea mai favorabilă pentru producerea enzimelor amilolitice la tulpina de *A. niger* CNMN FD 06 este de 5,0 -5,5.

Regimul de agitare este foarte important la cultivarea micromicetelor. Conform datelor prezentate de Zarnea G. (1980) [49] la cultivarea submersă a fungilor la suprafață se formează o „pânză” miceliană, care influențează aerarea culturii și defavorizează dezvoltarea normală a microorganismului. Pornind de la această constatare cultivarea clasică în retorte Erlenmayer s-a efectuat pe agitatoare rotative (180 - 200 rotații pe minut (în continuare - rpm)). În experiențele

la nivel de stație pilot s-a demonstrat că tulpina în studiu manifestă activitate de biosinteză a amilazelor mai sporită la micșorarea vitezei de agitare până la 100 rpm.

Regim de aerare. Fungii microscopici sunt organisme aerobe și dezvoltarea lor depinde de prezența oxigenului molecular. Cantitatea de oxigen ce se conține în mediul de cultivare este ne semnificativă, doar câteva grame la 1m^3 , necesitatea fiind însă mult mai mare [49]. Studiarea influenței aerării s-a efectuat prin varierea raportului de volume „aer - mediu nutritiv” prin utilizarea retorte Erlenmayer cu capacitate diferită: 250, 500, 750 și 1000 ml, în care s-a inclus un volum constant de mediu nutritiv lichid - câte 100 ml. Cultivarea s-a efectuat în condiții de agitare continuă și în condiții staționare [67]. S-a stabilit că la cultivarea producătorului în retorte cu capacitate de 250, 500 ml aerarea este insuficientă pentru sinteza enzimatică intensă. În condițiile experienței optimă pentru biosinteza amilazelor este cultivarea micromicetei în retorte cu capacitatea de 0,75, 1,0 L, gradul de aerare fiind mai mare și corespunzător este mai mare și suprafața de contact al fazei lichide cu aerul.

Durata cultivării. Cultivarea submersă, în retorte Erlenmayer cu capacitate de 1000 ml cu conținut de 200 ml de mediu nutritiv, la temperatura de $28-30^{\circ}\text{C}$ timp de 6 zile (144 de ore).

Cantitatea materialului de inoculare: În calitate de inoculum a servit suspensia de spori cu densitatea de 10^6 spori/ml, obținută prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii statice de 7-14 zile crescută în tuburi cu mediu de malț-agar înclinat. Pentru optimizarea și standardizarea materialului semincer s-a studiat influența tipului de material de inoculare - sporifer și vegetal cu vârsta - 24, 48 și 72 de ore pentru vegetal și 7, 10 și 14 zile pentru sporifer, volumul de inoculum - 2,5; 5,0; 10,0 și 12,5 % vol./vol cu densitatea de $2-3 \times 10^6$ spori/ml. Materialul de inoculare prezintă o masă densă cu miceliu bine dezvoltat de culoare gri-neagră și miceliu bine ramificat (examinată la microscop).

Pentru determinarea biomasei se aplică metoda gravimetrică, după uscarea acesteia la 105°C .

2.2.2. Selectarea mediului optim de cultivare și producere a amilazelor de către tulpina în studiu

Optimizarea mediului de cultivare s-a efectuat prin testarea unor rețete de medii nutritive recomandate în literatură ca efective pentru producerea amilazelor, două recomandate de Anghel A., și col., (1988) [1] și șase medii recomandate de Graceva I.M., (1989) [68] ca optimale pentru cultivarea fungilor. În mediile testate partea minerală este asigurată de sărurile mediului clasic de nutriție Czapek-Dox cu conținut de (g/L) MgSO_4 - 0,5; KCl - 1,5; CaCl_2 - 0,1; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - 9,0, în două medii KCl a fost substituit cu CaCl_2 - 0,1. Partea organică a fost asigurată prin înlocuirea

zăharurilor din mediul Czapek cu (g/L): amidon - 4; malț - 2,0; făină soia - 2,0; boabe de soia - 2,0; făină de fasole -2,0; făină de porumb - 6,0; extract de porumb - 10,0.

Martor a servit mediul de cultivare cu compoziția (g/L): amidon - 3,0; NaNO₃ - 0,9; FeSO₄ - 0,001; KH₂PO₄ - 0,1; MgSO₄ - 0,05; KCl - 0,09; apă din robinet, utilizat în cercetările de triere comparativă a potențialului de biosinteză a fungilor miceliali (etapa II).

Cultivarea în profunzime s-a realizat în retorte Erlenmayer de 750 ml cu 200 ml mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă pe agitatoare cu 180 - 200 rot/min, timp de 7 zile, la temperatura de 28 - 30⁰C. În calitate de inoculum a servit suspensia de spori cu densitatea de 10⁶ - 10⁷ spori/ml, în volum de 5 - 10 ml în raport cu volumul inoculat, obținută prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturilor de 12 - 14 zile, crescute pe medii agarizate înclinate.

La finele procesului de cultivare în lichidul cultural separat de biomasă prin filtrare mecanică și centrifugare s-a determinat activitatea amilolitică prin metoda colorimetrică cu iod [65, 67].

Biomasa s-a determinat gravimetric după uscarea acesteia la 105⁰C.

Condiții și parametrii de preparare a soluției stoc de compuși coordinativi.

Compușii coordinativi au fost adăuși la mediul de bază (M 1) după sterilizarea acestuia. Inițial s-a studiat influența a trei concentrații ale compușilor coordinativi: 1,0 mg/L; 5,0 mg/L; 10,0 mg/L. În calitate de control a servit mediul de bază, fără adaos de metalocomplecși. La fazele ulterioare ale investigațiilor s-au realizat cercetări în dinamică, fiind lărgit diapazonul de concentrații - 1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0 și 40,0 mg/L ale compușilor selectați ca perspectivi stimulatori de biosinteză a amilazelor.

Pentru studiul modificărilor morfologice ale micromicetei sub acțiunea compușilor coordinativi în procesul creșterii și dezvoltării culturii în fază lichidă au fost pregătite frotiuri în picătură strivită care s-au examinat la microscopul optic.

Probele de lichid cultural au fost menținute în frigider, la temperatura de +5⁰C, dozându-se, la interval de 24, 120 și 144 ore, activitatea amilazelor la pH-ul 4,7 și 2,5 de hidroliză a substratului. Rezultatele s-au exprimat procentual față de activitatea enzimatică inițială, considerată drept 100%.

În lichidul cultural, obținut la cultivarea microorganismelor, în lipsa compușilor coordinativi (proba martor) și în prezența compușilor coordinativi (experiment), a fost determinată activitatea amilolitică prin metoda colorimetrică cu iod, utilizând ca substrat soluția de 1% de amidon solubil [65, 67, 82, 88].

Condiții și parametrii de preparare a soluției stoc de nanoparticule.

În cercetări s-au utilizat nanoparticulele anorganice în baza de oxizi: TiO_2 , ZnO , (core-self) - în starea inițială în formă de lichide sau suspensii, talc - MgO_4 , SiO_2 , Fe_3O_4 , TiO_2 , ZnO în formă de praf oferite de Institutul de Inginerie Electronică și Nanotehnologii „D. Gițu” sau procurate ca reagenți de stabilizare ai nanoparticulelor prezentate în formă coloidală.

Nanoparticulele au fost introduse în mediile nutritive sterile odată cu materialul de inoculare, în concentrații de 5, 10 și 15 mg/L, iar nanoparticulele de $\text{TiO}_2 < 100$ nm au fost adăugate în concentrații de 10, 15 și 20 mg/L. Suspensiile de nanoparticule din formele inițiale ale preparatelor (lichide sau solide) au fost pregătite cu utilizarea apei deionizate cu pH-6,25. Nemijlocit înainte de a fi introduse în mediul nutritiv suspensiile de nanoparticulele obținute se sonifică 5-10 min. (câte 1min. discret repetat) în baie cu ultrasunet de tipul AOYUE-9050 (sau tip DA-968) Firma WilTec (Wildanger Technik) GmbH, Deutschland, 30W-50W, frecvența 40 kHz, până la obținerea dispersării omogene [181].

Studiul particularităților de dezvoltare, biosinteză și proprietățile morfo-culturale ale tulpinii în studiu s-au efectuat conform autorului Bilai V.I., (1988) [67]. Efectul biologic al nanoparticulelor a fost evaluat după gradul de modificare a activității enzimatică la micromiceta în cercetare. Activitatea amilazelor a fost determinată - prin metoda colorimetrică cu iod, după gradul de hidroliză a amidonului solubil până la dextrine cu masă moleculară variată, în condiții standard (pH 4,7) [67, 88].

Condiții și parametrii de utilizare a undelor milimetrice de intensitate joasă.

Cercetările de evaluare a influenței UMM de intensitate joasă au fost îndeplinite cu suportul financiar al Proiectului de grant „*Evaluarea efectelor acțiunii radiației milimetrice de intensitate mică asupra capacității biosintetice a microorganismelor cu semnificație în biotehnologie*” și „*Undele milimetrice coerente de intensitate joasă ca factor biostimulator și stabilizator ale proceselor biosintetice la microorganisme*” din cadrul Programului de Stat nr.6: Noi metode de diagnostică și tratament bazat pe acțiunea radiației milimetrice coerente asupra obiectelor medico-biologice. Conducătorul proiectelor de grant: dr. șt. biologice, conf. cercet. Alexandra Ciloci și conducătorul programelor - academicianul D.Ghițu.

Influența undelor milimetrice (UMM) de intensitate joasă ($1 \text{ mW/cm}^2 \div 10 \text{ mW/cm}^2$) asupra procesului de biosinteză a enzimelor amilolitice la tulpina *A. niger* CNMN FD 06 s-a studiat utilizând în calitate de generator de UMM de intensitate joasă dispozitivul „ЯВБ-1” cu destinație terapeutică care emite UMM cu $\lambda=5,6$ (53,8 GHz) în regim periodic și continuu, produs în or. Freazino (Federația Rusă) și dispozitivul UEM-3 (Republica Moldova), regim de emisie continuu, fracționat și cu impulsuri, lungimea de undă $\lambda = 4,9$ mm și $\lambda = 7,1$ mm.

Generatorul de UMM „ЯВЪ-1” a fost pus la dispoziție de către academicianul D. Ghițu, directorul Biroului Specializat de Construcții și Tehnologii în domeniul Electronicii Corpului Solid al Institutului de Fizică Aplicată.

Tratările cu unde milimetrice au fost supuse suspensiile apoase de spori a culturilor crescute timp de 12 - 14 zile pe suprafețe înclinate de malț-agar, la temperatura +28 - 30°C. Ca martor au servit probele inoculate cu material semincer nesupus tratării cu UMM.

Pentru stabilirea efectului parametrilor UMM asupra activității biosintetice a micromicetelor s-au studiat diferiți parametri, așa ca: influența lungimii de undă ($\lambda = 4,9, 5.6$ și $7,1$ mm), a regimurilor de emisie (cu impulsuri - 8 Hz, 16 Hz, fracționat, continuu și periodic) și a duratei de tratare (5 - 60 min, interval: 5, 15, 20, 30, 45, 60 min).

Cercetările au fost efectuate în dinamică pe parcursul a trei zile de cultivare: a 4-a, 5-ea, 6-a zi de cultivare. Sporii iradiați au fost crescuți submers la temperatura de 28 - 30°C, în condiții de agitare continuă 180 - 240 rot/min, în retortecu volumul de 750 ml cu 200 ml de mediu nutritiv timp de 6 zile.

2.2.3. Validarea rezultatelor la nivel de stație pilot

Cercetările de valorificare a biotehnologiilor avansate în vederea validării rezultatelor și stabilirii parametrilor tehnologici principali (concentrația O₂ dizolvat, viteza de agitare, intensitatea de aerare, durata ciclului biologic) s-au realizat prin cultivarea submersă a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 în condiții de stație pilot. Cultivarea tulpinii în studiu s-a efectuat în fermentatorul BIOSTAT^R A plus (Sartorius, Germania) (Fig. 2.2.) cu capacitate de 6,6 L, volumul de lucru 0,6-5 L, viteza de aerare, (L/min.) - 1,3-13,0 viteza de agitare (rpm) - 20 - 100. Activitatea enzimatică s-a evaluat în dinamică pe parcursul a 4 - 6 zile de cultivare.

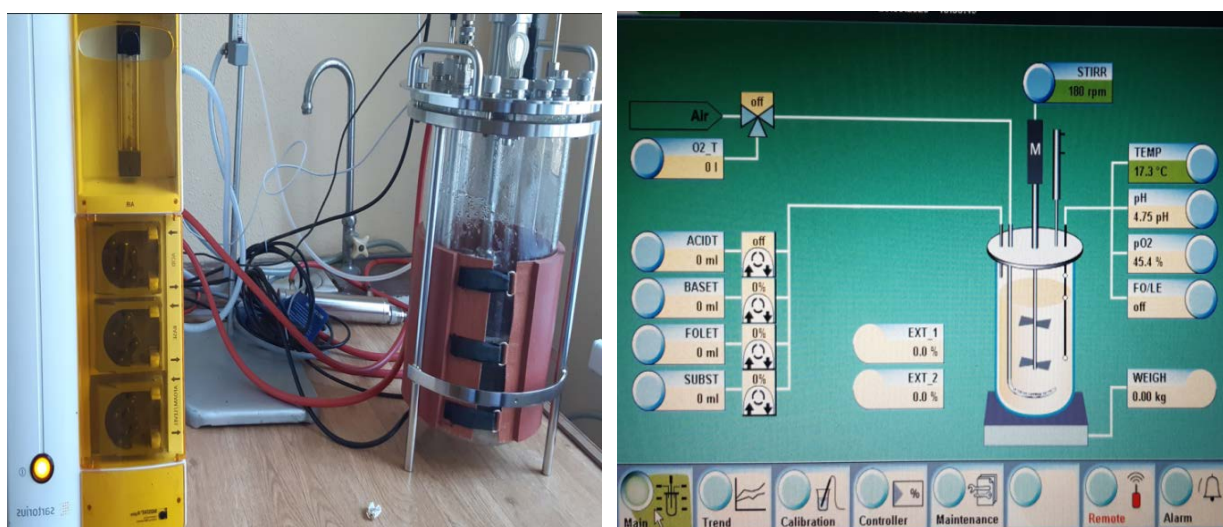


Fig. 2.2. Cultivarea tulpinii *A. niger* CNMN FD 06, în condiții de stație pilot, în fermentatorul BIOSTAT^R A plus (Sartorius, Germania)

2.2.4. Metode de separare și studiu al proprietăților fizico-chimice ale complexului enzimatic amilolitic sintetizat de tulpina A. niger CNMN FD 06

Separarea complexului enzimatic. Lichidul cultural (LC) a fost separat de biomasă prin filtrare, folosind filtre de hârtie. Ulterior filtratul de cultură a fost centrifugat la 3500 - 4000 rpm timp de 20 de minute. Separarea complexului enzimelor amilolitice din filtratul de cultură al micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 s-a realizat cu alcool etilic (C_2H_5OH - AE) de 96%, - solvent mai frecvent folosit în procesele industriale, răcit ($5^{\circ}C$), fapt ce permite obținerea preparatelor enzimatică cu grad de purificare G10 x. Activitatea amilolitică a șarjelor obținute a fost determinată la două valori de pH 2,5 și 4,7. Precipitatul obținut a fost uscat în exicator pe $CaCl_2$, la temperatura camerei, timp de 2 zile.

Studiul proprietăților fizico-chimice ale complexului enzimatic amilolitic. Influența pH-ului asupra activității amilolitice s-a determinat la valori de pH cuprinse între 2,8 - 10,0. Soluțiile - tampon utilizate au fost: citrat-fosfatul, pH 2,6 - 7,0 și soluția de glicină - NaOH (0,05 M), pH 8,0 și pH 9,0 [75,161].

Temperatura optimă de acțiune s-a determinat prin realizarea hidrolizei la 20, 30, 40, 50, 60, 70 și $80^{\circ}C$. Influența concentrației amidonului din substrat s-a determinat la valorile cuprinse între 0,5-5,0 %.

Pentru studiul termostabilității enzimelor amilolitice soluțiile de preparat enzimatic (în lipsă de substrat) au fost menținute timp de 15, 30, 60 min. la diferite temperaturi (30, 40, 50, 60 și $70^{\circ}C$ în lipsă de substrat. Ulterior, în probele de preparat supuse tratării termice s-a dozat activitatea amilolitică prin metoda colorometrică cu iod.

Pentru studierea stabilității la diferite valori de ale pH-ului, soluțiile de preparat cu valori ale pH-ului în diapazon de 3,0 - 10,0 s-au menținut timp de 24 de ore la temperatura de $20^{\circ}C$ în lipsă de substrat. Ulterior pH-ul a fost ajustat până la valoarea optimă de acțiune a enzimelor (pH 5,0) și s-a determinat activitatea amilolitică. În cercetările de stabilire a termo- și pH-stabilității rezultatele s-au exprimat procentual față de activitatea amilolitică inițială care s-a luat drept 100% [65, 75, 88].

2.3. Prelucrarea statistică a datelor

Prelucrarea statistică a datelor s-a efectuat conform metodelor acceptate pentru efectuarea cercetărilor medico-biologice [83]. Experiențele au fost repetate minim de trei ori, fiecare variantă - în trei probe. Prin metoda varietății de distribuire au fost calculați următorii indici ai datelor experimentale: media aritmetică (M), abaterea medie patrată (S), eroarea medie a mediei aritmetice (m), coeficientul variației (C) și veridicitatea (p). Diferențele semnificative au fost apreciate conform t-criteriului Student prin comparația în perechi a variantelor din experiment cu

varianta martor [83]. Eroarea în experiențe fiind relativ mică, rezultatul final a fost prezentat sub forma mediei aritmetice a trei analize paralele.

Prelucrarea statistică a datelor privind rezultatele a 3 - 5 repetări obținute s-a efectuat prin calcularea mediei, abaterii standard și intervalului de încredere. Prelucrarea matematică a datelor experimentale și interpretarea grafică a rezultatelor a fost efectuată cu ajutorul programului MS Office (Excel).

2.4. Concluzii la capitolul 2

1. Rezultatele cercetărilor, calitatea și veridicitatea datelor, în mare parte, depind de selectarea și utilizarea în conformitate cu scopul și obiectivele propuse a celor mai potrivite metode și tehnici de cercetare.

2. Atingerea obiectivelor trasate de elaborare a unor procedee argumentate de sporire a eficienței de sinteză și de valorificare a biotehnologiilor avansate, de producere a preparatelor enzimatică amilolitice competitive cu cele utilizate la scară mondială s-a realizat prin aplicarea metodelor clasice de screening și de cercetare microbiologică a tulpinilor de funghi din colecția laboratorului *Enzimologie*, precum și tulpini de funghi izolate din solurile din zona de centru a Republicii Moldova, care au servit drept obiecte de cercetare.

3. Utilizarea compușilor complexi și nanooxidilor metalici ca materiale de cercetare a permis valorificarea potențialului biosintetic al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 - potențial producător de amilaze exocelulare.

4. Cumulativ în cercetări au fost aplicate:

metode microbiologice de identificare a particularităților morfo-culturale și fiziologo-biochimice a culturilor, precum și de cultivare și păstrare a tulpinilor biologice-potențiali producători de produse biologice active;

metode fizico-chimice (gravimetrice, fotocolimetrice, spectrofotometrice, potențiometrice), biochimice și microbiologice clasice și moderne de apreciere a parametrilor tulpinii în studiu, a activității și calității compușilor biologici sintetizați;

metode standardizate, conform reglementărilor normative de obținere și evaluare a calității enzimelor amilolitice obținute;

metode de valorificare a cercetărilor la nivel de stație pilot;

metode matematice de planificare a experimentelor de analiză comparativă și de evaluare statistică a rentabilității preparatelor amilolitice obținute și tehnologiilor elaborate.

5. Astfel metodele clasice și moderne de cercetări fizico-chimice și microbiologice, echipamentele, mediile de cultură, selectate distinct și optimizate, au asigurat valorificarea potențialului biosintetic al micromicetei în studiu.

3. STABILIREA PARTICULARITĂȚILOR MORFO-CULTURALE ȘI FIZIOLOGO-BIOCHIMICE ALE TULPINII *A. NIGER* CNMN FD 06

Valorificarea microorganismelor ca surse de substanțe biologice active, selectarea și studierea celor cu însușiri productive majore, introducerea lor în cultură ca obiecte de perspectivă ale biotehnologiilor moderne, prezintă direcțiile prioritare de cercetare în microbiologie și biotehnologie. Instabilitatea capacității de producere, caracteristică microorganismelor, argumentează continuitatea și actualitatea cercetărilor în această direcție [5, 22, 25, 95, 102, 110].

Amilazele microbiene, datorită proprietăților lor tehnologice înalte - rezistența la temperaturi ridicate, activitate enzimatică în diapazon larg de pH, capacitate înaltă de lichefiere a gelurilor de amidon - cunosc o largă aplicare în diverse industrii. α - și β -amilazele, amiloglucozidazele de origine fungică și bacteriană reprezintă una din cele 4 grupe de enzime produse la scară industrială și care constituie 30% din preparatele enzimatice comerciale [90, 96, 122, 139, 141].

În Moldova preparatele enzimatice, inclusiv cele cu acțiune amilolitică, implicate în ramuri de mare tonaj ale economiei naționale cât și în medicină sunt importate de peste hotare la preț considerabil. Faptul determină necesitatea realizării investigațiilor de evidențiere a unor tulpini de microorganisme producătoare de amilaze ca surse accesibile, eficiente și stabile de enzime competitive, capabile să acopere necesitățile pieții în preparate enzimatice.

Selectarea unor tulpini noi de microorganisme producătoare de enzime, cu productivitate înaltă e dificilă, deoarece majoritatea metodelor de cercetare microbiologică nu sunt perfecte, mediile nutritive nu corespund cerințelor respective, identificarea culturilor necesită un volum mare de muncă [31].

Producători performanți de amilaze sunt recunoscuți fungii miceliali din diferite genuri și grupe taxonomice: *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Schizophyllum*, *Sclerotium*, *Sporotrichum*, *Trichoderma*, *Trichothecium* [1, 15, 41, 59, 70, 75, 81, 99, 103, 104, 107, 110, 111, 114, 123, 142], unele producându-le în cantități mari ca exoenzime în mediu de cultură, izolarea lor fiind simplă și puțin costisitoare [148, 151, 161, 164]. Avantajul preparatelor enzimatice produse pe bază de micromicete constă în stabilitatea lor în condiții extreme (enzime acidofile, termofile, psihrofile) [161, 187].

3.1. Evaluarea comparativă a capacității de sinteză a amilazelor exocelulare și selectarea mediului optim de cultivare a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06

În prima etapă a cercetărilor a fost efectuat screening-ul a 37 de tulpini de micromicete din diferite genuri (*Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Alternaria*) din colecția de laboratorului după capacitatea de a sintetiza amilaze exocelulare. Selectarea preferențială a tulpinilor de micromicete din genurile enumerate supra s-a făcut având la bază datele din literatura de specialitate [1, 15, 25, 41, 64, 75, 81, 99, 103, 107, 110, 111, 142, 215], care expun ca cei mai perspective producători de enzime exocelulare anume fungi din genurile *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* și *Trichoderma* (Tab. 3.1.).

Tabelul 3.1. Evaluarea comparativă a unor tulpini de fungi miceliali după criteriul de sinteză a amilazelor exocelulare

Nr. crt.	Tulpina fungică	Activitatea amilazică, (U/mL)
1	<i>Alternaria alternata</i>	2,08 ±0,11
2	<i>Aspergillus terreus</i>	1,70±0,04
3	<i>Aspergillus terreus</i> 65	1,87±0,02
4	<i>Aspergillus terreus</i> 67	1,50±0,06
5	<i>Aspergillus flavus</i>	1,37±0,14
6	<i>Aspergillus flavus</i> 76	1,37±0,14
7	<i>Aspergillus flavus</i> 76 (miceliu)	1,95±0,07
8	<i>Aspergillus niger</i> 33	8,47±0,08
9	<i>Aspergillus niger</i> 412	7,93±0,21
10	<i>Aspergillus</i> sp.	3,22±0,17
11	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,78±0,11
12	<i>Aspergillus</i> 57	0,33±0,04
13	<i>Aspergillus oryzae</i>	0,69±0,15
14	<i>Aspergillus awamori</i>	1,01±0,14
15	<i>Botrytis cinerea</i> 70	1,77±0,24
16	<i>Gliocladium venosum</i>	urm
17	<i>Fusarium oxysporum</i>	0,55±0,19
18	<i>Fusarium nivale</i>	urme
19	<i>Fusarium moniliforme</i>	urme
20	<i>Fusarium culmorum</i>	urme
21	<i>Penicillium corylophilium</i>	0,53
23	<i>Penicillium chrysogenum</i>	7,34±0,14
24	<i>Penicillium funiculosum</i>	8,15±0,14
25	<i>Penicillium nigricans</i> 0671	urme
26	<i>Penicillium nigricans</i> 0719	0,71±0,22
27	<i>Penicillium expansum</i> F 1703	urme
28	<i>Penicillium viride</i>	urme
29	<i>Rhizopus arrhizus</i> 67	2,51±0,18
30	<i>Rhizopus arrhizus</i> C	0,68±0,17
31	<i>Rhizopus nigricans</i>	0,55±0,20
32	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,87±0,14
33	<i>Rhizopus arrhizus</i> IX	0,88±0,10
34	<i>Trichoderma koningii</i>	3,46±0,13
35	<i>Trichoderma harzianum</i>	4,51±0,24
36	<i>Trichoderma lignorum</i>	1,92±0,19
37	<i>Trichoderma viride</i>	0,99±0,11

După cum urmează din datele tabelului 3.1. în condițiile experimentului activitatea amilolitică a fost înregistrată la nivel diferit (0,33-8,47 U/mL) la reprezentanți din toate genurile tulpinilor supuse trierii. Cele mai înalte valori a activității amilolitice în diapazonul 3,22-8,47 U/mL au manifestat tulpinile din genurile *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*.

Valori superioare a activității amilolitice au manifestat tulpinile *Aspergillus niger* 33 - 8,47 U/mL, *Aspergillus niger* 412 - 7,93 U/mL, *Aspergillus sp.* - 3,22 U/mL, *Penicillium funiculosum* - 8,15 U/mL și *Penicillium chrysogenum* - 7,34 U/mL.

În rezultatul cercetărilor preliminare s-au stocat ca potențiali producători de amilaze 20 tulpini, supuse trierii repetate (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Activitatea amilolitică a micromicetelor selectate la etapa preliminară de cercetare

Nr. crt.	Tulpina fungică	Activitatea amilazică (U/mL)
1	<i>Aspergillus niger</i> USA MV (România)	2,22±0,05
2	<i>Aspergillus terreus</i>	1,65±0,17
3	<i>Aspergillus terreus</i> 65	2,47±0,23
4	<i>Aspergillus terreus</i> 67	1,50±0,09
5	<i>Aspergillus flavus</i>	1,87±0,15
6	<i>Aspergillus flavus</i> 76	1,07±0,18
7	<i>Aspergillus flavus</i> 76 (miceliu)	2,25±0,05
8	<i>Aspergillus niger</i> 33	9,57±0,26
9	<i>Aspergillus niger</i> 412	9,39±0,25
10	<i>Aspergillus sp.</i>	6,44±0,14
11	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,98±0,14
12	<i>Trichoderma koningii</i>	4,57±0,08
13	<i>Trichoderma harzianum</i>	4,01±0,21
14	<i>Trichoderma lignorum</i>	2,72±0,11
15	<i>Penicillium corylophilium</i>	0,72±0,17
16	<i>Penicillium chrysogenum</i>	6,44±0,12
17	<i>Penicillium funiculosum</i>	9,05±0,15
18	<i>Rhizopus arrhizus</i>	2,31±0,05
19	<i>Botrytis cinerea</i> 70	0,77±0,06
20	<i>Alternaria alternata</i>	1,98±0,19

Ca rezultat al cercetărilor de triere, din 20 de tulpini de micromicete au fost selectate și incluse în colecția laboratorului Biotehnologia fungilor (Enzimologie) ca potențiali producători de amilaze exocelulare cu capacitate stabilă de biosinteză 5 tulpini de micromicete - trei din genul *Aspergillus* și două din genul *Penicillium*, care, în condițiile experimentului, au manifestat activitate amilolitică superioară: *A. niger* 33 (9,57 U/mL), *A. niger* 412 (9,39 U/mL), *Aspergillus sp.* (6,44 U/mL), *P. chrysogenum* (6,44 U/mL), *P. funiculosum* (9,05 U/mL).

Din cele 5 tulpini de micromicete, ca obiect de studiu pentru cercetările noastre a fost selectată tulpina *A. niger 33*, care a manifestat cea mai înaltă capacitate biosintetică a amilazelor ($9,57 \pm 0,26$ U/mL) în comparație cu celelate tulpini de micromicete.

Conform datelor din literatură de specialitate producătorii de amilaze, pe medii ce conțin inductori (amidon, dextrine, lactoză, tărâțe de grâu și orz, făină de porumb, etc.), manifestă maximul sintezei enzimice la a 3-a - 6-a zi de cultivare. Prin cercetări multiple este constatat, de asemenea, că majoritatea fungilor miceliali intensiv sintetizează amilaze la valoarea pH-lui 4,5-5,0 [67]. Vârsta culturii are importanță și se determină individual experimental pentru fiecare tulpină de micromicete luată în studiu.

Parametrii sus menționați au fost susținuți în experimentul de cercetare comparativă a tulpinilor de micromicete producătoare de amilaze, utilizând mediu Czapek modificat prin substituirea zaharurilor cu amidon în calitate de inductor pentru sinteza amilazelor.

Cercetările au cuprins tulpinile fungice selectate anterior, care au manifestat capacitate de biosinteză a complexului amilolitic, fiind suplimentate cu alte tulpini din colecția Laboratorului de Enzimologie, precum și cu tulpini neidentificate izolate din sol. Condițiile de cultivare au fost menținute aceleași. pH-ul inițial al mediului de cultivare era 6,0.

Pentru determinarea activității amilolitice lichidul cultural s-a colectat în ziua a 4-a, a 6-a și a 7-a de cultivare.

Pornind de la datele din literatura de specialitate și cercetările prezentate de Cvesitadze Gh., (1984) [75], în condițiile cultivării submerse fungii din genul *Aspergillus*, sintetizează două forme de enzime amilolitice: grupul *flavus -oryzae* produc forme acid-labile, grupul *niger*, produc forme acid-stabile, care în condițiile pH 2,5 timp de 30 de minute își păstrează 90% din activitatea inițială.

În scopul verificării tipului de amilaze exocelulare sintetizate de tulpinile în cercetare în lichidul de cultură a fost determinată activitatea a două tipuri de amilaze *acid-labile* (standarde sau ordinare, pH 4,7) și *acid-stabile* (care își păstrează activitatea la valoarea de pH 2,5).

Ca rezultat al cercetărilor de triere au fost selectate și incluse în colecția laboratorului Enzimologie ca perspectivii producători de amilaze exocelulare cu capacitate înaltă și stabilă de biosinteză a amilazelor exocelulare 6 tulpini de micromicete care, în condițiile experimentului, au manifestat activitate amilolitică superioară: *A.niger 412* (49,99 - 97,79 U/mL), *A. niger 33* (79,63 - 114,14 U/mL), *Trichoderma harzianum* (64,40 - 124,09 U/mL), tulpinile nr. 77 (46,16 - 76,11 U/mL), nr. 209 (57,89 - 95,70 U/mL), nr. 222 (64,40 - 124,09 U/mL).

Totodată capacitatea sporită de sinteză enzimatică în condițiile cu valori ale pH 4,7 și în condiții extreme (pH 2,5), care asigură perspective de utilizare a preparatelor în diferite industrii

a fost stabilită la două tulpini din genul *Penicillium*, valori superioare fiind înregistrate la *Penicillium funiculosum* (53,44 - 83,74 U/mL) și *Penicillium chrysogenum* (45,59 - 76,63 U/mL), care de asemenea au fost incluse în colecția laboratorului. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tab.3.3.

Tabelul 3.3. Evaluarea comparativă a unor tulpini de fungi miceliali după criteriul de sinteză a amidazelor exocelulare pe mediul ce conține inductor (0,3% amidon)

Nr. crt	Tulpina	Activitatea amilolitică, U/mL					
		pH 4,7			pH 2,5		
		4 zile	6 zile	7 zile	4 zile	6 zile	7 zile
1	<i>Alternaria alternata</i>	8,66	1,89	0,69	19,84	8,32	2,15
2	<i>Aspergillus terreus</i> 65	8,50	14,39	13,98	0,00	16,18	4,89
3	<i>Aspergillus flavus</i> 76	5,058	4,34	6,14	0,00	8,52	8,69
4	<i>Aspergillus flavus</i> 76 (miceliu)	0,00	19,95	36,02	0,00	36,18	83,76
5	<i>Aspergillus niger</i> 33	21,65	49,99	79,63	39,68	94,16	114,14
6	<i>Aspergillus niger</i> 412	10,62	49,99	6,9	61,47	97,79	10,62
7	<i>Aspergillus sp.</i>	7,13	46,16	20,15	30,73	76,11	43,05
8	<i>Aspergillus niger</i> USA MV (România)	10,50	17,37	19,95	34,28	49,18	48,79
9	<i>Rhizopus arrhizus</i>	1,79	1,89	12,14	0,00	6,14	48,89
10	<i>Rhizopus orizae</i>	6,29	9,48	32,16	2,12	7,29	29,77
11	<i>Penicillium chrysogenum</i>	21,52	25,99	45,59	76,63	54,21	65,94
12	<i>Penicillium funiculosum</i>	9,98	15,75	53,44	43,05	48,13	83,74
13	<i>Trichoderma koningii</i>	7,16	5,74	6,87	0,00	6,87	6,87
14	<i>Trichoderma harzianum</i>	17,89	64,40	20,12	85,26	124,09	43,36
15	<i>Trichoderma lignorum</i>	9,05	25,85	7,60	0,00	2,87	8,52
16	Nr.12	21,52	25,99	37,55	22,97	72,37	66,61
17	Nr.13	4,51	0,85	7,23	0,00	3,96	11,98
18	Nr.14	8,50	14,39	23,98	0,00	36,18	48,89
19	Nr. 10T	0,00	19,95	36,02	0,00	36,18	83,76
20	Nr. 57	3,49	1,20	10,50	36,18	5,05	9,05
21	Nr. 77	7,13	46,16	20,15	30,73	76,11	43,05
22	Nr. 209	21,52	15,75	57,89	65,10	72,37	95,70
23	Nr. 222	17,89	64,40	20,12	85,26	124,09	43,36
24	Nr. 223	3,60	0,85	7,60	0,00	2,87	8,52
25	Nr. 1T	1,60	0,504	11,77	0,00	3,60	52,53
26	Nr. 228	6,48	18,34	10,84	19,84	30,55	18,84
27	Nr. 229	3,60	4,34	2,15	0,00	8,69	4,33
28	Nr. 231	2,87	3,64	0,00	0,00	5,06	0,00

Micromiceta *Aspergillus niger* 33, care a manifestat rezultate mai stabile, confirmând potențialul superior de activitate amilolitică, inclusiv în condițiile de aciditate sporită (pH 2,5) a fost depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene cu cifrul atribuit CNMN FD 06 și a servit în calitate de obiect de studiu pentru investigațiile ulterioare.

Selectarea mediului optim de cultivare al micromicetei A. niger CNMN FD 06 cu potențial biosintetic amilolitic

Dintre factorii, care influențează modificarea proceselor biologice în celula microbiană, remarcabil este mediul nutritiv. Anume compoziția și abundența mediului nutritiv reglează dezvoltarea și activitatea biosintetică a celulei microbiene și influențează considerabil biosinteza enzimelor. Orice schimbare, care reduce consumul de materie primă sau energie, utilizarea în calitate de materie primă a deșeurilor și valorificarea acestora, este considerată mai ecologică și mai de perspectivă.

În acest aspect au fost inițiate cercetări de selectare a mediilor de cultivare, care să asigure realizarea maximă a potențialului de biosinteză a enzimelor amilolitice la tulpina în studiu.

La cultivarea submersă au fost utilizate mediile nutritive, recomandate din literatura de specialitate, ca efective pentru obținerea de amilaze, în compoziția cărora, în calitate de inductor, este utilizat amidonul sau substanțe bogate în amidon: extract de porumb, malț, făină de soia, făină de porumb, făină de fasole.

Astfel 6 variante de medii (nr. 1 - 6), recomandate de Graciova I.M [67], au un conținut de 2% de amidon sau făină de porumb (3%) în diverse combinații cu malț (1%), boabe de soia (1%) sau extracte de porumb (1%). Partea minerală al acestor medii era identică și conținea $MgSO_4$, KCl și $CaCl_2$. De importanță este conținutul $(NH_4)_2PO_4$ în aceste medii, astfel cum în conformitate cu constatările autorilor Dediuhina A.G., Eroșin V.K., (1991) [69] utilizarea acestor substanțe în calitate de sursă de azot intensifică semnificativ biosinteza amilazelor.

Mediile nr. 7 și nr. 8, utilizate în studiu, sunt recomandate de către Anghel A., Kaycka A., Datarey E., (1988) [1] ca optime pentru obținerea de amilaze și au în compoziția lor făină de fasole sau porumb, amidon, tărațe de grâu și săruri minerale.

În calitate de martor a servit mediul Czapek modificat care conține în calitate de inductor amidon (3%).

Tabelul 3.4. Activitatea amilolitică a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 pe medii cu diferite surse de amidon

Nr. mediului de cultură	Activitatea amilolitică	
	U/mL	% față de martor
1	88,30 ±0,11	961,87
2	21,10±0,07	229,84
3	13,67±0,01	148,91
4	77,60±0,15	845,31
5	13,85±0,35	148,91
6	10,40±0,02	113,28
7	6,33±0,41	68,95
8	143,40±0,07	1562,09
martor	9,18±0,19	100

Rezultatele arată că mediile testate sunt foarte favorabile pentru culturile din genul *Aspergillus*. Astfel tulpina *A. niger* CNMN FD 06 a manifestat activitate înaltă pe mediile nr. 1, 4 și 8 și constituie, respectiv, 88,30 U/mL, 77,60 U/mL și 143,40 U/mL. Astfel, cele mai înalte rezultate pentru tulpina în studiu au fost marcate pe mediile de cultură care, în calitate de surse naturale de carbon și azot, cât și în calitate de inductor, conțin amidon, făină de porumb sau fasole, extract de porumb, tărațe de grâu, așa cum este recomandat și de literatura de specialitate [1, 49, 64, 68, 79, 141].

În rezultatul cercetărilor a fost stabilite drept optimal pentru cultivarea tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 mediul de nutriție cu numărul 8, care are în compoziție, în calitate de sursă suplimentară de azot, făină de fasole și asigură valorificarea deșeurilor producțiilor agricole prin macerarea și utilizarea tăraței de grâu.

3.2. Aspecte morfo-culturale și fiziologo-biochimice ale micromicetei în studiu

Particularitățile morfo-culturale ale tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 au fost cercetate la cultivarea pe diferite medii nutritive agarizate: Reistrick, Czapek, malț-agar, malț-agar-amidon 1% (Tab. 3.5). Cultivarea s-a efectuat pe medii solide, pe cutiile Petri, la temperatura de 28°C, timp de 12 zile.

Tabelul 3.5. Creșterea și sporularea tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 pe medii nutritive agarizate

Mediul nutritiv	Intensitatea creșterii și sporulării													
	1-a zi		a 2-a zi		a 3-ea zi		a 4-a zi		a 5-ea zi		a 6-a zi		a 7-a zi	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
Reistrick	-	-	-	-	+	-	++	+	++	+	++	+	++	+
Czapek	-	-	+	-	++	+	++	++	+++++	+++++	++++	++++	+++	+++
Extract de malț	-	-	-	-	+	-	+	+	++	+	++	+	++	+
Extract de malț-1% de amidon	-	-	+	-	+	-	+	+	++	+	++	+	++	+

Legendă: C- creșterea coloniilor; S- sporularea.

Urmărind pe parcursul a 7 zile intensitatea procesului de creștere și sporulare se observă că micromiceta începe procesul de sporulare abia în ziua a 3-ea, intensitatea procesului fiind influențată de compoziția mediului de nutriție. În condițiile experimentului *A. niger* CNMN FD 06 prezintă o creștere și sporulare intensă, în ziua a 5-ea de cultivare, pe mediul Czapek agarizat.

În funcție de mediul de cultură coloniile tulpinii de *A.niger* CNMN FD 06 se deosebesc după caracteristicile morfologice, dimensiunile și forma coloniilor, culoarea miceliului și intensitatea sporulării (Tab. 3.6.).

Tabelul 3.6. Particularitățile morfologice ale coloniilor micromicetei

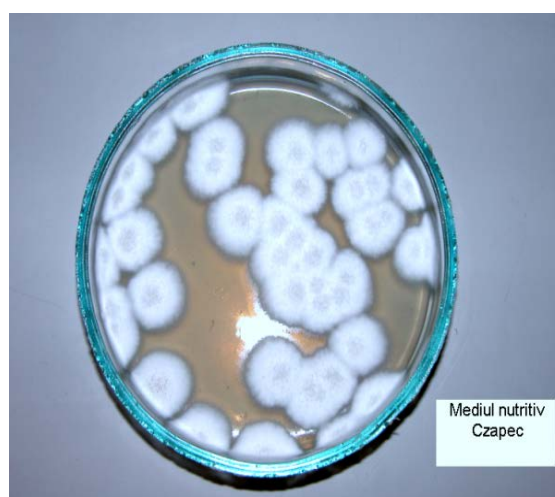
***A. niger* CNMN FD 06 pe diferite medii nutritive**

Nr.	Tipul mediului	Aspectul coloniilor	Diametrul coloniilor, mm	
			3-ea zi	5-ea zi
1.	Reistrick	Colonii de formă sferică definitivate, cu margine radială. Miceliu alb-gri, neaderent la substrat (pufos), centrul coloniei de culoare mai deschisă. Rezervuum galben pal cu septuri radiale. Miros slab, specific de mucegai. Exudatul este prezentat de picături mărunte, incolore. Sporularea este slabă.	7,0	20,0
2.	Czapek agarizat	Colonii de formă sferică, fără septuri radiare. Miceliul catifelat, aderent la substrat. Sporii de nuanță bej spre cafeniu, repartizați în partea centrală a coloniei. Rezervuum incolor. Marginea coloniilor prezintă o bordură alb spre gri. Se sesizează un miros specific de mucegai. Exudatul lipsește.	12,0	27,0
3.	Extract de malț agarizat	Colonii bine dezvoltate, intens sporulate cu septuri radiare. Miceliul cenușiu-închis neaderent, pufos. Sporii cenușii-cafenii. Rezervuum cafeniu deschis.	9,0	25,0
4.	Extract de malț-agar și 1% de amidon	Colonii de formă sferică intens brăzdate, miceliul aderent la substrat cu striatiumi radiale. Rezervuum cafeniu deschis cu bordură cafenie conturată. Sporii lipsesc. Exudatul lipsește, mirosul de mucegai sesizabil.	10,0	25,0

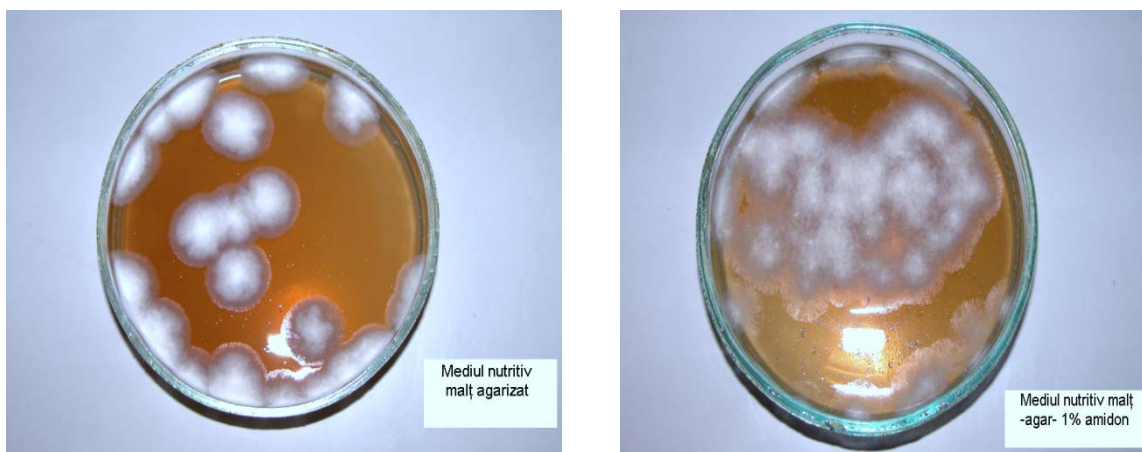
Coloniile crescute pe diferite medii diferă ca formă, aspect exterior și manifestă diferite particularități morfologice. Examinarea și descrierea coloniilor formate de micromicetă, marchează cea mai bună dezvoltare și sporulare pe mediul Czapek agarizat (Fig. 3.1).



a) Raistrick



b) Czapek agarizat



c) Malț agarizat

d) Malț agar +1% amidon

Fig. 3.1. Aspectul culturii *A. niger* CNMN FD 06 pe diferite medii agarizate

Aspecte ale variabilității naturale la tulpina *A. niger* CNMN FD 06. Conform datelor citate în reviu literaturii [178, 187], nivelul de sinteză a substanțelor biologice active este în dependență de mai mulți factori, inclusiv de tipul morfologic al coloniilor fungice. Criteriu de selecție a tipului morfologic a fost identificarea coloniilor cu potențial maxim de sinteză amilolitică la cultivarea tulpinii pe medii de nutriție suplimentați cu inductor specific pentru sinteza complexului amilolitic (amidon). Studiile din domeniu certifică faptul că în funcție de tipul coloniei activitatea de sinteză poate varia și această metodă aplicată frecvent pentru aprecierea activității enzimice, la etapele inițiale de selecție a tulpinilor producătoare de amilaze exolelulare, a fost aplicată la cultivarea tulpinii în studiu.

Cultivarea tulpinii în studiu, prin aplicarea diluțiilor zecimale de spori, spălați cu apă distilată sterilă de pe suprafața unei culturi bine sporulate crescută pe coloane oblice (Fig. 3.2, A), pe cutiile Petri cu mediul Czapek agarizat, suplimentat cu 1% de amidon, a permis identificarea coloniilor morfologic distincte (Fig. 3.2, B) și monitorizarea ciclului biologic al micromicetei



Fig. 3.2. Tulpina *A. niger* CNMN FD 06 crescută pe tuburi înclinate (A) și pe mediu agarizat (B)

pe parcursul a 12 zile pentru a identifica stabilitatea tulpinii și a selecta coloniile care s-au remarcat prin creștere abundentă, sporulare activă și particularități morfoculturale.

La etapa respectivă de cercetare au fost identificate 4 tipuri de colonii, care au fost transferate pe tuburi oblice de maț-agar și incubate la temperatura de 30⁰C. Repetat au fost făcute diluții de ordin 10¹⁰ și realizate pasaje pe cutiile Petri (Fig. 3.3., A, B, C, D).

La etapa următoare de cercetare, în scopul identificării potențialului de biosinteză al complexului amilazic al tulpinii în studiu, după incubarea repetată pe medii înclinate au fost inoculate în mediu lichid și determinată activitatea amilolitică, pentru a stabili dacă aspectele respective sunt cauzate de variabilitate spontană, care, în cadrul populațiilor de microorganisme, generează apariția în colonii a variantelor morfologice noi. Mulți autori susțin că acest proces la microorganisme are importanță adaptivă [6, 60, 141] și se manifestă mai accentuat decât la organismele superioare reieșind din perioada scurtă de generație, mutații frecvente, recombinări frecvente și schimb de material genetic.

Astfel cum, variabilitatea naturală poate duce la pierderea proprietăților biosintetice prețioase și degenerării tulpinii fungice, dar și la asigurarea posibilității de selectare a celor mai active variante din populații, fapt condiționat de adaptarea organismului la condițiile de mediu [51, 52, 59], s-au efectuat cercetări în vederea identificării, selectării, separării și studierii capacității de hidroliză enzimatică la aspectele de variabilitate naturală identificate la tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06.

La prima etapă tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06, de pe medii înclinate de agar de 6-7 B, a fost cultivată pe mediu agarizat pe cutiile Petri la temperatura de 28-30⁰C timp de 14 zile, fiind diluată soluția de spori în raport de 1:18. Variațiile morfologice delimitate au fost semănate pe medii înclinate agarizate și în retorte Erlenmayer care conțineau 200 ml de mediu nutritiv lichid cu compoziția selectată anterior drept optimală pentru tulpina în studiu. Retortele Erlenmayer cu mediu nutritiv inoculate cu cultura de *A. niger* CNMN FD 06 au fost plasate pe agitator (180-200 rot/min) la temperatura de 28-30⁰C, timp de 6 zile. În lichidul cultural, prin metoda colorimetrică cu iod, a fost determinată activitatea a două tipuri de amilaze: acid-labile (hidroliza substratului de amidon de 1% are loc la pH 4,7) și acid-stabile (hidroliza amidonului are loc la pH 2,5) pentru fiecare variantă morfologică. Unitate de activitate amilolitică a fost admisă cantitatea de enzimă, care în condiții determinate de pH, temperatură și durată de acțiune, catalizează hidroliza unui gram de amidon până la dextrine cu masa moleculară diferită [67]. În calitate de martor a servit suspensia de spori a tulpinii fungice inițiale, inoculată în același mediu nutritiv. Cultivarea în mediu submers s-a repetat la intervale de 14 zile, determinându-se dacă variațiile interpopulaționale își mențin capacitatea de hidroliză enzimatică.

În rezultat au fost izolate 4 tipuri de colonii ale tulpinii *A. niger* CNMN FD 06, notate simbolic prin A, B, C, D (Fig. 3.3). Fiecare tip de colonie se deosebește prin particularitățile culturale, astfel:

Tipul A: Miceliul pufos, aderent la substrat. Sporulare intensă în cea de-a 2-3 zi de cultivare. Spori de culoare neagră, concentrați în clistocarpî. Conidioforii medii, predominanți în partea centrală a culturii. Marginea coloniei are o bordură albă asporulată. Exudatul lipsește. Reversul cafeniu-pal cu striățiuni radiare. Fără miros, diametrul 4.8 cm.

Tipul B: Colonii catifelate cu miceliul aderent la substrat. Conidioforii incolori scurți. La sporulare apare culoarea gri. Reversul fără striățiuni, de culoare cafenie cu bordură de un cafeniu mai intens. Marginile coloniei sunt netede, diametrul 4,0 cm.

Tipul C: Coloniile de formă sferică definitivată, constituite din miceliu catifelat de culoare bej. Miceliul ațos, aderent la substrat. Partea centrală puțin bombată, mai întunecată. Prezența streățiunilor radiare. Reversul cafeniu deschis. La marginea coloniei se delimitează un cerc concentric. Exudatul lipsește, diametrul 2,7 cm.

Tipul D: Miceliul aderent la substrat. Bordură de culoare bej, prezența brazdelor concentrice. Marginile netede. Fără exudat. Reversul cafeniu-deschis cu discuri concentrice de culoare mai intensă. Diametrul 1,5 cm.

Toate variantele morfologice identificate manifestă o sporulare intensă la cea de-a 12-a - 14-a zi, respectiv culturile capătă nuanța cafenie - neagră, caracteristică aspergililor negri.



A



B



Fig. 3.3. Aspecte ale variațiilor morfologice la tulpina *A. niger* CNMN FD 06, ziua a 3-ea

În continuare tipurile de colonii identificate cu particularități distincte au fost testate la capacitatea de enzimogeneză a complexului amilolitic. Testarea a fost efectuată în 3 etape. În calitate de martor a servit tulpina inițială *A.niger* 33.

Pentru fiecare tip morfologic a fost testată activitatea amilolitică în cea de-a 6-a zi de cultivare. Rezultatele primei etape de cercetare sunt prezentate în Fig. 3.4.

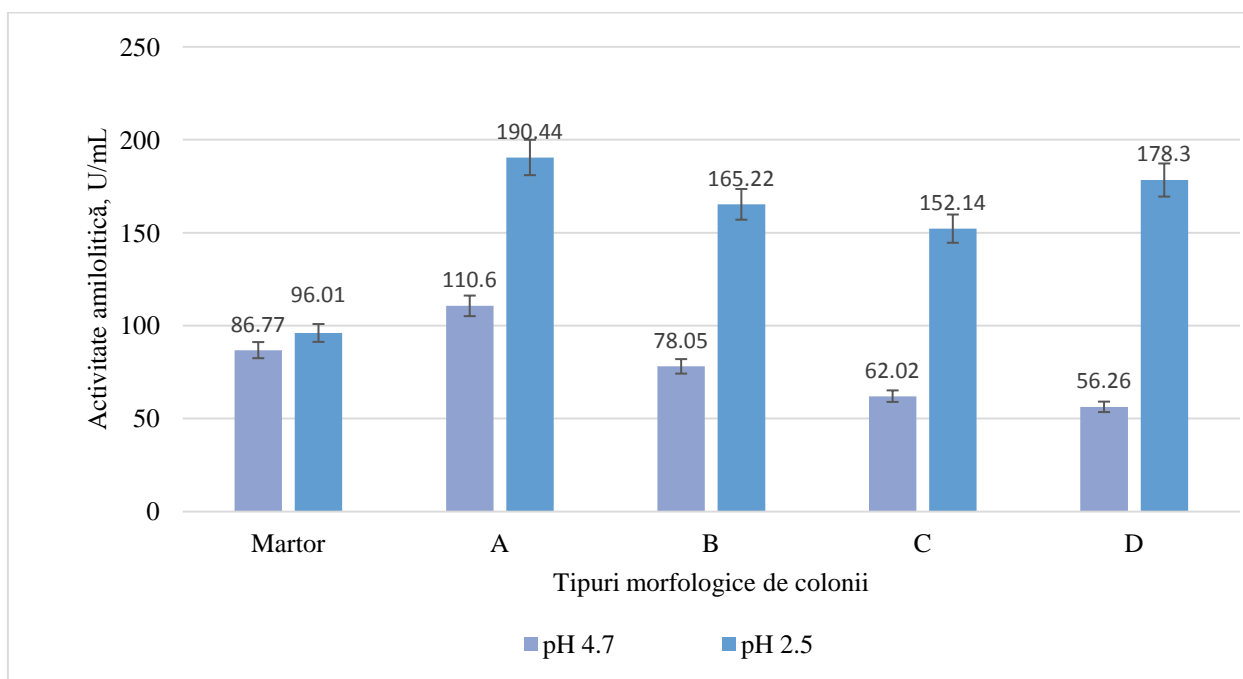


Fig. 3.4. Dinamica activității amilolitice (U/mL) a variantelor identificate la tulpina *A. niger* CNMN FD 06 (etapa I)

Rezultatele obținute remarcă faptul, că cea mai productivă din punct de vedere al sintezei enzimelor amilolitice este varianta A, care, în condiții standard de hidroliză enzimatică - pH

4,7, prezintă un spor de 27,46% față de martor, iar în condiții mai aspre de hidroliză - pH 2,5 manifestă o creștere de 98,37%. Celelalte colonii își manifestă, în special, capacitatea de enzimogeneză a amilazelor acidstabile, pe când sinteza amilazelor acid-labile este mai scăzută în comparație cu tulpina martor. Noile tipuri de colonii izolate au un potențial mai sporit pentru sinteza amilazelor acid-stabile.

Studiul activității amilolitice la coloniile izolate, crescute pe medii înclinate de malț-agar la temperatura de 28-30⁰C, a fost repetat peste 14 zile. Variantele separate au fost cultivate submers pe mediul nutritiv nr. 8, selectat anterior ca optim pentru manifestarea capacității de sinteză a enzimelor amilolitice la tulpina în studiu, iar în lichidul cultural s-a determinat activitatea complexului amilolitic la valorile de pH 4,7 și respectiv la pH 2,5, pentru a determina dacă variantele care manifestă particularități de variabilitate naturală a populației de *A. niger* CNMN FD 06 au moștenit aceiași capacitate de hidroliză enzimatică. Rezultatele studiului activității amilolitice la fiecare disociant al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 sunt prezentate în Fig. 3.5.

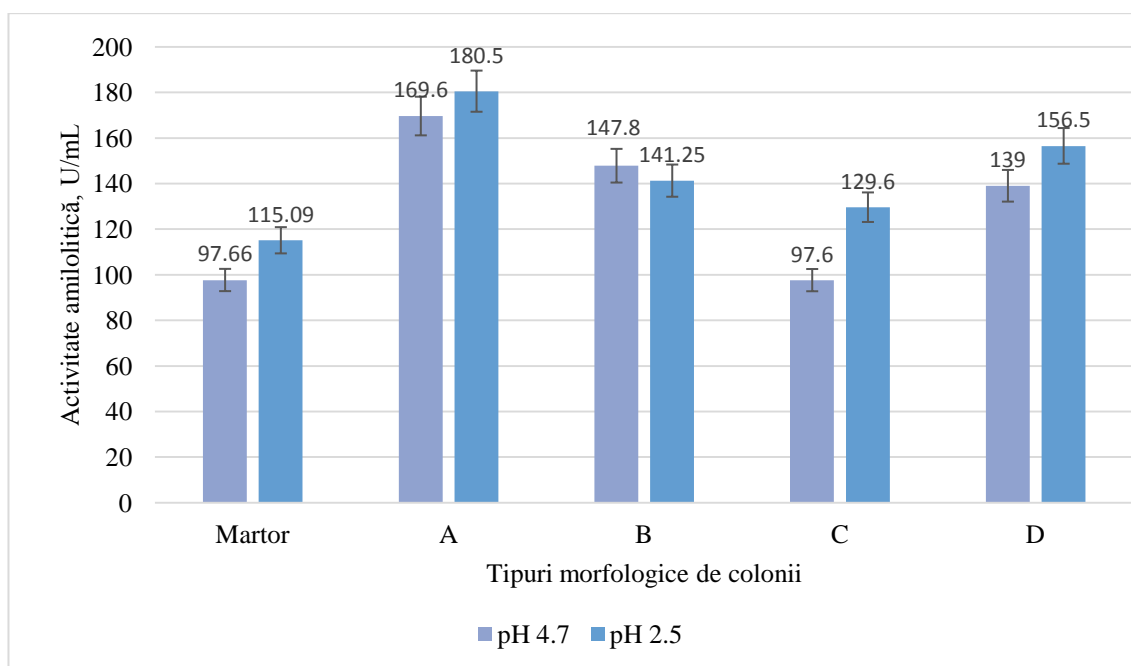


Fig. 3.5. Dinamica activității amilolitice (U/mL) la variantele separate la tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06 (etapa II)

Rezultatele obținute au arătat că, la cultivarea submersă în mediul nutritiv nr. 8 tipul de colonii A își menține activitatea amilolitică atât pentru amilazele acid-labile constituind 169,58 U/mL, cât și pentru amilazele ce hidrolizează substratul în condiții de aciditate sporită la pH 2,5 fiind de 180,47 U/mL marcând cei mai înalți indici. Coloniile de tip B și D, care au particularități

morfologice asemănătoare, prezintă rezultate apropiate 147,78 U/mL și 139,07 U/mL pentru amilazele acid-labile și 141,25 U/mL și 156,50 U/mL corespunzător pentru amilazele acid-stabile. O activitate mai mică a prezentat și la etapa a doua de cercetare coloniile de tip C, marcând o activitate amilolitică la nivelul matorului la hidroliza realizată la pH-ul 4,7 și cu o sporire neesențială pentru amilazele acid-stabile. Etapa a treia a cercetărilor a constat în cultivarea repetată a variantelor separate peste 14 zile. Rezultatele investigațiilor sunt prezentate în Fig. 3.6.

Capacitate mai sporită de enzimogeneză amilolitică manifestă varianta A, sporindu-și potențialul de sinteză a enzimelor amilolitice la ambele valori de pH, astfel înregistrând o creștere cu 181,28% pentru hidroliza la pH 4,7 și cu 204,88% la hidroliza amilazelor acid-stabile. Varianta C repetă rezultatele prezentate la etapa II, pentru amilazele acid-labile activitatea fiind de 96,52 U/mL, iar pentru cele acid-stabile menținându-se aproape de nivelul matorului - 118,86 U/mL.

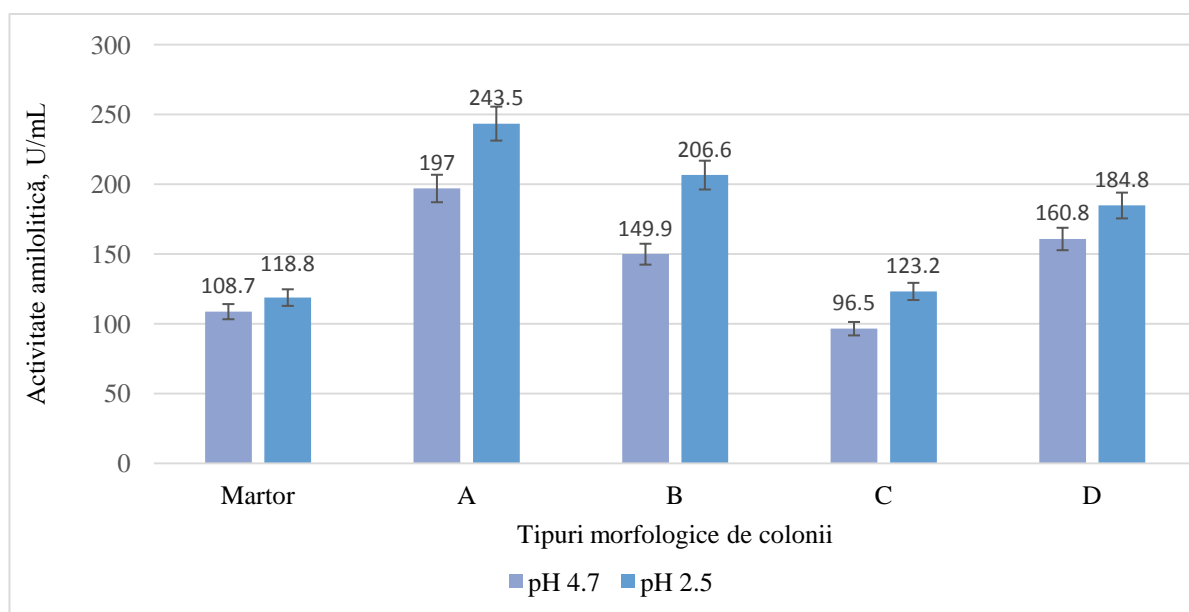


Fig. 3.6. Dinamica activității amilolitice (U/mL) la variantele separate la tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06 (etapa III)

Astfel, cercetările variabilității naturale a tulpinii în studiu au permis segregarea culturii în variante morfologice distincte, identificarea variantelor cu potențial sporit de sinteză a enzimelor amilolitice și utilizarea acestora în cercetările ulterioare.

Totodată, pentru a ne asigura de raționamentul cercetărilor ulterioare au fost verificați parametrii de ecotoxicitate a tulpinii în studiu, fiind determinată toxicitatea primară a lichidului cultural.

Ecotoxicitatea directă (toxicitatea primară) a fost apreciată în baza testului pe cultura de parameciu (*Paramecium caudatum*), fiind urmărit efectul interacțiunii micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 (sub formă de extract apos) cu *Paramecium caudatum*, organism unicelular, care sub acțiunea factorilor externi poate reacționa rapid modificând semnele vitale: metabolism, creștere și dezvoltare, reproducere, viabilitate. Studiul de sensibilitate, iritabilitate, adaptabilitate și viabilitate a culturii de *Paramecium caudatum* la acțiunea diferitelor substanțe chimice sunt unele dintre problemele biologiei moderne. Drept criteriu de apreciere a sensibilității test-obiectului a servit timpul de la începutul interacțiunii micromicetei studiate (sub formă de extract apos) cu *Paramecium caudatum* până la moartea celulelor, constatată prin stabilirea timpului de stopare a mișcării parameciilor și descompunerea acestora. În conformitate cu metoda aplicată micromicetele puternic toxice provoacă moartea parameciilor în primele 3 minute de contact, cele toxice - peste 8-20 de minute, slab toxice - peste 1-3 ore, foarte slab toxice - peste 16-24 ore și netoxice nu provoacă moartea parameciilor timp de 24-48 ore.

Lichidul cultural al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 a fost testat în dinamică timp de 5 zile urmărindu-se viabilitatea parameciilor, care continuau să se miște liniar peste 3 ore de interacțiune, ceea ce a permis calificarea micromicetei ca fiind „foarte slab toxic” [43, 89].

3.3. Stabilirea dependenței biosintezei amilolitice de valorile de t°C și durata de cultivare a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06

Biosinteza enzimelor este influențată de starea fiziologică a microorganismului - producător și de un șir de factori fizici și chimici de cultivare ca: pH, temperatura, durata cultivării fiind esențiali pentru biosinteza și acumularea în cantități maxime ale enzimelor [1, 9, 14, 37, 39, 49, 51, 56, 68, 86, 141]. Acești factori determină viteza de dezvoltare și multiplicare a microorganismului, de formare și inactivare a enzimei, rata disocierii culturii, conducând la modificarea activității de biosinteză a tulpinilor producători [97].

Tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06 fiind mezofilă, pe mediul Czapek agarizat, crește în limitele +5°C - +38°C, manifestând o creștere intensă la temperatura optimă de +28°C - +30°C. În procesul fiziologic și de biosinteză asimilează bine azotul amoniacal, nitrații și nitriții.

Pentru a determina temperatura optimă de cultivare, care favorizează sinteza maximală a amilazelor extracelulare, a fost întreprinsă cultivarea tulpinii în trei regimuri de temperatură (20°C, 30°C și 40°C). Cultivarea tulpinii a fost efectuată pe mediul nr.8. Activitatea amilazelor a fost determinată în condiții ale pH-ului standard (pH 4,7) și condiții acide (pH 2,5) [75].

În Fig.3.7. este prezentată dinamica biosintezei amilazelor extracelulare a tulpinii *A.niger* CNMN FD 06 la cultivarea submersă și la valorile temperaturii de 20°C în decurs de 2-9 zile.

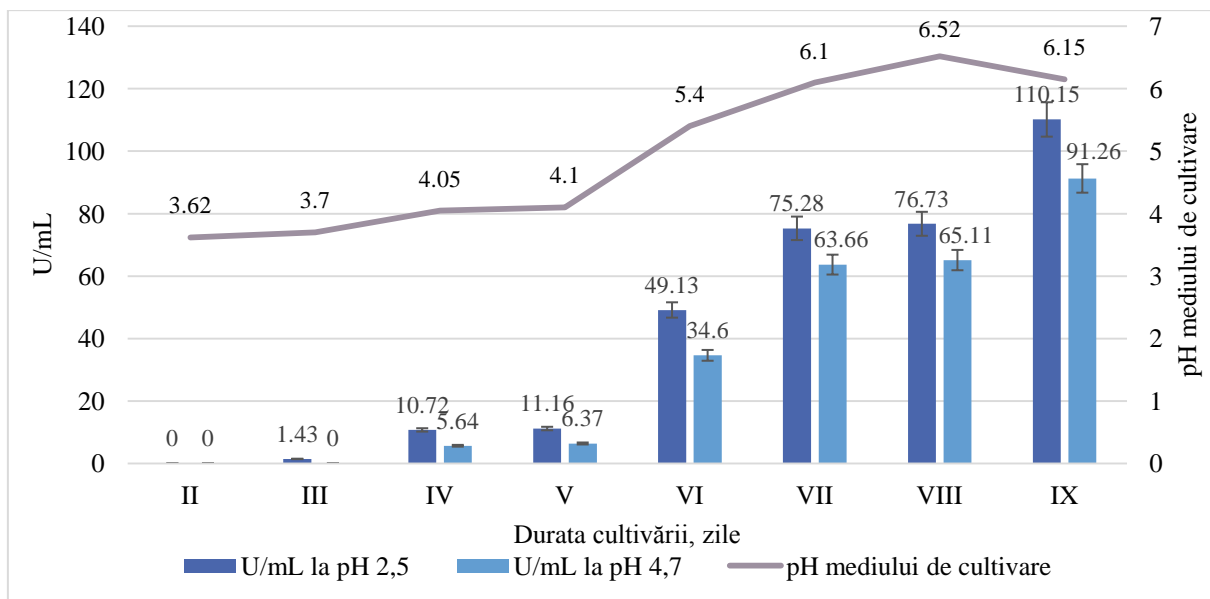


Fig. 3.7. Biosinteza amidazelor extracelulare la tulpina *A. niger* CNMN FD 06 la 20°C

S-a stabilit că, la temperaturi mai scăzute (20°C) procesele de biosinteză sunt lente. Prima manifestare a activității amidazelor se înregistrează în a șasea zi de cultivare. Se urmăresc două maxime de activitate în ziua a 7- a și a 9-ua de cultivare, activitatea constituind respectiv 63,66 U/mL și 91,26 U/mL determinată în condiții standard la pH 4,7 și 75,28 U/mL și 110,15 U/mL în condiții acide la pH 2,5 [75].

Totodată din rezultatele obținute se poate remarca, că în procesul de cultivare submersă pH-ul lichidului cultural deviază de la valoarea inițială 5, oscilând în limitele 3,62-6,52 pe parcursul cultivării microorganismului. În acest interval pe curbă se înregistrează două maxime de aciditate: în ziua a 3-ea și a 6-7-a, mai evidențiat limitate fiind la temperatura 30°C (Fig. 3.8.) și 40°C (Fig. 3.9).

Rezultatele expuse în Fig. 3.8. prezintă o intensificare a procesului de biosinteză, care se remarcă în cea de-a 3-ea zi de cultivare cu valori ale activității amidolitice cuprinse între 32,55 U/mL la pH 4,7 și respectiv 55,80 U/mL în condiții extrem acide la pH 2,5. Valori comparative de 34,6 U/mL și corespunzător 49,13 U/mL, la cultivarea micromicetei la 20°C, erau atinse abia în ziua a 6-a.

Mărirea temperaturii de creștere cu 10°C (de la 20°C la 30°C) indică maxime mai pronunțate de activitate, începând cu ziua a 4-a de cultivare, valorile maxime fiind atinse în ziua a 6-ea de cultivare - 97,0 U/mL pentru amidazele acid-labile (pH 4,7) și 114,5 U/mL pentru amidazele acid-stabile (pH 2,5).

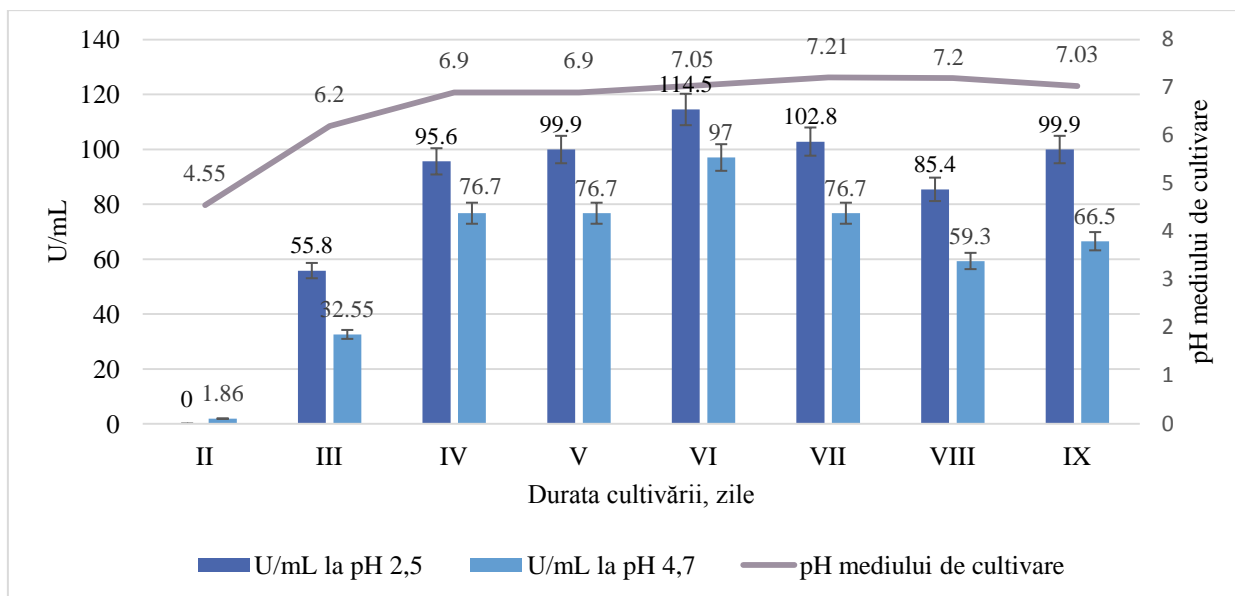


Fig. 3.8. Biosinteza amidazelor extracelulare la tulpina *A. niger* CNMN FD 06 la 30°C

Mărirea temperaturii până la 40°C (Fig. 3.9) provoacă scăderea considerabilă a activității amidazelor, înregistrând în ziua a 6-a și 41,3 U/mL - la pH 4,7 și 62,34 U/mL la pH 2,5, corespunzător. La această valoare de temperatură se remarcă intensificarea procesului de biosinteză, primul maxim revenind zilelor a 2-a și a 3-ea de cultivare.

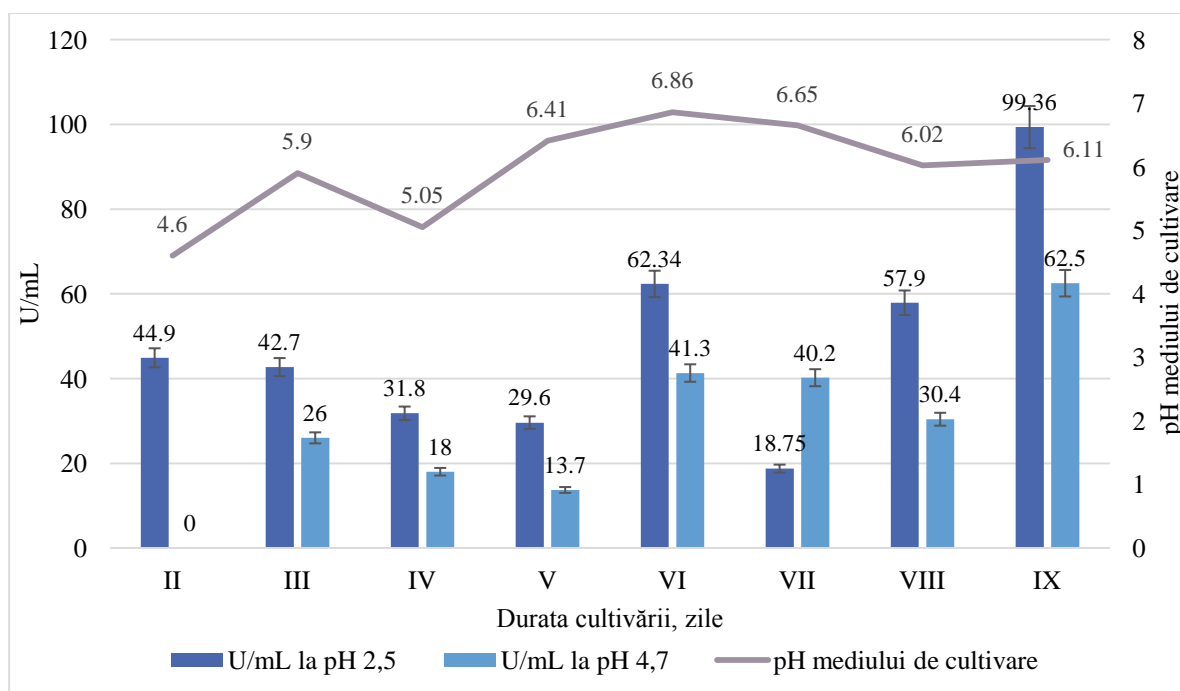


Fig. 3.9. Biosinteza amidazelor extracelulare la tulpina *A. niger* CNMN FD 06 la 40°C

Rezultatul confirmă faptul, că tulpina în procesul activității vitale reglează aciditatea mediului, însușire marcată la micromicete și de alți cercetători [17, 37, 161].

Paralel au fost efectuate vizualizari microscopice a tulpini *A. niger* CNMN FD 06 pe durata cultivării. Rezultatele obținute atestă faptul că, în perioada de cultivare 3-5 zile

producătorii se află în faza staționară de dezvoltare. Anume acestei perioade îi revin primele maxime de biosinteză a amilazelor. Apariția celui de-al doilea nivel maxim de sinteză coincide cu inițierea proceselor de liză a celulelor. Prin urmare acumularea suplimentară a amilazelor se datorează trecerii în lichidul cultural al amilazelor fixate dur pe celulă, în urma distrugerii structurilor celulare și trecerea în lichidul de cultură a enzimelor intracelulare [177, 187].

Concluzii la capitolul 3

1. Ca rezultat al cercetărilor de triere au fost selectate și incluse în colecția laboratorului Enzimologie ca perspectivii producători de amilaze exocelulare cu capacitate înaltă și stabilă de biosinteză a amilazelor exocelulare 6 tulpini de micromicete, care, în condițiile experimentului, au manifestat activitate amilolitică superioară: *A.niger* 412 (49,99 - 97,79 U/mL), *A. niger* 33 (79,63 - 114,14 U/mL), *T. harzianum* (64,40 - 124,09 U/mL), tulpinile nr. 77 (46,16 - 76,11 U/mL), nr. 209 (57,89 - 95,70 U/mL), nr. 222 (64,40 - 124,09 U/mL).

2. Au fost studiate particularitățile morfo-culturale ale tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 la cultivarea pe diferite medii nutritive agarizate: Reistrick, Czapek, malț-agar, malț-agar-amidon de 1%. S-a constatat că mediul optim pentru creșterea și sporularea culturii în studiu este mediul Czapek agarizat, pe care tulpina formează colonii limitate cu dimensiuni de 12,0-27,0 mm;

3. S-a stabilit că, urmare a variabilității naturale cea mai productivă din punct de vedere al sintezei enzimelor amilolitice este varianta A, care, în condiții standard de hidroliză enzimatică (pH 4,7), prezintă un spor de 114,23% față de martor, iar în condiții mai acide de hidroliză (pH 2,5) manifestă o creștere de 197,42%, fiind izolată prin pasaje repetate și utilizată în cercetările ulterioare;

4. Testarea comparativă a nouă medii nutritive, recomandate din literatura de specialitate, ca efective pentru obținerea amilazelor exocelulare a demonstrat că, pentru tulpina *A. niger* CNMN FD 06 sunt favorabile 3 medii de cultură pe care tulpina a manifestat activitate înaltă (nr. 1- 88,30 U/mL., nr. 4 -77,60 U/mL și nr. 8 - 143,40 U/mL);

5. A fost determinată toxicitatea primară a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 prin interacțiunea, timp de 5 zile, a lichidului cultural cu cultura de parameciu (*Paramecium caudatum*), urmărindu-se viabilitatea parameciilor, care continuau să se miște liniar peste 3 ore de interacțiune, ceea ce a permis calificarea micromicetei ca fiind „foarte slab toxică”.

Problema științifică soluționată în acest capitol constituie stabilirea perspectivei de valorificare a capacităților de biosinteză a tulpinilor fungice ca surse de amilaze, cu proprietăți distincte de acțiune, la valorile de pH (2,5) și (4,7), care extinde posibilitățile de utilizare a acestora în diferite ramuri ale economiei circulare.

4. AMELIORAREA POTENȚIALULUI DE BIOSINTEZĂ A COMPLEXULUI AMILOLITIC DE CĂTRE TULPINA DE FUNGI

A. *NIGER* CNMN FD 06

Multiplele implicări practice ale enzimelor hidrolitice microbiene (pectinazelor, amidazelor, celulazelor, proteazelor, lipazelor) în diferite sfere economice și sociale determină necesitatea evidențierii de noi soluții avansate și elaborării unor procedee moderne de sporire și stabilizare a capacității biosintetice a microorganismelor producători [1, 95, 97, 103, 116, 139, 148, 156, 166, 195, 215].

În tendința contemporană de lărgire continuă a arealului de aplicare a enzimelor, păstrarea și creșterea productivității de metaboliți secundari, studiul mecanismelor de dirijare și orientare a sintezei microbiene sunt probleme actuale la nivel mondial.

Evidențierea unor strategii noi, efective în manipularea cu obiectele biologice cu rezultate valoroase pentru diverse ramuri ale industriei, medicină, protecția mediului ambiant, prezintă o prioritate în cercetările moderne.

O componentă importantă a investigațiilor în această direcție prezintă studiul acțiunilor electrofizice asupra microorganismelor implicate în producerea de substanțe biologice active.

4.1. Influența undelor milimetrice cu intensitate joasă asupra biosintezei enzimelor amilolitice la tulpina de micromicete *A. niger* CNMN FD 06.

Rezultatele unui șir de cercetători [24, 54, 87, 91, 145] confirmă faptul că iradierea cu unde milimetrice a culturilor de microorganisme eucariote intensifică creșterea celulelor, micșorează lag-faza, stimulează sinteza enzimelor amilolitice, proteolitice și celulozolitice. Autorii Tambiev A., (2002) [91], Clapco S., (2006) [9], Ciloci A. și col. (2014) [129] susțin că iradierea obiectelor biologice cu unde milimetrice nu provoacă denaturarea celulelor, dar, în condiții determinate de acțiune, pot influența metabolismul celulei microbiene, inclusiv și sinteza compușilor biologici activi.

Date privind posibilitatea utilizării în acest scop a radiației milimetrice de intensitate joasă sunt prezentate de Rebrova T., (1992) [87], Betskii și col. (2004) [54], Clapco S., (2006) [9], Ciloci A și col. [129,130]. Evaluarea efectului influenței radiației cu intensitate mică asupra indicilor biologici a tulpinii fungice *A. niger* CNMN FD 06 a prezentat o etapă nouă în cercetările de dirijare a proceselor de ontogeneză la tulpina fungică în studiu cu scopul modificării metabolismului și intensificării biosintezei compușilor biologici activi.

Există un șir de publicații în care se menționează influența benefică a radiațiilor milimetrice asupra activității enzimatică a micromicetelor [9, 41, 87, 93, 145].

Efectele determinate de acțiunea radiațiilor milimetrice de intensitate joasă argumentează oportunitatea utilizării lor în calitate de stimulatori și reglatori ai procesului de sinteză a enzimelor la micromicete. Unii dintre principalii parametri ce influențează efectul determinat de acțiunea undelor milimetrice de intensitate joasă sunt frecvența, durata și regimul de emisie a undelor (periodic, continuu), faza de dezvoltare a obiectului biologic [24, 54]. Influența benefică a UMM de intensitate mică a fost expusă de Tambiev A.H. și coautorii (2002) [91], care susțin că în urma acțiunii undelor milimetrice are loc modificarea funcției de transport a membranelor celulare ceea ce asigură majorarea permeabilității membranelor pentru ioni și molecule ca rezultat intensificându-se metabolismul celular urmat de sporirea vitezei de transport a substanțelor nutritive și stimularea proceselor de formare a produselor metabolice, respectiv de sinteză a substanțelor bioactive [211].

La etapa inițială a fost investigată influența duratei de tratare cu UMM de intensitate joasă, atât în regim periodic, cât și continuu asupra activității amilolitice a tulpinii *A.niger* CNMN FD 06. Din literatură este cunoscut că efectul biologic survine, de obicei, în urma unei iradierii a organismelor timp de 15-60 min. [54, 87]. Totodată prezintă interes lungimea de undă, iar rezultatele cercetărilor Clapco S., (2006) [9], Stratan M., (2011) [41], atestă faptul că cel mai efectiv este utilizarea UMM cu lungimea de undă de 5,6 mm în diferite regimuri de tratare.

Astfel, în variantele experimentale în calitate de material de inoculare au servit suspensiile de spori ale culturii în studiu de 12-14 zile, crescute în tuburi de sticlă pe medii agarizate înclinate, supuse tratării cu UMM ($\lambda=5,6$ (53,8 GHz) în regim periodic și continuu. Durata tratării a constituit 5, 15, 25, 45, 60 și 75 min. Martor au servit suspensiile de spori, ne supuse iradierii cu UMM. Rezultatele cercetărilor sunt prezentate în Tab. 4.1.

Tabelul 4.1. Influența duratei de acțiune a UMM, în regim periodic, asupra activității amilolitice la tulpina *A. niger* CNMN FD 06

Durata tratării cu UMM, min.	Activitatea amilolitică, U/mL			
	Amilaze acid-labile, (pH 4,7)	%, față de control	Amilaze acid-stabile, (pH 2,5)	%, față de control
5	167,39±1,12	118,02	211,57±1.31	90,09
15	169,58±1,54	119,57	226,10±1.09	96,29
25	163,04±1,78	114,95	234,82±0,41	100,0
45	173,80±1,55	122,54	229,01±0,18	97,53
60	182,52±1,79	128,69	243,53±1,29	103,71
75	188,33±2,01	132,78	231,91±2,17	98,76
Martor	141,83±1,17	100,0	234,82±1,26	100,0

Datele prezentate demonstrează că acțiunea UMM influențează activitatea de biosinteză a complexului amilolitic de către tulpina în studiu, astfel la hidroliza substratului în condiții standard (pH 4,7), valoarea maximală marcându-se la durata de acțiune de 60-75 de minute și constituind 182,52 - 188,33 U/mL. Pentru amilazele acid-stabile indicii de activitate obținuți sunt la nivelul martorului, iar mărirea ulterioară a duratei de acțiune a provocat micșorarea activității enzimatică.

Cercetările de evaluare a influenței UMM de intensitate joasă cu diferite caracteristici asupra tulpinii în studiu au urmărit atât efectul general al UMM asupra sistemului enzimatic amilolitic sintetizat de producător, cât și efectul asupra însușirii de stabilitate a enzimelor.

Rezultatele obținute marchează sporirea activității amilazelor față de martor (ziua a 6-a de cultivare) în toate variantele experimentului de 13,0-65,01%, mărirea efectului variind în funcție de durata tratării și regimul de emisie. Rezultate remarcabile au fost înregistrate în variantele de emisie de impulsuri cu frecvența de 16Hz, durata tratării de 15-20 de minute (cu un spor de 145,53 - 159,01%), precum și în regim continuu, respectiv la durata de tratare de 20-30 de minute (cu un spor de -160,71 - 165,59%).

Rezultatele cercetărilor de determinare a efectului produs de UMM asupra activității enzimatică a culturii în funcție de durata tratării și regimul de emisie sunt prezentate în Tab. 4.2.

Tabelul 4.2. Modificarea activității amilolitice a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06, în funcție de influența UMM de intensitate joasă, în diferite regimuri de emisie, (pH 4,7)

Regimul	Durata iradierii (min)	Activitatea amilolitică					
		a 5-ea zi		a 6-a zi		a 7-a zi	
		U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%
8 Hz	10	132,91±0,01	96,10	175,87±0,02	107,58	165,94±0,08	144,98
	15	152,80±0,12	110,49	184,68±0,07	113,00	166,20±0,07	145,21
	20	162,34±0,08	117,39	211,78±0,08	129,58	179,65±0,03	156,96
	30	159,22±0,03	115,13	198,07±0,01	121,17	173,75±0,12	151,81
16 Hz	10	155,33±0,06	112,32	196,97±0,01	120,51	183,15±0,04	160,02
	15	194,67±0,10	140,76	237,86±0,09	145,53	184,21±0,04	160,95
	20	199,67±0,11	144,38	269,70±0,06	165,01	184,15±0,03	160,89
	30	173,02±0,08	125,11	193,09±0,08	118,14	182,12±0,01	159,12
Fracționat	10	143,03±0,09	103,42	179,49±0,10	109,82	147,85±0,02	129,18
	15	172,20±0,02	124,52	189,59±0,12	116,00	180,56±0,03	157,76
	20	240,11±0,05	173,62	255,61±0,11	156,39	202,38±0,01	176,82
	30	233,54±0,11	168,87	234,29±0,03	143,34	177,27±0,08	154,88
Continuu	10	192,15±0,01	138,94	211,69±0,04	129,52	173,03±0,10	151,18
	15	216,26±0,08	156,38	229,43±0,07	140,37	207,83±0,00	181,59
	20	246,23±0,12	178,05	267,37±0,05	163,59	219,60±0,02	191,87
	30	223,05±0,00	161,29	262,67±0,12	160,71	216,36±0,03	189,04
Martor	0	138,29±0,02	100	163,44±0,08	100	114,45±0,01	100

Dozarea activității amilazelor în condiții standard de hidroliză (pH 4,7) și în condiții de aciditate sportită (pH 2,5) atestă că UMM nu modifică însușirea de acid-stabilitate prin care se distinge tulpina *A. niger* CNMN FD 06 (Tabelul 4.3).

Tabelul 4.3. Influența UMM de intensitate joasă asupra acidstabilității amilazelor sintetizate de tulpina *A.niger* CNMN FD 06

Regimul de iradiere	Durata de iradiere, min	Activitatea amilolitică			
		pH 4,7		pH 2,5	
		U/mL	%	U/mL	%
16 Hz	10	196,97±0,01	120,51	178,31±0,07	104,82
	15	237,86±0,02	145,53	206,62±0,01	121,46
	20	269,70±0,08	165,01	253,12±0,04	148,79
	30	193,09±0,02	118,14	180,47±0,03	106,09
Continuu	10	211,69±0,03	129,52	189,59±0,10	111,45
	15	229,43±0,10	140,37	236,10±0,11	138,79
	20	267,37±0,05	163,58	243,53±0,08	143,16
	30	262,67±0,07	160,71	221,18±0,03	130,02
Martor	0	163,44±0,04	100	170,11±0,02	100

Astfel, la acțiunea UMM cu impulsuri de 16Hz, activitatea amilazică la valoarea pH-ului 4,7 variază în limitele 196,97-267,37 U/mL, iar la pH-ul 2,5 se marchează valori de 178,31-253,12 U/mL, în funcție de durata iradierii. Similar se urmărește în varianta de emiteră a UMM în regim continuu – activitatea amilazelor la pH 4,7 a fost de 211,69 - 267,70 U/mL, comparativ cu 189,59-243,53 U/mL la pH de 2,5.

Astfel remarcăm că, mai eficientă a fost tratarea micromicetei în studiu cu UMM cu lungimea de undă de 7,1 mm, rezultate superioare fiind obținute la regimul continuu de emiteră și durata de influență de 20 de minute. În baza studiilor realizate pentru evaluarea efectului undelor milimetrice de intensitate mică asupra activității biosintetice a tulpinii de funghi *A. niger* CNMN FD 06 a fost elaborată „Schema de realizare a procedurii de sinteză orientată a enzimelor amilolitice exocelulare” prezentată mai jos (Fig. 4.1.).

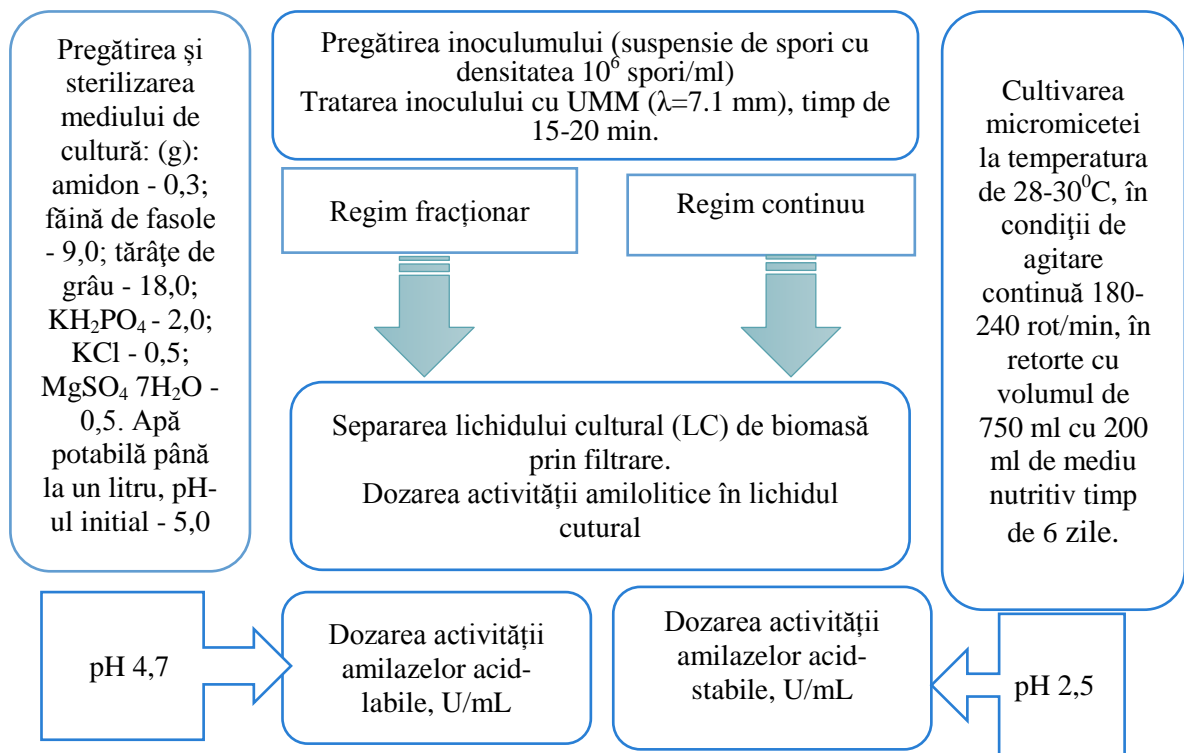


Fig. 4.1. Schema de realizare a procedurii de sinteză orientată pentru evaluarea efectului UMM de intensitate mică asupra activității biosintetice a tulpinii în studiu

4.2. Influența compușilor coordinațivi ai metalelor de tranziție asupra procesului de biosinteză a amilazelor de către tulpina *A. niger* CNMN FD 06

Biosinteza enzimelor de către microorganisme poate fi reglată și orientată prin selectarea condițiilor favorabile de cultivare, optimizarea compoziției mediului nutritiv, iar intensificarea unor procese metabolice poate fi realizată prin introducerea în mediul de cultivare a biostimulatorilor [2, 4, 7, 11]. Înșușiri de biostimulatori pentru celula vie manifestă un șir de preparate și substanțe de proveniență biologică și chimică. De perspectivă, în acest scop, este utilizarea compușilor coordinațivi în care în calitate de generatori de complecși sunt atomii biometalelor (Co, Cu, Zn, Ni, Fe, Mn, Mo etc.) [2, 16, 18, 35, 117, 126, 144, 219].

Datele prezentate în literatură au demonstrat că un rol important în sinteza orientată a substanțelor bioactive, inclusiv și a enzimelor, de către microorganisme au compușii coordinațivi, alte substanțe cu compoziție complexă, care includ în componența lor ioni ai metalelor.

Stabilirea influenței compușilor coordinațivi ai metalelor de tranziție asupra capacității biosintetice a tulpinilor de fungi microscopici producători de enzime amilolitice a constituit următorul obiectiv al cercetărilor asupra tulpinii fungice *A. niger* CNMN FD 06.

Cultivarea tulpinii fungice s-a efectuat pe mediul de cultură nr.8, compoziția căruia a fost selectată anterior ca optimală pentru tulpina în studiu. A fost studiată influența a 32 de compuși coordinativi ai metalelor asupra capacității biosintetice a tulpinii în studiu. S-au testat compușii coordinativi la aplicarea în trei concentrații: 1,0 mg/L; 5,0 mg/L și 10,0 mg/L.

În lichidul cultural obținut la cultivarea microorganismelor în lipsa compușilor coordinativi (control) și în prezența compușilor coordinativi (experiment) a fost determinată activitatea amilolitică prin metoda colorimetrică cu iod, utilizând ca substrat soluția de 1% de amidon solubil [65, 67].

4.2.1. Influența compușilor coordinativi ai Zn (II), Cu (II), Co (II) și Cr (II) asupra potențialului de biosinteză a tulpinii A. niger CNMN FD 06

Cercetările privind influența compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție asupra microorganismelor insistent demonstrează posibilitatea optimizării și reglării sintezei metaboliților microbieni inclusiv la micromicete [34, 69, 117, 124, 126].

Interesul sporit față de metalocomplexe este condiționat de faptul că în compoziția lor persistă atomii de metal Co, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Mo ș.a, majoritatea din ele prezentând microelemente. Ordinar, microelementele intră în componența celulelor în cantități extrem de mici, necesare pentru îndeplinirea unor activități funcționale determinate [23].

În acest aspect mulți autori marchează în cercetări perspectiva utilizării compușilor coordinativi, inclusiv ai metalelor 3d, în care în calitate de generatori de complecși sunt atomii metalelor de tranziție, în cea mai mare parte cu rol de microelemente Co, Cu, Zn, Fe, Ni, Mn, Mo, ș.a. [2, 7-9, 11, 16, 32, 34, 41, 47, 72, 126, 144, 179].

Testarea acțiunii compușilor coordinativi ai Zn (II), Cu (II), Co (II) și Cr (II) asupra sintezei complexului de enzime amilolitice de către tulpina *A. niger* CNMN FD 06 s-a efectuat prin cultivarea tulpinii pe mediul de nutriție optimal selectat (nr. 8) cu inocularea compușilor coordinativi în concentrații de 1,0 mg/L; 5,0 mg/L și 10,0 mg/L. Martor a servit tulpina cultivată în lipsa compușilor coordinativi.

Influența compușilor coordinativi ai Zn (II) asupra biosintezii complexului amilolitic de către tulpina A. niger CNMN FD 06

În literatură există multe date privind rolul ionilor de Zn^{2+} în metabolismul microorganismelor. Prezența sau insuficiența zincului influențează multe caracteristici ale celulei microbiene, inclusiv la nivelul ADN sau/și ARN, sinteza proteinelor, glucidelor, metabolismul fosfaților. Importanța Zn^{2+} se determină, probabil, de faptul că el intră în componența multor

metaloenzime - oxidoreductazelor, transferazelor, hidrolazelor ș.a., pe larg răspândite la microorganismele.

Reeșind din cele relatate mai sus, prima parte a cercetărilor s-a axat pe studierea influenței asupra biosintezei enzimelor amilolitice la tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06 a unei grupe de compuși coordinațivi în care atomul generator de complecși este ionul de zinc - Zn (II), iar în calitate de liganzi sunt aminoacizii în diferite forme optice.

La studierea acțiunii compușilor coordinațivi ai zincului asupra activității amilolitice a micromicetei *A.niger* CNMN FD 06 (Tab. 4.4) efect stimulator semnificativ nu a fost înregistrat, în unele cazuri s-a constatat un efect inhibitor puternic. Astfel, la folosirea complexului L-Serinat Zn (II) în concentrație de 5mg/L diminuarea activității amilazelor a constituit 86,07%.

Tabelul 4.4. Influența compușilor coordinațivi ai Zn (II)-ului cu aminoacizi asupra biosintezei amilazelor de către tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06

Compușii coordinațivi ai Zn(II)-ului cu aminoacizi	Activitatea amilolitică, % față de control		
	Concentrația compușilor coordinațivi, mg/L		
	1	5	10
1. DL Serinat Zn (II)	99,57	87,03	90,57
2. L Serinat Zn (II)	79,95	13,93	90,57
3. L Serinat Zn (II)	70,52	90,52	97,64
4. DL Alaninat Zn (II)	95,29	100,0	59,91
5. L Alaninat Zn (II)	95,29	95,29	89,67
6. D Alaninat Zn (II)	82,32	87,03	82,32
7. DL Alaninat DL Serinat Zn(II)	77,18	84,44	67,01
8. Glicinat DL Serinat Zn (II)	92,45	101,16	108,50
9. Glicinat D Serinat Zn (II)	110,94	104,86	103,81
10. Glicinat L Serinat Zn (II)	84,10	98,05	84,52
11. Zn (PC)2×4H2O	96,46	100,0	101,17

Rezultatele prezentate în tabelul de mai sus demonstrează că compușii coordinațivi ai Zn (II) au, în mare parte, acțiune inhibitorie asupra biosintezei amilazelor la tulpina de micromicete *A. niger* CNMN FD 06, doar Glicinat D Serinat Zn (II), în concentrație de 1 mg/L, menține activitatea amilolitică la concentrația de 1ml (10,94 % față de control), cu mărirea concentrației până la 10 mg/L activitatea se diminuează cu 7,13%.

Apreciind influența compușilor coordinațivi cu atomul de Zn în calitate de ion coordinator putem deduce oportunitatea de utilizare a acestora în calitate de reglatori ai biosintezei hidrolazelor de către fungi.

Efectul inhibitor de influență a compușilor coordinativi ai Zn (II) prezintă o direcție de perspectivă de utilizare a preparatelor enzimatic microbiene cu compoziție programată, în funcție de particularitățile procesului tehnologic.

Influența compușilor coordinativi ai Cu (II) asupra biosintezei complexului amilolitic de către tulpina A. niger CNMN FD 06

Esențiali pentru activitatea vitală a celulei sunt ionii de Cu^{2+} - implicați în procesele de transport al electronilor. Ionii de cupru intră în componența nitritreductazei, superoxid dismutazei, tirozinazei, citocromoxidazei, succinildehidrogenazei și stimulează procesele de respirație, fotosinteză, metabolismul hidraților de carbon, metabolismul compușilor fenolici, biosinteza lipidelor [8, 16, 35, 117]. Cuprul ca și fierul facilitează transportul oxigenului molecular, stimulează activitatea sistemelor enzimatic, este un catalizator puternic al proceselor de oxidare intracelulară. Ionii de Cu^{2+} intră în compoziția multor enzime (nitritreductaza, superoxid dismutaza, tirozinaza, γ - glutamiltransferaza, citocromoxidaza, succinat dehidrogenaza, uriaza, ș.a.). Prezența ionilor de Cu^{2+} acționează ca stimulator asupra procesului de respirație și fotosinteză, metabolizarea glucidelor, biosinteza lipidelor. În prezența compușilor coordinativi, semnificativ, se reduce toxicitatea acestui element, sporește activitatea biologică [35].

Rezultatele analogice utilizării compușilor coordinativi ai zincului s-au obținut și la includerea în mediul nutritiv a compușilor coordinativi, ce conțin în calitate de ion coordonator atomul de Cu^{2+} cu acetil acetat și picolinați în calitate de liganzi (Tab. 4.5).

Tabelul 4.5. Influența compușilor coordinativi ai Cu (II)-ului asupra activității enzimatică a tulpinii fungice A. niger CNMN FD 06

Compușii coordinativi ai Cu (II)-ului, (CC)	Activitatea amilolitică, % față de control		
	Concentrația compușilor coordinativi, mg/L		
	1	5	10
Cu (ac.ac)2x2 α PC	81,54	53,94	81,54
Cu (ac.ac)2x2 β PC	85,90	114,10	71,37
Cu (TTA)2x2 α PC	81,54	90,54	71,37
Cu (ac.ac)2	85,90	75,73	84,44
Cu (PC)2xH2O	0,00	0,00	0,00

Biosinteza amilazelor de către tulpina A. niger CNMN FD 06 a fost inhibată și în acest caz de compușii coordinativi ai cuprului. Efectul inhibitor a constituit de la 14,10 % până la 46,06 %.

Influența compușilor coordinațivi ai Co(II) și Cr (II) asupra biosintezei complexului amilolitic de către tulpina A niger CNMN FD 06

În continuare s-a studiat influența asupra biosintezei amilazelor extracelulare de către tulpina în studiu a unui grup de compuși coordinațivi cu liganzi similari, care în calitate de generatori de complecși, conțin atomii de cobalt și crom (Tab. 4.6).

Tabelul 4.6. Influența compușilor coordinațivi ai Co (II)-ului și Cr (II)-ului, în concentrație de 1mg/L, asupra activității enzimatice a tulpinii fungice A. niger CNMN FD 06

Compușii coordinațivi ai Co (II)-ului și Cr (II)-ului, (CC)	Activitatea amilolitică, % față de control		
	1	5	10
Co (PC) ₂ x4H ₂ O	87,03±0,17	90,57±0,02	90,57±0,16
Co (PC) ₃ xH ₂ O	77,60±0,22	29,26±0,02	25,72±0,11
Co (benzoat) ₂	74,06±0,02	90,57±0,01	96,46±0,01
Co (ac.ac) ₃	21,00±0,03	87,03±0,03	96,75±0,02
Cr (PC) ₂	102,80±0,03	90,57±0,01	64,33±0,01

Analiza rezultatelor obținute demonstrează manifestări similare ca și în cazul compușilor complecși ai Zn (II)-ului și Cu (II)-ului. Influența compușilor complecși ai cobaltului și cromului asupra biosintezei amilazelor de către micromiceta A. niger CNMN FD 06 a fost inhibitoare, diminuarea activității amilolitice constituind 74,28% pentru Co (PC)₃xH₂O și 9, 43% pentru Co (PC)₂x4H₂O. Aplicarea compusului coordinațiv al Cr (PC)₂, în concentrație de 1 mg/L, demonstrează activitate amilolitică la nivelul probei control (2,80 %).

De remarcat că, interes biotehnologic prezintă compușii coordinațivi ai Co (III) cu diferiți liganzi oximici în combinație cu tiocarbamidă și anilină și anioni de fluor în partea externă. Din compușii complecși cercetați au fost evidențiați metalocomplecși care influențează pozitiv activitatea amilolitică a tulpinii în studiu.

Alt grup de complecși coordinațivi testați au fost cei ai Co (III) și anume a dioximaților cobaltului cu fluor. Pentru început au fost testați doi compuși: [Co(DH)₂(Thio)₂]3F[SiF₆]x1,5H₂O și [Co(DH)₂(Thio)₂]2[SiF₆]x3H₂O. Rezultatele testării sunt prezentate în Tab. 4.7.

Astfel, prezența în mediul de cultivare a compușilor coordinațivi ai Co în concentrație de la 1 mg/L, 5mg/L și 10 mg/L au asigurat sporirea activității amilazelor în toate concentrațiile testate, în limitele de 51,99-57,80 U/mL. S-a stabilit că efectul de stimulare a biosintezei crește, odată cu sporirea concentrației compușilor în mediul de cultivare de la 1 mg/L la 10 mg/L. Optimală a fost determinată concentrația de 10 mg/L pentru ambii compuși coordinațivi complecși. Pentru compusul [Co(DH)₂(Thio)₂]3F[SiF₆]x1,5H₂O (I) și 52,13 la aplicarea

concentrației de 10 mg/L s-a remarcat o activitate de 56,69 U/mL, cu 26,25% mai mult decât în proba control (44,90 U/mL).

Tabelul 4.7. Influența dioximaților Co (III)-ului cu F (I) asupra activității enzimice a micromicetei în studiu

Compușii coordinativi, dioximații Co (III)-ului cu F (I) (CC)	Concentrația (CC), (mg/L)	Activitatea amilolitică, U/mL	%, față de control
[Co(DH) ₂ (Thio) ₂]3F[SiF ₆] 1,5H ₂ O (I)	1	51,99±0,01	115,79
	5	54,03±0,03	120,33
	10	57,80±0,01	128,73
[Co(DH) ₂ (Thio) ₂]2[SiF ₆] 3H ₂ O (II)	1	52,13±0,01	116,10
	5	53,71±0,02	119,62
	10	56,69±0,06	126,25
Control	0	44,90±0,02	100

Mărirea concentrației până la 10 mg/L influențează activitatea enzimatică, remarcăm că, la utilizarea concentrației compușilor coordinativi de 10 mg/L activitatea amilazelor constituie 57,80 U/mL pentru complexul (I) - [Co(DH)₂(Thio)₂]3F [SiF₆]x1,5H₂O și 56,69 U/mL pentru complexul (II) - [Co(DH)₂(Thio)₂]2[SiF₆]x3H₂O. Astfel, analiza rezultatelor dovedește că, complecșii testați pot servi ca biostimulatori ai sintezei amilazelor exocelulare de către tulpina în studiu.

Efectul exercitat de compușii coordinativi testați asupra biosintezei amilazelor de către tulpina *A. niger* CNMN FD 06 a fost biostimulator, sporul activității amilolice constituind 15,81-28,75 % (115,79-128,73%) și 16,10-12,62% (116,10-126,25%) față de control la utilizarea complexului (I) și (II) respectiv.

Ambii compuși coordinativi, în egală măsură, influențează activitatea enzimatică, fapt care poate fi atribuit structurii lor similare.

Rezultatele obținute au servit drept temei pentru continuarea cercetărilor în vederea determinării influenței compușilor complecși care conțin fluor. Astfel cum ambii compuși testați au părțile interne identice, prezintă interes testarea compușilor coordinativi ai Co cu diferită compoziție a sferei externe: complexul (III) - [Co(DH)₂(Thio)₂]F 3H₂O(III), complexul (IV) - [Co(DH)₂(Thio)₂]BF₄ 3H₂O și complexul (V) - [Co(DH)₂(Py)₂]BF₄xH₂O.

Rezultatele obținute atestă o influență mai superioară a compușilor coordinativi noi (III), (IV) și (V) asupra biosintezei amilazelor de către *A. niger* CNMN FD 06 în comparație cu compușii (I) și (II) (Tab. 4.8).

Tabelul 4.8. Influența compușilor coordinativi ai Co (III) cu liganzi oxichimici cu compoziție diferită asupra activității amilolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06

Compușii coordinativi ai Co (III), (CC)	Concentrația (CC), mg/L	Activitatea amilolitică, U/mL	%, față de control
[Co(DH) ₂ (Thio) ₂]F 3H ₂ O (III)	1	60,1±0,01	133,85
	5	61,5±0,02	136,97
	10	62,3±0,07	138,75
[Co(DH) ₂ (Thio) ₂]BF ₄ 3H ₂ O (IV)	1	61,6±0,02	137,19
	5	63,6±0,03	141,65
	10	58,7±0,15	130,73
[Co(DH) ₂ (Py) ₂]BF ₄ H ₂ O (V)	1	63,0±0,18	140,31
	5	60,1±0,07	133,85
	10	63,0±0,04	140,31
Control	0	44,9±0,02	100

Sporirea activității amilolitice în mediul de cultură constituie 30,73-41,65 % (130,73-141,65%) față de control. Putem observa că, mărirea concentrației compușilor coordinativi în mediul de cultură de la 1 la 10 mg/L nu este un criteriu stabil de influență asupra activității amilolitice, dar se manifestă diferit în funcție de compusul coordinativ testat. Astfel, pentru [Co(DH)₂(Thio)₂]F 3H₂O (III) devierea concentrațiilor nu are, practic, nici o influență asupra valorilor activității amilolitice, pe când la [Co(DH)₂(Thio)₂]BF₄ 3H₂O (IV) optimală este adăugarea a 5mg/L, fiind marcată valoarea maximală (140,31%), iar în cazul compusului [Co(DH)₂(Py)₂]BF₄ H₂O (V) optimală este concentrația de 1mg/L.

Deși compușii complecși coordinativi din ambele grupe testate conțin în calitate de atom de coordonare ionul de Co (III), acțiunea lor asupra biosintezei amilazelor variază de la un grup la altul, fapt ce ne permite să concluzionăm că, influența stimuloare poate fi asigurată de structura și compoziția compusului, iar liganzii, care înconjoară atomii de metal, de asemenea influențează biosinteza enzimelor amilolitice.

În concluzie, putem menționa că dioximații Co (III) cu fluor pot servi în calitate de stimulatori ai biosintezei fermenților hidrolitici ai micromicetelor din genurile *Aspergillus*, gradul influenței compușilor coordinativi asupra activității enzimatică a micromicetei depinde de compoziția și structura complexului coordinativ și de concentrația administrată.

Testarea influenței diferitor compuși coordinativi asupra activității amilolitice a tulpini în studiu a permis evidențierea compușilor de Co(III) în bază de liganzi oximici ce stimulează amilogeneza. În special, sinteza enzimelor și activitatea amilolitică a fost stimulată de compusul coordinativ (IV) - [Co(DH)₂(Thio)₂]BF₄ 3H₂O, în concentrație de 5mg/L.

În continuare tulpina în studiu a fost crescută pe mediu de nutriție nr.8, în variantele experimentale mediul de bază (control) a fost suplimentat cu compusul coordinativ $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2]\text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (IV), în concentrație de 5 mg/L, stabilită ca optimală. Monitorizarea activității amilazelor s-a realizat în dinamică (durata cultivării -7 zile), perioadă în care tulpina manifestă maxima de biosinteză a enzimelor.

În variantele experimentale, cultivate în prezența compusului coordinativ, maxima biosintezei amilazelor s-a manifestat în ziua a 5-ea de cultivare și a constituit 224,22 U/mL amilaze acid-labile și 149,95 U/mL amilaze acid-stabile (Tab. 4.9.).

Tabelul 4.9. Influența compusului coordinativ $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot (\text{Thio})_2] \text{BF}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ asupra duratei de cultivare a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06

Durata cultivării, zile	PH-ul mediului	Activitatea amilolitică (pH 4.7), U/mL		Activitatea amilolitică (pH 2.5), U/mL	
		control	experiment	control	experiment
1	4,8	3,65 ±0,01	5,99±0,16	5,61±0,11	6,63±0,01
2	3,85	3,91±0,04	5,78±0,01	5,10±0,01	6,12±0,18
3	5,45	40,33±0,12	54,60±0,21	20,33±0,02	51,70±0,03
4	5,9	52,08±0,01	120,69±0,01	26,60±0,17	96,69±0,03
5	7,0	80,79±0,02	224,22±0,01	68,02±0,08	149,95±0,15
6	7,2	101,42±0,01	138,69±0,17	79,63±0,02	114,83±0,01
7	7,5	54,90±0,21	10,20±0,04	60,15±0,11	4,08±0,02

Maxima activității ambelor tipuri de amilaze (acid-labile și acid-stabile) în varianta martor s-a manifestat în ziua a 6-a de cultivare și a constituit 101,42 U/mL și 79,63 U/mL, respectiv, pentru amilaze acid-labile și amilazele acid-stabile. Astfel, utilizarea compusului coordinativ $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot (\text{Thio})_2] \text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ modifică durata de cultivare a micromicetei, reducând ciclul tehnologic cu 24 h față de control.

După cum s-a constatat în cercetările anterioare efectul exercitat de compuşii complecși testați asupra activității enzimatică a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 este în funcție de concentrația aplicată. Reieșind din aceasta au fost realizate testări repetate, fiind extins diapazonul de concentrații, cuprinse în valori de 1,0; 5,0; 10,0 și 40,0 mg/L, utilizate la adiționarea complexului $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot (\text{Thio})_2] \text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pentru a concretiza concentrația optima (Fig 4.2).

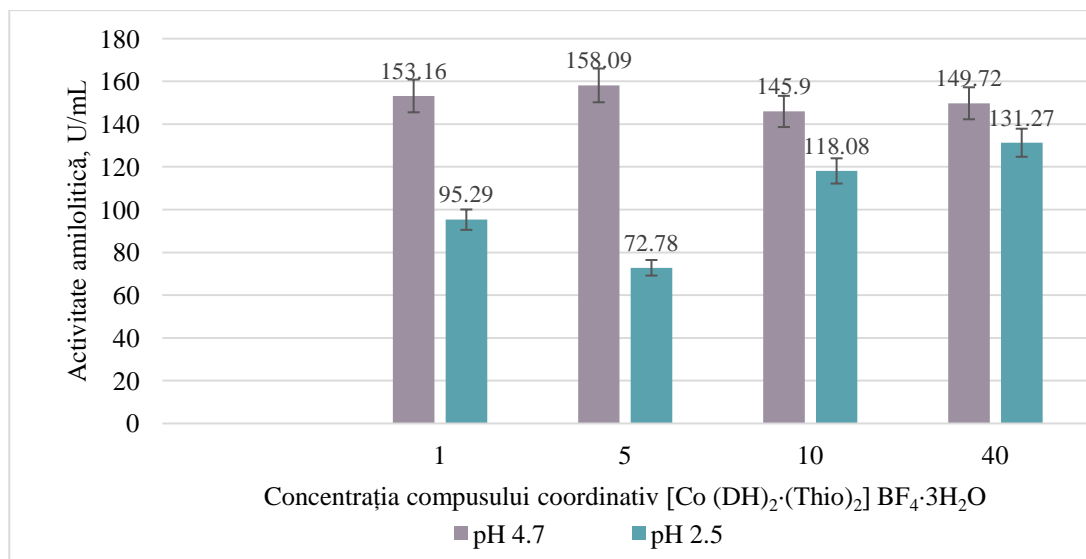


Fig. 4.2. Influența compusului coordinațiv [Co(DH)₂·(Thio)₂]BF₄·3H₂O, în diferite concentrații, asupra activității amilolitice a tulpinii fungice *A. niger* CNMN FD 06

De remarcat că datele din literatură indică că, concentrația compușilor complecși ar putea avea efect fungicid asupra a microorganismelor [133, 39].

Totodată conform datelor expuse mai sus, utilizarea compusului Co(DH)₂·(Thio)₂]BF₄·3H₂O, pentru obținerea unui preparat enzimatic cu conținut înalt de amilaze acid-labile, optimală este concentrația de 1,0 mg/L și 5,0 mg/L, care, în condițiile experimentului, a asigurat activitatea superioară a amilazelor acid-labile 153,16 - 158,09 U/mL. Activitatea superioară a amilazelor acid stabile (pH 2,5) 118,08 - 131,27 U/mL, corespunzător, se asigură de concentrații mai înalte de compus 10,0 - 40,0 mg/L.

În concluzie putem menționa: dioximații Co (III) cu fluor pot servi în calitate de stimulatori ai biosintezei fermenților hidrolitici ai micromicetelor din genurile *Aspergillus*, gradul de influență a compușilor coordinațivi asupra activității enzimatice a micromicetelor depinde de particularitățile producătorului și a complexului enzimatic sintetizat, cât și de compoziția complexului coordinațiv și concentrația administrată. Datele obținute au fost valorificate în elaborarea procedurii de sinteză orientată a amilazelor, în prezența compușilor complecși în calitate de stimulatori ai sintezei enzimatice la tulpina în studiu, conform schemei expuse mai jos.

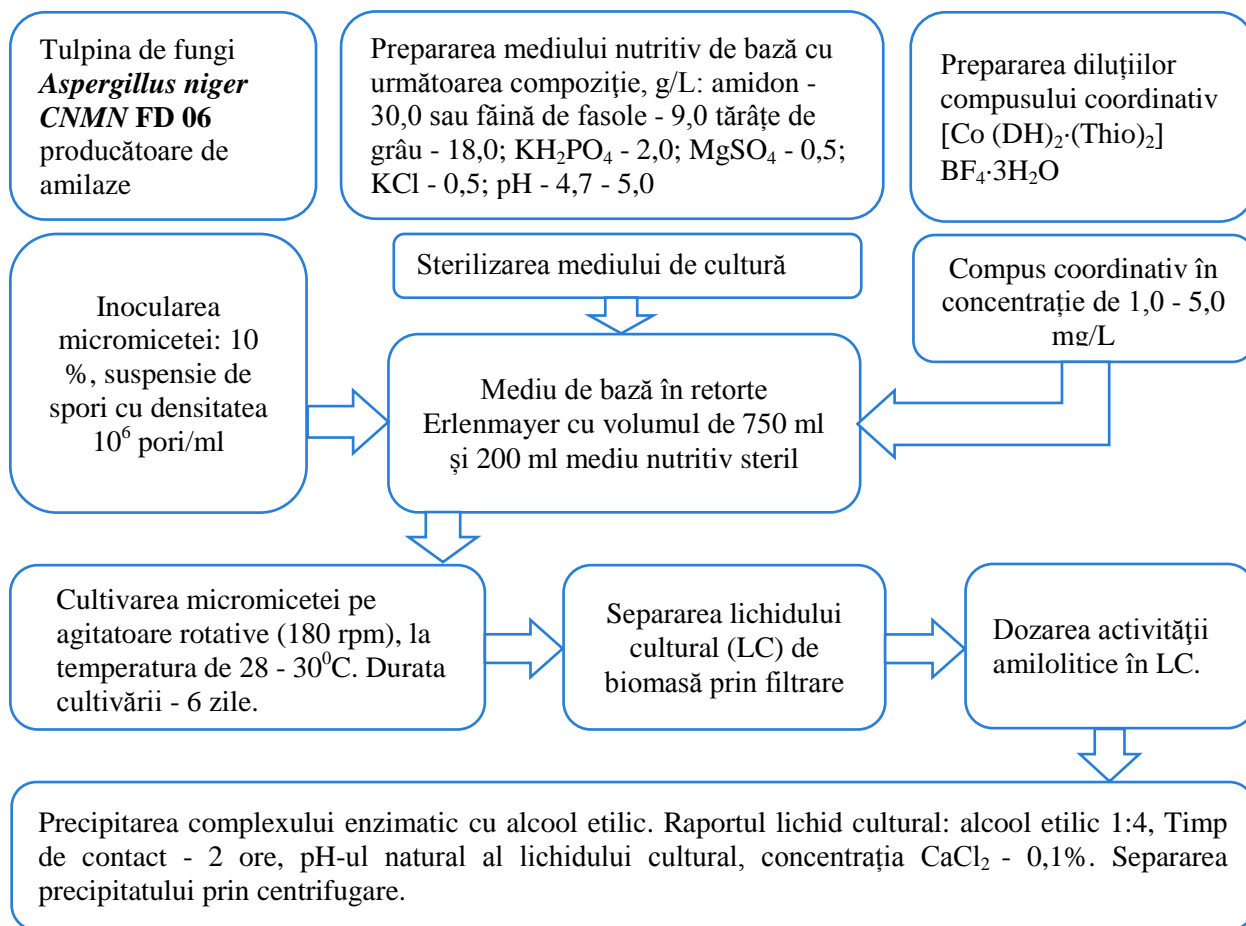


Fig. 4.3. Schema de realizare a procedurii de cultivare a tulpinii de micromicete *A. niger* CNMN FD 06 în prezența biostimulatorului de origine chimică

Procedeeul elaborat include cultivarea tulpinii de micromicete *A. niger* CNMN FD 06 la temperatura de 28–30⁰C în condiții de agitare continuă (180 - 200 rot/min), timp de 6 zile, pe mediul nutritiv de bază, la care suplimentar se adaugă compusul coordinativ [Co(DH)₂(Thio)₂]BF₄·3H₂O în concentrație de 1,0 mg/L și 5,0 mg/L, pH-ul inițial al mediului 5,0.

Avantajele procedurii elaborat:

- sporirea activității amilazelor cu 37,19 - 41,65%;
- reducerea ciclului de cultivare cu 24h;
- posibilitatea programării compoziției complexului amilolitic privind raportul amilazelor acid-labile/acid-stabile.

Acțiunea stimuloare este cauzată de însușirea compușilor coordinativi ai metalelor de a influența metabolismul microorganismelor, cât și de prezența în componența lor a elementelor indispensabile pentru creșterea și dezvoltarea microorganismelor. Utilizarea compusului coordinativ [Co(DH)₂(Thio)₂]BF₄·3H₂O face posibilă programarea compoziției complexului amilolitic privind raportul amilaze acid-labile (tipice) (pH 4,7) și amilaze acid-stabile (pH 2,5).

Procedeeul se recomandă pentru cultivarea micromicetei producătoare în scopul obținerii preparatelor amilolitice autohtone cu randament sporit și competitive pentru utilizare în biotehnologiile moderne.

4.2.2. Influența compușilor coordinativi heterometalici ai elementelor „s” asupra biosintezei enzimelor amilolitice la tulpina *A. niger* CNMN FD 06

Cercetările pentru stabilirea influenței compușilor coordinativi heterometalici ai elementelor „s” asupra biosintezei enzimelor amilolitice la tulpina de micromicete *A. niger* CNMN FD 06 au fost realizate în baza compușilor coordinativi ai Ba, Sr, Ca, care prezintă compuși heterometalici ai elementelor „s” cu cobalt: s-Co (III), unde „s” este Ba, Sr, Ca și ligandul polidentat L³ (esterul dimetilic al acidului 2,6-piridindicarboxilic):

- [BaL³·μ(NCS)₂-Co(NCS)₂]-tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di-μ-(izotiocianat-1,2kN)-(diizotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II);
- [SrL³][Co(NCS)₄]-tetra (izotiocianat)cobalt(II) de tris(dietil piridin-2,6-dicarboxilat)stronțiu;
- [CaL³][Co(NCS)₄]-tetra (izotiocianat)cobalt(II) de tris(dietil piridin-2,6-dicarboxilat)calciu.

Metalocomplecșii au fost incluși în mediul de cultivare în concentrații de 5 mg/L, 10 mg/L și 15 mg/L. (Tab. 4.10.).

Tabelul 4.10. Modificarea activității amilolitice a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 în cultură submersă sub influența compușilor coordinativi ai elementelor „s”

Compușii coordinativi	Concen-trația, mg/L	Activitatea amilolitică, U/mL					
		Ziua a 5-ea		Ziua a 6-a		Ziua a 7-a	
		U/mL	% Control	U/mL	% Control	U/mL	% Control
[BaL ³ ·μ(NCS) ₂ -Co(NCS) ₂]	5	100,50±0,02	141,7	127,08±0,01	172,3	49,41±0,07	101,5
	10	66,54±0,01	93,8	56,37±0,05	76,4	27,99±0,08	57,5
	15	66,54±0,02	93,8	44,73±0,11	60,6	21,06±0,11	43,3
[SrL ³][Co(NCS) ₄]	5	111,42±0,07	157,1	98,01±0,06	132,8	50,76±0,04	104,3
	10	66,06±0,03	93,1	73,77±0,05	100,0	13,44±0,10	27,6
	15	71,37±0,01	100,6	47,16±0,10	63,9	20,37±0,03	41,8
[CaL ³][Co(NCS) ₄]	5	71,37±0,01	100,6	73,77±0,01	100,0	50,13±0,02	102,9
	10	63,66±0,04	89,8	46,71±0,09	63,3	36,99±0,10	76,0
	15	49,11±0,02	69,2	44,73±0,11	60,6	21,03±0,05	43,2
Ligandul L ³	5	81,06±0,09	114,3	68,94±0,00	93,5	36,30±0,01	74,5
	10	61,68±0,10	86,9	13,65±0,05	18,5	17,61±0,03	36,2
	15	58,80±0,01	82,9	12,93±0,07	17,5	15,51±0,08	31,8
Control	0	70,92±0,01	100,0	73,77±0,03	100,0	48,69±0,02	100,0

Monitorizarea activității enzimatică s-a realizat pe parcursul zilelor 5-7 de cultivare, perioadă în care producătorul manifestă activitate maximală de biosinteză enzimatică.

În varianta martor activitatea amilolitică a tulpinii a constituit 70,92 U/mL în ziua a 5-ea și, corespunzător 73,77 U/mL în ziua a 6-a.

În ziua a 7-a de cultivare în varianta martor activitatea amilazelor scade cu 22,23 U/mL față de nivelul martorului în ziua a 5-ea de cultivare

Analiza rezultatelor obținute în variantele experimentale marchează influența distinctă a fiecărui complex asupra biosintezei amilazelor de către producător în funcție de atomul generator de complecși.

Astfel, compusul coordinativ $[\text{BaL}^3\text{-}\mu(\text{NCS})_2\text{-Co}(\text{NCS})_2]$, în ziua a 5-ea de cultivare, în varianta cu concentrația de 5 mg/L, asigură efect biostimulator asupra activității amilolitice a micromicetei în mărime de 41,7% față de controlul zilei (70,92 U/mL) și 72,3% față de maxima controlului (73,77 U/mL) în ziua a 6-a de cultivare - ziua manifestării maximei de biosinteză la cultivarea micromicetei în condiții clasice (control). În ziua a 6-a de cultivare compusul depășește nivelul maximal al controlului cu 53,31%, activitatea enzimatică constituind 127,08 U/mL față de 73,77 U/mL în varianta control. Mărirea concentrației de compus în mediu la 10 mg/L și 15 mg/L provoacă efect de inhibare, care crește odată cu creșterea duratei de cultivare: constituind: 9,0% (ziua a 5-ea), 23,6% și 39,4% (ziua a 6-a), 42,5 și 56,7% (ziua a 7-a) în raport cu controlul zilei.

Compusul coordinativ al stronțului $[\text{SrL}^3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$, în ziua a 5-ea de cultivare, în varianta cu concentrația de 5 mg/L, asigură efect biostimulator asupra activității amilolitice a micromicetei în mărime de 57,1% față de controlul zilei (70,92 U/mL) și de 51,0% față de maxima controlului (73,77 U/mL) în ziua a 6-a de cultivare. În ziua a 6-a de cultivare, în varianta cu aceeași concentrație 5 mg/L, compusul coordinativ al stronțului depășește nivelul maximal al controlului cu 32,2,8%, activitatea enzimatică constituind 98,01 U/mL față de 73,77 U/mL în varianta control. Spre deosebire de compusul coordinativ al bariului, în ziua a 6-a de cultivare compusul coordinativ al stronțului înregistrează scăderea efectului biostimulator cu 32,8% comparativ cu 51,0%, în ziua a 5-ea de cultivare, în raport cu maxima controlului. Similar variantei cu compusul coordinativ al bariului, cu sporirea concentrației compusului coordinativ al stronțului în mediu la concentrația de 10 mg/L și, respectiv, 15 mg/L provoacă efect de inhibare, care crește odată cu creșterea duratei de cultivare, activitatea amilolitică constituind în ziua a 7-a de cultivare 72,4% și 58,2% sub nivelul controlului zilei.

Compusul coordinativ - $[\text{CaL}^3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$, unde Ca este atom generator de complecși, indiferent de durata de cultivare, în concentrație de 5,0 mg/L nu influențează (efect neutru)

biosinteza amidazelor. În ziua a 5-ea de cultivare activitatea amidolitică la această concentrație a constituit 71,37 U/mL, în a 6-a zi 73,77 U/mL și 50,13 U/mL în ziua a 7-a, ceea ce în raport cu valoarea procentuală constituie: 100,6%, 100,0% și 102,9% față de nivelul controlului zilei.

Creșterea concentrației ligandului L³ în mediul de cultivare la 10 mg/L și 15 mg/L ca și în cazurile anterioare, provoacă efect de inhibare, care crește odată cu creșterea duratei de cultivare. Astfel activitatea amidolitică a producătorului la concentrația de 15 mg/L a constituit 30,8% în ziua a 5-ea, 39,4% în ziua a 6-a și 56,8% în ziua a 7-a de cultivare față de nivelul controlului zilei.

Studiul activității biologice a ligandului L³ a arătat că, în concentrația de 5 mg/L în ziua a 5-ea de cultivare a producătorului, manifestă efect slab stimulator: 14,3% față de controlul zilei în ziua a 5-ea de cultivare, 9,9% în raport cu maxima controlului, ziua a 6-a. În zilele a 6-a și a 7-a se urmărește scăderea activității amidazelor exocelulare cu 6,5% și 25,5%, respectiv, în ziua a 6-a și a 7-a de cultivare. Creșterea concentrației ligandului în mediul de cultivare la 10 mg/L și 15 mg/L provoacă efect semnificativ inhibitor, care se modifică în funcție de durata de cultivare, constituind respectiv: 13,1% și 17,1% (ziua a 5-ea); 81,5% și 82,5% (ziua a 6-a); 63,8% și 68,2% (ziua a 7-a), sub nivelul controlului zilei (70,92 U/mL, 73,77 U/mL, 48,69 U/mL). Creșterea concentrației compusului în mediul de cultivare provoacă efect inhibitor cu valoare maximă în ziua a 7-a de cultivare, activitatea amidazelor exocelulare se diminuează cu 72,4% (13,44 mg/L).

Reieșind din analiza datelor experimentale, putem considera că, diminuarea activității amidazelor exocelulare la producătorul *A. niger* CNMN FD 06, sub influența compușilor coordinațivi ai Ba, Sr, Ca la sporirea concentrațiilor ligandului în mediul de cultivare (10 mg/L și 15 mg/L) este condiționată, în mare parte, de însușirile ligandului L³ din componența compusului complex testat.

Stabilirea parametrilor optimați de aplicare a compușilor coordinațivi ai bariului și stronțului în cultivarea tulpinii în studiu

În scopul stabilirii condițiilor optime de cultivare a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 a fost extins diapazonul de concentrații a compușilor coordinațivi ai bariului și stronțului cu ligandul L³, care în cadrul studiilor anterioare au manifestat proprietăți biostimulatoare și de intensificare a biosintezei amidazelor, asigurând atât sporul activității enzimatice (cu cca 35 - 50%), cât și modificarea termenului de manifestare a maximei de biosinteză a enzimelor de interes. Ținând cont de faptul că, ambii compuși au exercitat influență benefică asupra productivității tulpinii în studiu, în concentrația minimă testată (5 mg/L), compușii coordinațivi în concentrații mai mari având efect neutru sau chiar inhibitor, în cadrul studiilor ulterioare accentul a fost plasat pe analiza influenței compușilor coordinațivi în concentrații de 1 mg/L, 5

mg/L și 10 mg/L. Experiențele au fost realizate în dinamică pe parcursul a 5 și 6 zile de cultivare - perioada de sinteză maximală a enzimelor amilolitice la tulpina în studiu. Compușii au fost adionați la mediul de cultivare (nr.8), selectat anterior ca optim pentru sinteza amilazelor. În calitate de probă de referință a servit activitatea variantei cultivate în absența metalocomplexilor. Rezultatele sunt expuse în figura de mai jos.

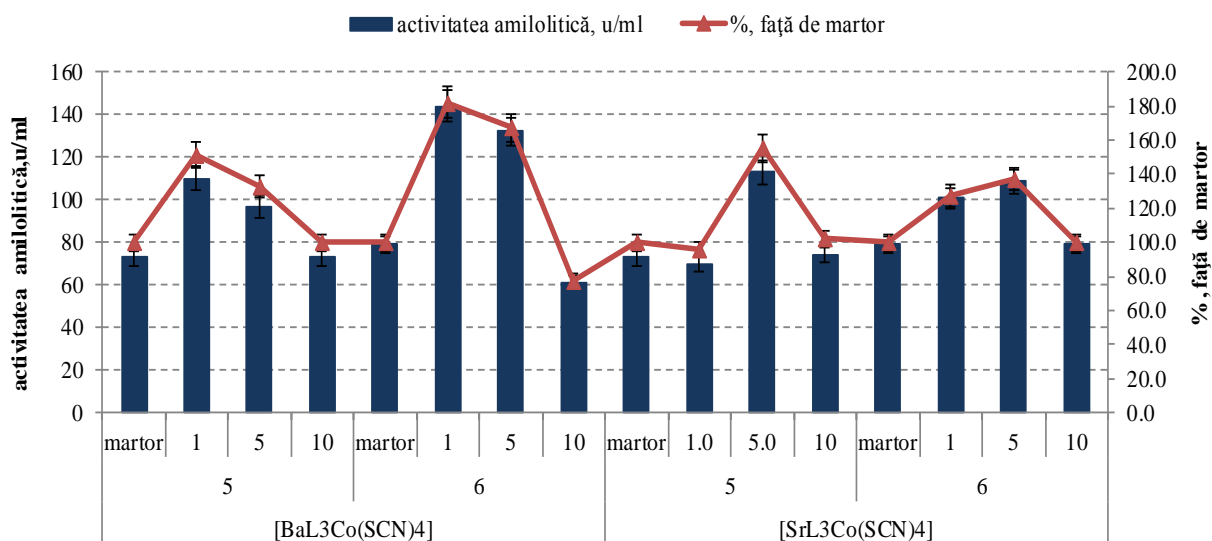


Fig. 4.4. Influența compușilor coordinativi ai Ba și Sr, în diferite concentrații, asupra activității amilolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06

În baza rezultatelor prezentate pe Figura 4.4. se constată că compusul bariului, în concentrație de 1mg/L și 5 mg/L, influențează pozitiv acumularea amilazelor la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06 pe parcursul ambelor zile de cultivare, activitatea variind între 96,68 - 110,08 U/mL în ziua a 5-ea și 132,15 - 143,94 U/mL în ziua a 6-a, respectiv, comparativ cu nivelul de 72,86 și 79,09 U/mL, marcat la proba control în zilele respective. Sporul activității enzimatică asigurată de suplimentarea mediului cu compusul bariului a variat între 32,7 - 82,0% față de control.

În ambele zile de cultivare valorile maxime ale activității enzimatică se remarcă la concentrația minimă testată (1 mg/L), sporul activității constituind 51,1% în ziua a 5-ea și 82,0% în ziua a 6-a. La cultivarea micromicetei în prezența metalocomplexului în concentrație de 5 mg/L activitatea a depășit nivelul controlului cu 32,7 % și, respectiv, 67,1%. De menționat că la ambele concentrații activitatea amilolitică relevată în ziua a 5-ea de cultivare depășește inclusiv nivelul maximal al activității probei control marcat în ziua a 6-a, sporul activității în raport cu acesta constituind 39,2% (concentrația CC - 1 mg/L) și 22,2% (concentrația CC - 5 mg/L).

În cazul compusului coordinativ al stronțului cu ligand polidentat activitatea a variat în limitele de 69,88 - 113,06 U/mL și 79,09 - 108,57 U/mL, în ziua a 5-ea și a 6-a, corespunzător. Similar compusului bariului, concentrațiile mai mari, practic, nu influențează acumularea amilazelor, efectul pozitiv fiind observat doar în cazul concentrației de 1 mg/L (în ziua a 6-a de cultivare) și 5 mg/L. Adăugarea la mediul de cultivare a compusului Sr-L³ în concentrație de 5 mg/L asigură intensificarea procesului de biosinteză, picul activității enzimatică fiind marcat în a 5-ea zi de cultivare, valoarea dată depășind nivelul maximal al probei control cu 42,9% și, mai puțin semnificativ (în medie cu 8%) nivelul probei cultivate în prezența compusului coordinativ timp de 6 zile. În a 6-a zi de cultivare activitatea se menține la cote superioare fiind mai înaltă față de cea prezentată de varianta control cu 27,3 și, respectiv, cu 37,3% la concentrația de 1 mg/L și 5 mg/L, corespunzător.

Reieșind din rezultatele obținute se constată că, concentrațiile optime ale compusului bariului și stronțului cu liganzi polidentati, care exercită efect stimulator maximal (39,2 și, respectiv, 42,9%) asupra activității amilazelor exocelulare ale tulpinii de interes biotehnologic *A. niger* CNMN FD 06 și asigură intensificarea procesului de biosinteză sunt 1 mg/L - pentru [BaL³.μ(NCS)₂-Co(NCS)₂] și 5 mg/L - în cazul metalocomplexului [SrL³] [Co(NCS)₄].

Selectarea pH-ului inițial al mediului de cultură, care poate influența sinteza maximală a amilazelor exocelulare la cultivarea submersă a producătorului cu aplicarea complexelor de stronțiu și bariu constituie un aspect important în valorificarea potențialului biosintetic al micromicetei în studiu, de aceea, la faza următoare a investigațiilor, compușii coordinativi ai bariului și stronțului cu liganzi polidentati au fost adăunați în concentrațiile optime selectate în mediul nutritiv cu diferite valori ale pH-ului inițial: 4,0; 5,0; 6,0 și 7,0. În calitate de probă de referință a servit activitatea enzimatică a variantei cultivate în absența compușilor coordinativi, pe mediu nr.9 cu pH inițial 5,0.

Conform rezultatelor prezentate în Fig. 4.5. se constată că, pentru tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06 pH-ul inițial al mediului nutritiv, optim pentru biosinteza amilazelor exocelulare este 5,0.

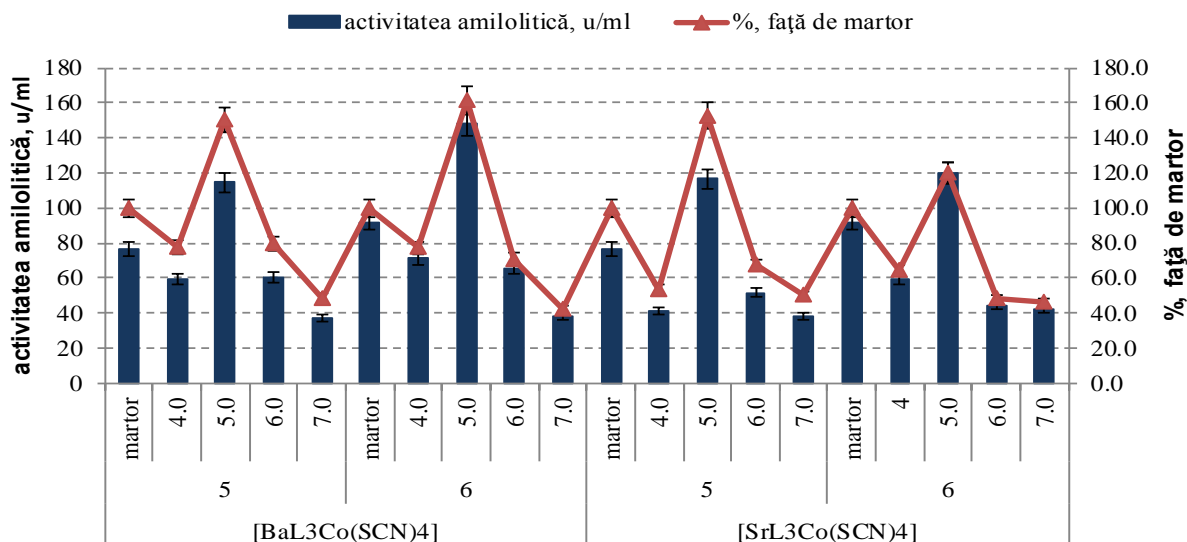


Fig. 4.5. Influența compușilor Ba și Sr, în concentrațiile optime selectate (Ba - 1 mg/L; Sr - 5 mg/L), asupra activității amilolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06, în funcție de diferite valori ale pH-ului initial al mediului de cultivare

În baza datelor experimentale s-a stabilit că, în cazul cultivării micromicetei producătoare, în prezența compușilor coordinațivi cu proprietăți biostimulatoare, pH-ul optim ce asigură sinteza maximală a enzimelor amilolitice este similar celui determinat anterior pentru cultivarea micromicetei în condiții clasice. Astfel, activitatea enzimatică în variantele cultivate în medii cu pH-ul 5,0, în prezența metalocomplexilor Ba și Sr constituie 114,46 U/mL (a 5-ea zi) și 148,06 U/mL (a 6-a zi) - în cazul I-ui compus, respectiv, 116,43 U/mL (a 5-ea zi) și 120,02 U/mL (a 6-a zi) - în cazul celui de-al II-lea compus, față de valoarea de 76,23 U/mL și 92,02 U/mL, corespunzător, marcată în proba martor. Efectul stimulator înregistrat în experiențele anterioare se menține, sporul activității constituind 50,2 și 60,9%, față de proba martor din aceeași zi - pentru compusul bariului și 52,7, respectiv, 30,4% - pentru metalocomplexul ce conține stronțiu. Comparând valorile relevate în a 5-ea zi de cultivare în probele cu stimulatori adiționați valoarea maximală a activității probei de referință prezentată în ziua a 6-a se constată sporul activității amilazelor cu 24,4 și 26,5%, respectiv, în cazul compușilor $[BaL^3\mu(NCS)_2Co(NCS)_2]$ și $[SrL^3][Co(NCS)_4]$, diferența dintre activitatea relevantă în ziua a 5-ea și a 6-a în varianta cultivată pe medii ce conțin complexul stronțului fiind neesențială.

La valorile pH-ului acid (pH-4,0) activitatea amilolitică este cu cca 24% (I-ul compus) și, respectiv, 40-60% (al II-lea compus) mai redusă față de activitatea probei Control cultivată pe

mediu cu pH optim, în absența compușilor coordinativi. O diminuare de cca 20-60% se marchează și în cazul variantelor cultivate pe medii cu pH 6,0 și 7,0.

În baza rezultatelor obținute se constată că picul activității enzimatică în probele cultivate în prezența compușilor coordinativi ai Ba și Sr cu liganzi polidentati (L^3) este înregistrat la pH-ul inițial al mediului de cultivare 5,0 - valoare stabilită anterior drept optimă pentru sinteza amilazelor exocelulare la micromiceta producătoare *A. niger* CNMN FD 06.

În rezultatul cercetărilor de utilizare a compușilor coordinativi ai Ba și Sr în calitate de stimulatori ai procesului de sinteză enzimatică facem următoarele concluzii:

- compușii coordinativi ai bariului și stronțului cu ligandul L^3 în concentrații mici (5,0 mg/L) manifestă influență cert stimulatorie și de intensificare a biosintezei amilazelor exocelulare la tulpina de micromicete *A. niger* CNMN FD 06 obiect cu semnificație biotehnologică;
- compusul coordinativ al bariului $[BaL^3 \cdot \mu(NCS)_2-Co(NCS)_2]$, în concentrația 5,0 mg/L, intensifică biosinteza amilazelor exocelulare la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06, depășind în ziua a 5-ea de cultivare cu 35,6% maxima controlului în ziua a 6-a de cultivare: 100,50 U/mL față de 73,77 U/mL în varianta control ce permite reducerea ciclului tehnologic cu 24 de ore. Efectul stimulator se păstrează și în ziua a 6-a de cultivare, depășind ziua a 8-a controlul cu 72,8%;
- compusul coordinativ al stronțului $[SrL^3] [Co(NCS)_4]$, în concentrația de 5,0 mg/L modifică termenul de manifestare a maximei de biosinteză a amilazelor la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06 din ziua a 6-a în ziua a 5-ea de cultivare (cu 24 de ore), depășind maxima controlului (ziua a 6-a) cu 51,0% (111,42 U/mL față de 73,77 U/mL în varianta control). Efectul stimulator se păstrează și în ziua a 6-a de cultivare, depășind controlul cu 32,8%;
- pentru tulpina *A. niger* CNMN FD 06 concentrațiile optime stabilite ale compușilor cu liganzi polidentati care exercită efect stimulator maximal (39,2 și, respectiv, 42,9%) asupra activității amilazelor exocelulare și de intensificare a procesului de biosinteză prezintă 1 mg/L - pentru $[BaL^3 \cdot \mu(NCS)_2-Co(NCS)_2]$ și 5 mg/L - în cazul metalocomplexului $[SrL^3] [Co(NCS)_4]$. Maxima activității enzimatică în variantele experimentale se înregistrează la pH-ul inițial al mediului de cultivare 5,0 - valoare stabilită anterior drept optimă pentru sinteza amilazelor exocelulare pentru micromiceta dată la cultivarea clasică.

4.3. Influența nanooxizilor metalici asupra activității enzimatică la tulpina în studiu

Avantajele obținerii enzimelor din surse microbiene în condițiile crizei actuale de materii prime și de energie au condus la intensificarea cercetărilor privind selectarea unor microorganisme producătoare, precum și metodelor moderne de ameliorare a potențialului biosintetic al producătorilor de enzime, inclusiv de enzime amilolitice.

În contextul dezvoltării progresive a nanotehnologiilor și impactului pe care acestea o manifestă asupra organismelor vii, conform multiplelor publicații consacrate [3, 27, 29, 48, 61, 92, 128, 155, 175, 181, 196, 200, 207, 209, 212, 220, 221] cercetările au continuat cu studierea influenței nanoparticulelor metalelor Ti, Fe, Cu și Zn, cu structură, dimensiuni și caracteristici diferite, asupra activității amilolitice a micromicetei în studiu.

Influența nanoparticulelor oxizilor de titan asupra activității amilolitice a tulpinii de fungi miceliali *A. niger* CNMN FD 06

Cercetările au inițiat cu evaluarea efectului nanocompozitelor de Ti cu structură și mărimi diferite: TiO₂ cu dimensiuni de 21 nm și <100 nm, TiSiO₄<50 nm. Monitorizarea activității amilolitice a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 s-a efectuat, la cultivare submersă, în condiții clasice, pe parcursul zilelor 5-7 - perioadă ce corespunde manifestării maxime a activității amilazelor la producător. Nanocompozitele au fost testate în concentrații de 5 mg/L, 10 mg/L și 15 mg/L. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 4.11. Pentru varianta Control dinamica activității amilazelor exocelulare a constituit: 62,13 U/mL în ziua a 5-ea, 79,58 U/mL în ziua a 6-a, 58,59 U/mL în ziua a 7-a. După cum urmează din tabelul 4.11, maxima biosintezei amilazelor în varianta Control se manifestă în ziua a 6-a de cultivare a producătorului.

Tabelul 4.11. Modificarea activității amilolitice la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06 sub influența nanoparticulelor de titan în dinamica cultivării submerse

Nano oxizii	Concentrații a, mg/L	Ziua a 5-ea		Ziua a 6-a		Ziua a 7-a	
		U/mL	% control	U/mL	% control	U/mL	% control
TiO ₂ 21 nm	5	77,08±0,02	124,06	69,36±0,01	77,42	51,83±0,04	88,46
	10	74,18±0,05	119,38	67,17±0,04	84,31	47,68±0,01	81,38
	15	73,09±0,10	117,64	65,79±0,09	82,67	56,61±0,07	96,62
TiO ₂ <100 nm	5	77,08±0,07	124,06	68,23±0,07	85,74	50,19±0,01	85,56
	10	76,11±0,04	122,50	66,50±0,03	83,56	57,95±0,02	98,90
	15	81,44±0,01	130,44	72,37±0,03	90,93	57,63±0,08	98,36
TiSiO ₄ <50 nm	5	76,59±0,03	123,27	69,25±0,02	87,02	54,09±0,09	92,32
	10	80,95±0,09	130,29	78,24±0,08	98,32	56,35±0,01	96,17
	15	78,59±0,02	126,49	75,48±0,03	94,85	55,70±0,03	95,06
Control	-	62,13±0,01	100,0	79,58±0,02	100,0	58,59±0,05	100,0

În variantele experimentale în ziua a 5-ea de cultivare se urmărește efectul biostimulator față de controlul zilei. Activitatea amilazelor este superioară controlului în toate variantele de concentrații testate. Astfel, în varianta cu aplicarea nanoparticulelor dioxidului de titan TiO_2 de 21nm efectul stimulator, în funcție de concentrația aplicată variază în limitele: 17,64-24,06%, cu 22,50 - 30,44% depășește nivelul controlului în variantele cu aplicarea nanoparticulelor dioxidului de titan TiO_2 cu dimensiuni <100 nm, cu 23,27 - 30,29%, în variantele cu nanoparticule titan siliciu oxid $TiSiO_4$ cu dimensiuni <50 nm.

Reieșind din tendințele certe de sporire a activității amilolitice și de reducere a duratei de cultivare, marcată la nanoparticulele de titan cu caracteristicile distincte în ziua a 5-ea de cultivare, permit remarcarea nanoparticulelor de titan testate ca potențiali biostimulatori ai biosintezei amilazelor exocelulare la tulpina de funghi miceliali *A. niger* CNMN FD 06.

Influența nanoparticulelor oxidului de fier și zinc asupra activității amilolitice a tulpinii de funghi miceliali A. niger CNMN FD 06

În cercetări s-au utilizat nanooxidul Fe_3O_4 cu dimensiuni 50 - 100 nm și nanooxidul de ZnO cu dimensiuni ≤ 50 nm. Nanooxidii metalici, similar experimentului precedent s-au introdus în mediul nutritiv de cultivare a tulpinii producătoare de amilaze *A. niger* CNMN FD 06 în concentrațiile: 5; 10 și 15 mg/L.

În conformitate cu datele obținute (Tab. 4.12.) maxima activității amilolitice a producătorului în varianta control se manifestă în ziua a 6-a de cultivare și constituie 101,99 U/mL, dinamica activității amilazelor exocelulare în perioada de activitate biosintetică maximă pentru tulpină - zilele 6-7 de cultivare, atingând nivelurile: 57,17 U/mL (ziua a 5-ea), 101,99 U/mL (ziua a 6-a), 82,99 U/mL ziua a 7-a.

Tabelul 4.12. Modificarea activității amilolitice a tulpinii de funghi miceliali *A. niger* CNMN FD 06, în cultură submersă, sub influența nanoparticulelor oxidului de Fe și Zn

Nano-oxizii	Concentrația, mg/L	Activitatea amilolitică					
		Ziua a 5-ea		Ziua a 6-a		Ziua a 7-a	
		U/mL	% control	U/mL	% control	U/mL	% control
Fe_3O_4 50-100 nm	5	65,20±0,03	114,0	106,31±0,02	104,2	73,61±0,01	88,7
	10	64,39±0,06	112,6	103,80±0,01	101,7	76,42±0,10	92,1
	15	67,59±0,11	118,2	103,24±0,05	101,2	77,36±0,09	93,3
ZnO ≤ 50 nm	5	59,58±0,07	104,2	99,51±0,07	97,6	67,98±0,06	81,9
	10	59,71±0,01	104,4	99,54±0,01	97,6	65,74±0,02	79,2
	15	63,59±0,02	111,2	100,77±0,00	98,8	74,55±0,01	89,8
Control	0	57,17±0,01	100,0	101,99±0,01	100,0	82,99±0,03	100,0

Rezultatele expuse în tabel marchează influența nanoparticulelor de Fe₃O₄ 50 - 100 nm asupra biosintezei amilazelor la tulpina *A. niger* CNMN FD 06 ca neutră, în condițiile experimentului, cu activitatea enzimatică ușor crescută (4,2 - 18,2%) față de nivelul controlului în ziua a 5-ea de cultivare și la nivelul maximei controlului în ziua a 6-a de cultivare.

Utilizarea nanoparticulelor de ZnO≤50 nm, manifestă influență inhibitoare, în ziua a 6-ea și a 7-ea de cultivare în toate valianțele de concentrații testate (5,0, 10,0 și 15,0 mg/L), în ziua a 5-ea activitatea amilolitică este la nivelul probei martor.

Influența nanoparticulelor de cupru cu dimensiuni și structuri diferite asupra activității amilolitice a micromicetei A. niger CNMN FD 06

În cercetări cu aplicarea nanoparticulelor de cupru s-au utilizat nanoparticulele oxidului de cupru (CuO) cu dimensiuni <50 nm și nanoparticule ale cuprului metalic Cu (99,5%) cu dimensiuni de 60 - 80 nm.

Rezultatele prezentate în Tabelul 4.13 marchează, pentru varianta control (în absența nanooxidilor testați), următoarele valori ale activității amilolitice: 35,13; 69,41 U/mL și 58,46 U/mL, respectiv, în a 5-ea, a 6-a și a 7-a zi de cultivare. Se constată că valoarea maximă a activității amilazelor exocelulare este manifestată în a 6-a zi de cultivare, depășind nivelul activității marcat la a 5-ea zi de cultivare cu 55,1% și cu 9,2% valoarea fixată în ziua a 7-a.

Tabelul 4.13. Influența nanoparticulelor de cupru, cu dimensiuni diferite, asupra activității amilolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06, la cultivarea submersă, în dinamică

Nano parti cule (NP)	Concen trația, mg/L	a 5-ea zi		a 6-a zi		a 7-a zi	
		U/mL	% control	U/mL	% control	U/mL	% control
CuO, <50 nm	5	58,18±0,02	165,6	64,16±0,01	92,4	59,01±0,03	100,9
	10	63,95±0,01	182,0	75,87±0,00	109,3	58,64±0,07	100,3
	15	54,73±0,05	155,8	57,70±0,04	83,1	59,07±0,10	101,0
Cu((99,5%) <60-80 nm	5	56,46±0,09	160,7	68,19±0,11	98,2	58,40±0,01	99,8
	10	58,18±0,07	165,6	76,69±0,08	110,5	59,19±0,04	101,3
	15	28,20±0,03	80,27	64,88±0,04	93,5	48,29±0,06	82,6
Control	0	35,13±0,02	100,0	69,41±0,03	100,0	58,46±0,02	100,0

Analiza rezultatelor obținute în cazul cultivării micromicetei, în prezența nanoparticulelor, relevă valori net superioare comparativ cu proba de referință în a 5-ea zi. De remarcat că efectul stimulator maxim se constată la utilizarea concentrațiilor minime ale nanooxidilor (5 mg/L și 10 mg/L). Astfel, nanooxidul de cupru cu dimensiuni <50 nm asigură majorarea activității enzimatică cu 65,6 și, respectiv, 82,4% la concentrația de 5 mg/L și 10

mg/L. La majorarea concentrației administrate până la 15 mg/L efectul stimulator se păstrează, înregistrându-se, însă, o diminuare a acestuia până la 55,8%.

Nanoparticulele de cupru (99,5%) cu dimensiuni < (60-80 nm) asigură creșterea activității amilolitice cu 60,7% și 65,6%, corespunzător la concentrațiile 5 mg/L și 10 mg/L. La cultivarea micromicetei în prezența nano- Cu cu dimensiunea <60 - 80 nm în concentrație de 15 mg/L se constată scăderea activității enzimatică cu 19,7%, comparativ cu controlul. Valorile maxime ale activității amilazelor exocelulare, în variantele experimentale cu aplicarea nanocompozitelor de cupru, se înregistrează în a 6-a zi de cultivare și coincid cu maxma variantei control. Sporul determinat de nanoparticule este atenuat, menținându-se doar la concentrația de 10 mg/L pentru ambele NP CuO <50 nm și Cu (99,5%)< (60 - 80 nm), constituind respectiv 9,3% și 10,5%.

La a 7-a zi de cultivare a tulpinii producător în prezența nanoparticulelor testate, indiferent de concentrația aplicată, se remarcă scăderea treptată a activității enzimatică până la nivelul probei control (99,9 - 101,3%). Excepție constituie doar varianta cultivată pe medii ce includ nano-Cu (99,5%) de <60 - 80 nm, în concentrație de 15 mg/L, în cazul căreia se înregistrează inhibarea activității amilolitice cu 17,4% față de proba de referință.

Astfel, drept rezultat al analizelor efectuate, se constată că NP CuO <50 nm și Cu (99,5%) < 60 - 80 nm, în concentrație de 10 mg/L, pot fi utilizate pentru intensificarea procesului de sinteză a enzimelor amilolitice la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06, acestea asigurând obținerea la a 5-ea zi de cultivare (cu 24 h mai devreme) a unui nivel înalt al activității enzimatică, practic echivalent cu activitatea marcată la a 6-a zi de cultivare în proba control: 63,95 U/mL și 58,18 U/mL în raport cu 69,41 U/mL în varianta control, pierderile fiind neesențiale (7,8 % în cazul nano-CuO cu dimensiuni <50 nm și, respectiv, 16,2% în cazul nano-Cu (99,5%) cu dimensiuni < 60 - 80 nm.

Selectarea concentrațiilor optime ale nanoparticulelor de cupru și titan ce asigură sinteza maximală a amilazelor exocelulare la micromiceta A. niger CNMN FD 06

Conform datelor prezentate de Larue C., și col. (2011) [167], Вардуни Т.В., (2017) [61], Baker S., (2017) [109], nanocompozitele, în diferite concentrații, influențează diferit asupra materialului cercetat.

În vederea selectării concentrațiilor optime ce asigură sinteza maximală a amilazelor exocelulare la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06 în studiu au fost incluse nanoparticule de cupru cu dimensiuni de 60 - 80 nm și nanooxidii CuO <50 nm, TiO₂ <100 nm și TiSiO₄ <50 nm, selectate anterior drept potențiali stimulatori ai activității amilolitice. Nanooxidii metalici au fost

adiționați la mediul de cultivare a tulpinii producătoare în concentrații de 5 mg/L-20 mg/L, diapazonul de concentrații fiind extins distinct pentru fiecare compus în parte, în funcție de rezultatele obținute anterior. În calitate de probă de referință a servit activitatea variantei cultivate în absența nanoparticulelor. Experiențele au fost realizate în dinamică, pe parcursul a 5-6 zile de cultivare - perioada de activitate biosintetică maximă pentru tulpina producătoare.

Conform datelor prezentate în Tabelul 4.14. se constată că maximul activității amilolitice a producătorului se manifestă în ziua a 6-a de cultivare, constituind 82,23 U/mL în proba de referință și 58,61 - 88,14 U/mL în variantele experimentale, față de 62,55 U/mL și, respectiv, 52,38 - 74,00 U/mL marcate în ziua a 5-ea. În ziua a 6-a cele mai înalte valori ale activității enzimatică au fost marcate la probele cultivate în prezența nanooxidului de cupru, activitatea variind între 76,33-88,14 U/mL, ceea ce constituie 92,8 - 107,2% față de control.

Tabelul 4.14. Influența nanoparticulelor oxidului de Cu și Ti, în diferite concentrații, asupra activității amilolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06

Nano particule	Concentrația, mg/L	a 5-ea zi		a 6-a zi	
		Activitatea, U/mL	%, față de control	Activitatea, U/mL	%, față de control
CuO <50 nm	5,0	65,09±0,02	104,1	83,42±0,03	101,4
	10,0	74,00±0,03	118,3	88,14±0,04	107,2
	15,0	64,25±0,01	102,7	76,33±0,01	92,8
Cu 60-80 nm	5,0	66,79±0,06	106,8	83,42±0,04	101,4
	10,0	72,72±0,02	116,3	79,87±0,04	97,1
	15,0	61,70±0,10	98,6	60,97±0,09	74,2
TiSiO ₄ <50 nm	5,0	60,01±0,05	95,9	62,16±0,04	75,6
	10,0	60,85±0,02	97,3	59,79±0,02	72,7
	15,0	59,16±0,07	94,6	60,97±0,05	74,2
TiO ₂ <100 nm	10,0	61,70±0,08	98,6	58,61±0,06	71,3
	15,0	53,22±0,02	85,1	62,16±0,03	75,6
	20,0	52,38±0,05	83,7	55,07±0,04	67,0
Control	0,0	62,55±0,2	100,0	82,23±0,01	100,0

În cazul NP de cupru cu dimensiuni de 60 - 80 nm, activitatea scade treptat odată cu creșterea concentrației de nanoparticule, constituind 83,42 U/mL în varianta ce conține 5 mg/L de compus și 69,24 U/mL la concentrația maximă testată, pe când în cazul nanooxidilor de titan activitatea variază în limitele de 55,07 - 62,16 U/mL, la toate concentrațiile evaluate relevându-se un efect inhibitor pronunțat (cca 30% sub nivelul controlului). Cu referire la compușii titanului un efect neutru sau slab inhibitor (diminuare de până la 16%) a fost înregistrat și la a 5-ea zi de cultivare, activitatea variind între 52,38 - 61,70 U/mL. Spre deosebire de aceștia

nanoparticulele ce conțin cupru au manifestat o influență preponderent pozitivă, activitatea variind între 64,25-74,00 U/mL, față de 62,55 U/mL în proba control. Totodată, de remarcat că nanoparticulele de CuO <50 nm și Cu 60 - 80 nm, în concentrație de 10 mg/L, intensifică procesul de sinteză a amilazelor la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06. Astfel, în ziua a 5-ea de cultivare activitatea enzimatică constituie 74,00 U/mL și, respectiv, 72,72 U/mL, depășind nivelul controlului din aceeași zi cu 16 - 18% și fiind doar cu 10 - 12% mai joasă față de valoarea maximă marcată de proba de referință în a 6-a zi de cultivare. Datele prezentate corelează cu cele obținute prealabil și confirmă eficacitatea aplicării nanoparticulelor de cupru (CuO <50 nm și Cu 60 - 80 nm), în concentrație de 10 mg/L, în tehnologiile de cultivare a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 drept stimulatori ce asigură obținerea preparatelor enzimaticice amilolitice cu activitate înaltă în termeni restrânși (cu 24 de ore mai devreme față de Control) și, respectiv, cu cheltueli reduse.

Selectarea pH-ului inițial al mediului de cultivare ce asigură sinteza maximală a amilazelor exocelulare la micromiceta A. niger CNMN FD 06

În vederea selectării pH-ului inițial al mediului de cultivare ce asigură sinteza maximală a amilazelor exocelulare la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06, la etapa ulterioară a investigațiilor nanoparticulele de cupru cu dimensiuni de <50 nm și 60 - 80 nm, în concentrațiile optime selectate, au fost incluse în mediul nutritiv cu diferite valori ale pH-ului - 4,0; 5,0; 6,0 și 7,0. În calitate de probă de referință a servit activitatea enzimatică a variantei cultivate în absența nanoparticulelor, pe mediu cu pH inițial 5,0, selectat anterior drept optim pentru asigurarea sintezei enzimelor amilolitice. Rezultatele obținute sunt reflectate în Tab. 4.15.

Tabelul 4.15. Influența nanoparticulelor CuO < 50 nm și Cu 60 - 80 nm, în concentrație optim selectată (5 mg/L), asupra activității amilolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 A, în funcție de diferite valori ale pH-ului mediului de cultivare

Nanoparticule	pH-ul mediului	a 5-ea zi		a 6-a zi	
		Activitatea, U/mL	%, față de control	Activitatea, U/mL	%, față de control
CuO < 50 nm (10 mg/L)	4,0	36,17±0,02	56,1	44,82±0,03	53,3
	5,0	75,27±0,01	116,8	81,47±0,02	96,9
	6,0	37,12±0,04	57,6	42,20±0,03	50,2
	7,0	21,10±0,05	32,8	40,89±0,04	48,6
Cu 60-80 nm (10 mg/L)	4,0	49,36±0,01	76,6	46,13±0,01	54,9
	5,0	73,85±0,04	114,6	73,62±0,03	87,5
	6,0	45,59±0,01	70,8	52,67±0,02	62,6
	7,0	37,12±0,02	57,6	44,82±0,02	53,3
Control	0,0	64,43±0,01	100,0	84,09±0,01	100,0

Conform datelor din tabel se constată că, pH-ul optim ce asigură sinteza maximală a enzimelor amilolitice la cultivarea micromicetei producătoare, în prezența nanoparticulelor de cupru, este 5,0, fiind similar valorii optime stabilite anterior pentru proba cultivată în condiții clasice. Astfel, activitatea enzimatică a variantelor cultivate pe medii ce conțin $\text{CuO} < 50 \text{ nm}$ și $\text{Cu} 60\text{-}80 \text{ nm}$ constituie $75,27 \text{ U/mL}$ (a 5-ea zi) și $81,47 \text{ U/mL}$ (a 6-a zi), respectiv, $73,85$ (a 5-ea zi) și $73,62 \text{ U/mL}$ (a 6-a zi), comparativ cu $64,43 \text{ U/mL}$ și $84,09 \text{ U/mL}$, la control.

Efectul pozitiv relevat în investigațiile anterioare se menține, nivelul activității probelor experimentale din a 5-ea zi fiind practic la nivelul controlului din ziua a 6-a, cu o diminuare de doar $10,5\text{-}12,2\%$. Micșorarea sau creșterea valorii pH-ului mediului nutritiv sub/peste valoarea optimă determină scăderea activității enzimatică cu cca $30\text{-}70\%$, efectul negativ, fiind mai pronunțat, în special, în a 5-ea zi de cultivare.

Astfel, în baza rezultatelor obținute s-a constatat că, maximul activității enzimatică în probele cultivate, în prezența nanoparticulelor de cupru, cu dimensiuni diferite, este asigurat de pH-ul inițial al mediului de cultivare $5,0$ - valoare stabilită anterior drept optimă pentru sinteza enzimelor amilolitice la tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06.

Stabilirea parametrilor optimi de aplicare a nanocompozitelor preferențiale în cultivarea submersă a tulpinii în studiu

Pentru selectarea concentrațiilor optime ale nanoparticulelor de cupru și titan, ce asigură sinteza maximală a amilazelor exocelulare la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06, în lichidul cultural au fost incluse nanoparticule de cupru cu dimensiuni de $60\text{-}80 \text{ nm}$ și nanooxizii $\text{CuO} < 50 \text{ nm}$, $\text{TiO}_2 < 100 \text{ nm}$ și $\text{TiSiO}_4 < 50 \text{ nm}$, care au demonstrat capacitatea de a stimula activitatea amilolitică la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06. (Fig 4.6).

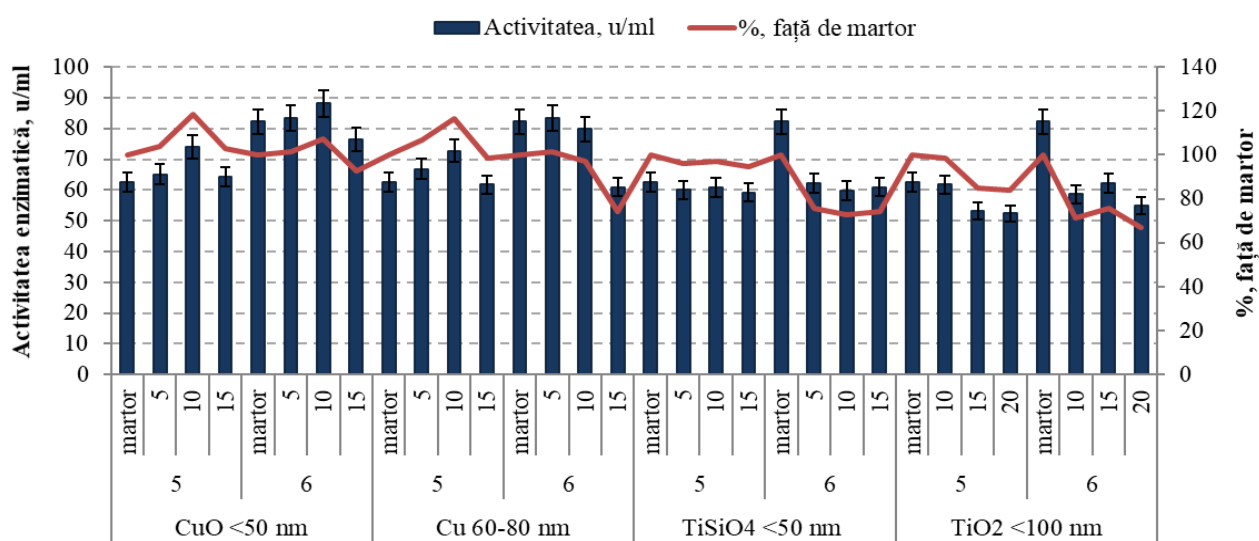


Fig. 4.6. Influența nanoparticulelor oxidului de Cu și Ti, în diferite concentrații, asupra activității amilolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06

Nanooxizii metalici au fost adăuati la mediul de cultivare a tulpinii producătoare în concentrații de 5 - 20 mg/L, diapazonul de concentrații fiind extins distinct, pentru fiecare compus în parte, în funcție de rezultatele obținute anterior.

În calitate de probă de referință a servit activitatea variantei cultivate în absența nanoparticulelor. Experiențele au fost realizate în dinamică, pe parcursul a 5 - 6 zile de cultivare - perioada de activitate biosintetică maximă pentru tulpina producătoare.

Conform datelor prezentate în figura 4.6. se constată că, maximul activității amilolitice a producătorului se manifestă în ziua a 6-a de cultivare, constituind 82,23 U/mL în proba de referință și 58,61 - 88,14 U/mL în variantele experimentale, față de 62,55 U/mL și, respectiv, 52,38 - 74,00 U/mL marcate în ziua a 5-ea. În ziua a 6-a cele mai înalte valori ale activității enzimatică au fost marcate la probele cultivate în prezența nanooxidului de cupru, activitatea variind între 76,33 - 88,14 U/mL, ceea ce constituie 92,8 - 107,2% față de control.

În cazul particulelor de cupru cu dimensiuni de 60-80 nm, s-a observat că, activitatea scade treptat odată cu creșterea concentrației de nanoparticule, constituind 83,42 U/mL în varianta ce conține 5 mg/L de compus și 69,24 U/mL la concentrația maximă testată, pe când în cazul nanooxizilor de titan activitatea variază în limitele de 55,07-62,16 U/mL, la toate concentrațiile evaluate relevându-se un efect inhibitor pronunțat (cca 30% sub nivelul controlului). Cu referire la compușii titanului un efect neutru sau slab inhibitor (diminuare de până la 16%) a fost înregistrat și la a 5-ea zi de cultivare, activitatea variind între 52,38-61,70 U/mL. Spre deosebire de aceștia nanoparticulele ce conțin cupru au manifestat o influență preponderent pozitivă, activitatea variind între 64,25-74,00 U/mL, față de 62,55 U/mL în proba control. Totodată, de remarcat că, nanoparticulele de CuO <50 nm și Cu 60 - 80 nm, în concentrație de 10 mg/L, intensifică procesul de sinteză a amilazelor la micromiceta *A. niger* CNMN FD 06. Astfel, în ziua a 5-ea de cultivare activitatea enzimatică constituie 74,0 și, respectiv, 72,72 U/mL, depășind nivelul controlului din aceeași zi cu 16 - 18% și fiind doar cu 10 - 12% mai joasă față de valoarea maximă marcată de proba de referință în a 6-a zi de cultivare. Datele prezentate corelează cu cele obținute prealabil și confirmă eficacitatea aplicării nanoparticulelor de cupru de diferite dimensiuni (CuO < 50 nm și Cu 60 - 80 nm), în concentrație de 10 mg/L, în tehnologiile de cultivare a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 drept stimulatori ce asigură obținerea preparatelor enzimatică amilolitice cu activitate înaltă în termeni restrânși (cu 24 h mai devreme față de control) și, respectiv, cu reducerea cheltuielilor pentru realizarea procesului de sinteză.

În baza rezultatelor obținute deducem că, maximul activității enzimatică în probele cultivate în prezența nanoparticulelor de cupru, cu dimensiuni diferite, este asigurat de pH-ul

inițial al mediului de cultivare 5,0 - valoare stabilită anterior drept optimă pentru sinteza enzimelor amilolitice la tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06.

Datele obținute au fost valorificate în elaborarea procedurii de sinteză orientată a amidazelor conform schemei expuse (Fig. 4.7).

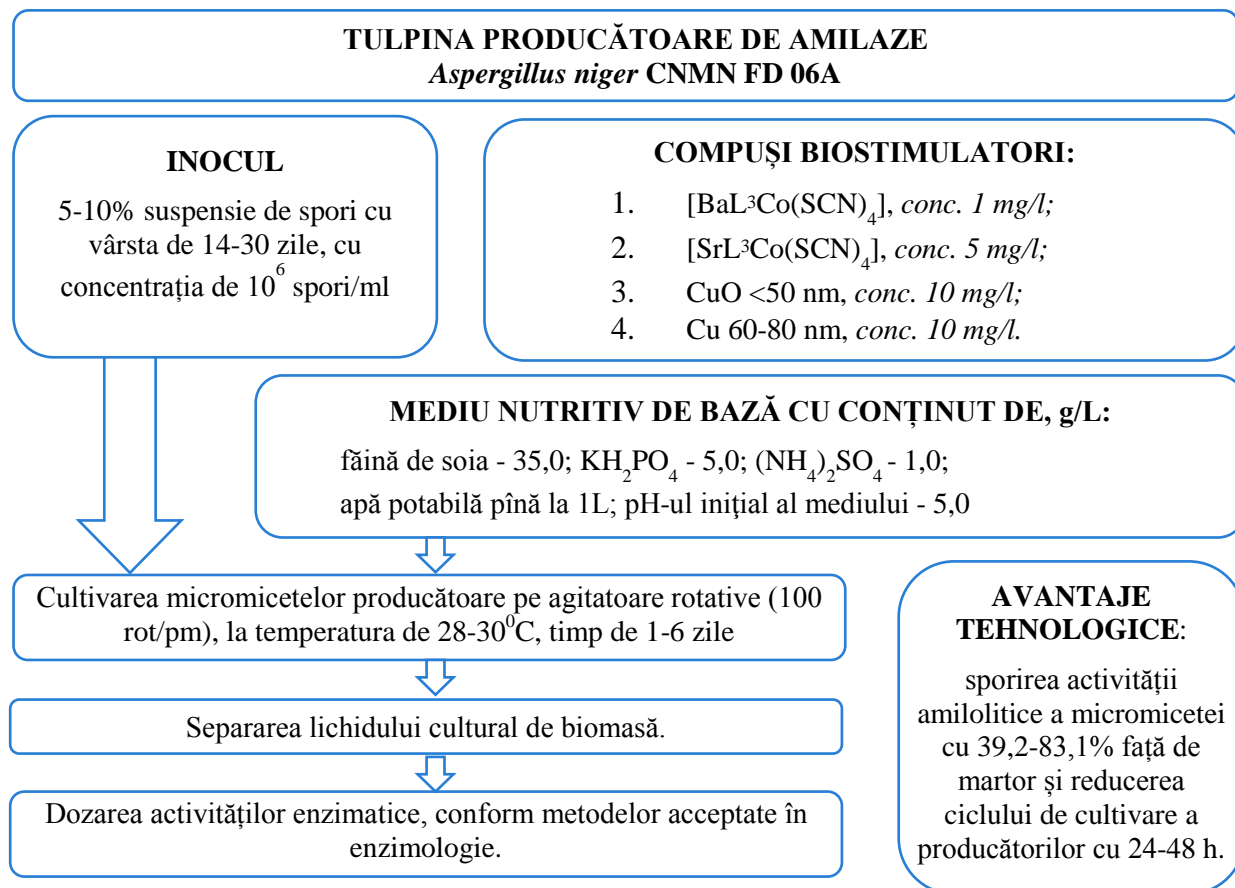


Fig. 4.7. Schema de realizare a procedurii de cultivare a tulpinii de micromicete *A. niger* CNMN FD 06, în prezența biostimulatorilor

4.4. Validarea pilot a biotehnologiilor avansate de obținere a preparatelor enzimice amilolitice

În vederea stabilirii parametrilor optimi de cultivare a micromicetei, în condiții clasice, fără biostimulatori, la faza inițială de validare a biotehnologiilor avansate de obținere a preparatelor enzimice s-a respectat regimul optim: volumul mediului 2,0 L, aerarea 2,0 L/L mediu/min., agitare 180 rpm., stabilit în cercetările similare realizate pentru tulpinile fungice *R. arrhizus* și *F. gibbosum* - producătoare de lipaze și, respectiv, proteaze [49].

Pentru verificarea duratei de cultivare, în primul set de experiențe activitatea enzimatică s-a determinat pe parcursul zilelor a 4-7 de cultivare. Similar cultivării, în partid de retorte, maxima de biosinteză a amidazelor se manifestă în ziua a 6-a de cultivare, însă regimul dat nu a asigurat manifestarea pe deplin a potențialului biosintetic al producătorului, activitatea variind

între 16,47 U/mL în ziua a 4-a și, respectiv, maxima atinsă în ziua a 6-a ($58,56 \pm 0,30$ U/mL), aceasta fiind mai joasă comparativ cu rezultatele stabilite anterior la cultivare în retorte Erlenmayer. În ziua a 7-a activitatea amilolitică scade până la 11,37 U/mL, fapt de confirmă, repetat, durata optimă de 5 - 6 zile pentru cultivarea tulpinii în studiu.

Conform rezultatelor prezentate în literatura de specialitate [97, 120, 178], datorită faptului că sporii unor micromicete din genul *Aspergillus* au tendința de a se aglomera odată cu germinarea, forma morfologică predominantă a acestora este de tip peleți - grupuri sferice stabile compuse dintr-o rețea ramificată de hife, cu forme variind de la netede și sferice până la alungite. În aplicațiile industriale, forma dată este, de obicei, preferată în procesul de fermentație grație vâscozității reduse a mediului de cultivare, fapt ce facilitează procesul de separare a peleților de mediu, precum și asigură transferul și accesibilitatea mai mare a oxigenului și nutrienților [137]. În același timp, în cazul formării unor aglomerări de peleți sau peleți mari, dezavantajul major constă în difuzia limitată a nutrienților și insuficiența oxigenului spre centrul activ al acestora. Controlul dimensiunii peleților (dispersarea acestora, fără deteriorare) reprezintă o strategie utilă pentru îmbunătățirea producției de substanțe active de interes biotehnologic, cum ar fi enzimele.

În acest sens un factor important de manipulare este viteza de agitare (rpm) [152, 187].

La cultivarea în bioreactoare, variabilele hidrodinamice exercită o influență mare asupra morfologiei celulare a microorganismului [206]. În comparație cu retortele agitate, rata maximă de distribuire a energiei determinată de agitare și aerare este, aproximativ, de 10 ori mai mare, ceea ce explică diferențele considerabile în morfologia celulelor [120, 189].

În contextul celor expuse în al doilea set de experiențe viteza de agitare a fost redusă până la 100 rpm, iar valorile celorlalți parametri rămân neschimbați. Totodată, mediul de cultivare a fost suplimentat cu surse adiționale de azot, incluzându-se 9 g/L de azotat de sodiu.

În rezultat, în cea de-a doua variantă experimentală, valorile activității amilolitice au fost mai înalte - 44,70 U/mL în ziua a 4-a și, respectiv, maxima de activitate - 73,80 U/mL în ziua a 6-a de cultivare, încadrându-se, astfel, în intervalele constatate anterior la cultivarea micromicetei în retorte Erlenmayer.

Rezultatele obținute au servit ca puncte de reper pentru a continua cercetările în vederea stabilirii parametrilor tehnologici principali (concentrația O_2 dizolvat, viteza de agitare, durata ciclului biologic etc.) la cultivarea avansată a tulpinii de fungi miceliali *A. niger* CNMN FD 06, în condiții de stație pilot, cu aplicarea:

- a) compușilor coordinativi ai bariului ($[Ba(L)_3][Co(SCN)_4]$) și stronțului ($[Sr(L)_3][Co(SCN)_4]$);
- b) nanooxidilor cuprului metalic (Cu 60 - 80 nm) și titanului (TiO_2).

4.4.1. Stabilirea parametrilor tehnologici principali la cultivarea submersă avansată a tulpinii *A niger* CNMN FD 06, cu aplicarea compușilor coordinativi ai bariului și stronțului, în condiții de stație pilot

Există numeroase date în literatura de specialitate ce reflectă rolul metalelor în metabolismul microorganismelor, acestea fiind încorporate în unele enzime microbiene - amilaze (Ca), proteaze, polimeraze etc. [69].

Utilizarea compușilor coordinativi ai metalelor în calitate de stimulatori ai activității biologice a organismelor este una dintre direcțiile principale de cercetare pentru soluționarea unor probleme ale biotehnologiilor moderne. Actualmente se acordă o atenție deosebită sintezei orientate a substanțelor bioactive de către microorganisme, datorită particularităților specifice de biosinteză, metabolismului adaptiv, ciclului scurt de dezvoltare și cheltuelilor reduse de obținere a substanțelor biologice active. Din acest punct de vedere, microorganismele sunt recunoscute ca surse economice avantajoase de obținere a unei game largi de substanțe bioactive importante: enzime, antibiotice, vitamine, etc. [5, 8, 9, 11, 16, 117].

Astfel, în scopul stabilirii condițiilor optime de cultivare a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06, în prezența compușilor coordinativi ai bariului și stronțului cu ligandul L^3 , remarcați prin proprietăți biostimulatoare și de intensificare a biosintezei amilazelor, la nivel de stație pilot, cultivarea s-a realizat în condițiile optime stabilite la cultivarea clasică a producătorului: volumul mediului 2,0L, aerarea 2,0 L/L mediu/min., mediu suplimentat cu 9,0 g/L de $NaNO_3$. Totodată, ținând cont de faptul că, adăugarea nanoparticulelor, microparticulelor metalice la cultivarea *A. niger* în bioreactoare poate influența morfologia acestora [40, 53], viteza de agitare, folosită ca factor de variație a dimensiunii peleților au fost setați doi parametri: 100 rpm și 180 rpm.

Compusul coordinativ al bariului cu ligand polidentat, $[Ba(L)_3][Co(SCN)_4]$, unde L^3 - prezintă esterul dimetilic al acidului 2,6-piridindicarboxilic a fost inclus în mediul de cultivare în concentrația optimă de 1 mg/L. Probele pentru determinarea activității enzimatică au fost prelevate în a 5-a și a 6-a zi de cultivare.

S-a constatat că compusul bariului exercită efect pozitiv asupra acumulării amilazelor în ambele zile de cultivare, activitatea constituind 73,85 și, respectiv, 84,33 U/mL, cu un spor de 24,6 și respectiv 14,3% față de control (Tab. 4.16).

Deși influența benefică a compusului se menține la transferul cultivării micromicetei producătoare la nivel de fermentator, sporul relevat este mai redus comparativ cu cel stabilit la nivel de retortă (cca 40% față de valoarea maximală a controlului).

Contrar, la reducerea numărului de rotații până la 100 rpm, activitatea amilolitică a constituit 113,55 și respectiv 136,08 U/mL, respectiv, în a 5-a și a 6-a zi de cultivare, sporul

activității enzimatice asigurat de suplimentarea mediului cu metalocomplexul bariului fiind 91,6 și 84,4% față de control, probele de referință din aceeași zi (Tab. 4.16).

De remarcat că în ziua a 5-ea de cultivare activitatea amilolitică a depășit nivelul maximal al probei control relevat în ziua a 6-a, sporul activității în raport cu acesta constituind 53,9%.

Tabelul 4.16. Dinamica activității amilolitice la tulpina de micromicete

A. niger CNMN FD 06, la cultivare avansată, cu aplicarea compusului coordinativ [Ba(L)₃][Co(SCN)₄], conc. 1 mg/L, NaNO₃ - 9,0 g/L, în condiții de stație pilot

Condiții de agitare	Activitatea amilolitică, U/mL			
	a 5-ea zi	%, față de control	a 6-a zi	%, față de control
180 rpm	73,85± 0,05	124,6	84,33± 0,06	114,3
100 rpm	113,55± 0,05	191,6/ 153,9*	136,08± 0,07	184,4
Control	59,28±0,05	100,0	73,80± 0,12	100,0

*% față de controlul zilei/față de maxima controlului (ziua a 6-a)

La cultivarea micromicetei în prezența compusului stronțului [Sr(L)₃][Co(SCN)₄], folosit în concentrație de 5 mg/L, cu respectarea regimurilor tehnologice setate s-a constatat că, în ambele seturi experimentale, maximul activității enzimatice se marchează în a 5-ea zi de cultivare. În primul caz activitatea a constituit 59,28 U/mL, fiind cu 20% mai înaltă față de controlul din aceeași zi.

La diminuarea vitezei de agitare, în condiții de stație pilot, (Tab. 4.17.) activitatea amilolitică a fost semnificativ mai înaltă, variind între 56,66 - 93,90 U/mL. În a 5-ea zi de cultivare activitatea a fost cu 58,4% mai înaltă față de martorul din aceeași zi, practic menținându-se efectul stabilit anterior la nivel de retortă (cca 40%).

Tabelul 4.17. Dinamica activității amilolitice la tulpina de micromicete A. niger CNMN FD 06, la cultivare avansată, cu aplicarea compusului coordinativ [Sr(L)₃][Co(SCN)₄], conc. 5 mg/L, NaNO₃ - 9,0 g/L, în condiții de stație pilot

Condiții de agitare	Activitatea amilolitică, U/mL					
	a 4-a zi	%, față de control	a 5-ea zi	%, față de control	a 6-a zi	%, față de control
180 rpm	61,33±0.05	137,2	71,22±0,08	120,1	53,82± 0.01	72,9
100 rpm	79,51± 0.02	177,9 / 107,7*	93,90± 0,07	158,490/ 127,2*	56,66± 0.03	76,8
Control	44,70± 0.10	100,0	59,28±0,05	100,0	73,80± 0.12	100,0

*% față de controlul zilei/față de maxima controlului (ziua a 6-a)

Totodată, valoarea dată a depășit cu 27,2% nivelul maximal al probei de referință relevat la a 6-a zi. De remarcat inclusiv faptul intensificării esențiale a biosintezei amilazelor la tulpina producătoare în condițiile experimentului. Astfel, la a 4-a zi de cultivare activitatea enzimatică a fost destul de înaltă (79,51 U/mL) fiind practic similară cu nivelul relevat la proba de referință în a 6-a zi, sporul față de controlul zilei constituind 77,9%.

În concluzie, cultivarea micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 la nivel de stație pilot, în condiții dirijate pe medii ce includ compusul coordinativ al stronțului - $[\text{Sr}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{SCN})_4]$, în concentrație de 5 mg/L, cu respectarea regimului stabilit - volumul mediului 2 L, aerarea 2,0 L/L mediu / min, agitarea 100 rpm. - oferă posibilitatea obținerii preparatului enzimatic amilolitic cu activitate înaltă, cu 48 h mai devreme.

Deci, compușii complecși, care conțin în calitate de ioni coordinatori atomi ai metalelor, pot avea un rol important în obiectele biologice, manifestându-se în calitate de stimulator sau inhibitor ai biosintezei multor substanțe biologic active și, mai ales, ale enzimelor.

4.4.2. Stabilirea parametrilor tehnologici principali la cultivarea avansată cu aplicarea nanooxidilor cuprului și titanului în condiții de stație pilot

Este greu de apreciat importanța nanoparticulelor în enzimologie. Complexitatea metabolică a microorganismelor complică analiza și identificarea caracterului interacțiunii acestora cu nanoparticulele. Compoziția chimică, dimensiunile, concentrația NP determină gradul de acțiune a acestora asupra caracterelor biochimice ale microorganismelor. În aceeași ordine de idei este recomandată corelarea acțiunii NP cu parametrii tehnologici optimali de biosinteză a produsului. Nanoparticulele oxidilor metalici sunt atractivi pentru aplicare în biotehnologiile moderne prin faptul că pot îmbunătăți și spori calitatea și randamentul produselor biologic active sintetizate de microorganisme [3, 27, 29, 48, 61, 92, 94, 109, 127, 174, 175, 188, 190, 196, 200, 208].

Cele menționate mai sus confirmă perspectiva continuării cercetărilor în această direcție pentru optimizarea procesului de biosinteză microbiană la tulpina în studiu.

Experiențele au fost setate la două regimuri de cultivare:

I - volumul mediului 2 l, aerarea 2,0 L/L mediu/min, agitarea 100 rpm;

II - volumul mediului 2 l, aerarea 2,0 L/L mediu/min, agitarea 180 rpm.

Cercetările de stabilire a parametrilor tehnologici principali (concentrația O_2 dizolvat, viteza de agitare, durata ciclului biologic etc.) au demonstrat (Fig. 4.8.) că, micromiceta pe parcursul ciclului biologic ajustează pH-ul mediului, acesta variind de la 4,80 (ziua a 3-ea) cu tendință de creștere stabilă până la 5,50 (ziua a 6-a) de cultivare, iar conținutul de oxigen

dizolvat este determinat de intensitatea proceselor fiziologice ale tulpinii, fiind remarcat un consum maxim în faza de creștere exponențială 88,0%, ca ulterior să scadă până la 3,0% în faza de declin.



Data 08 - 11 aprilie 2023

ora	7 ³⁷	9 ³⁷	13 ³⁷	21 ³⁷	23 ³⁷	01 ³⁷	03 ³⁷	05 ³⁷	07 ³⁷	07 ³⁷	13 ³⁷
pH	4,80	5,04	5,04	5,20	5,20	5,20	5,30	5,40	5,50	5,50	5,50
O₂ %	5,0	88,0	79,0	70,0	58,0	40,0	18,0	65,0	35,0	3,0	3,0
t⁰C	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30

Fig. 4.8. Dinamica parametrilor de t⁰C, pH și conținutul de O₂ dizolvat, la cultivarea tulpinii fungice *A. niger* CNMN FD 06, în condiții de stație pilot

Ținând cont de rezultatele studiilor anterioare privind influența NP asupra tulpinii în studiu, nanooxizii metalici ai cuprului și titanului au fost adăugați la mediul de cultivare a tulpinii producătoare în concentrații de 10 și, respectiv, 15 mg/L.

Similar experiențelor anterioare, valorile superioare ale activității enzimatică s-au relevat la al doilea regim de cultivare, cu picul marcat la 77,77 U/mL în ziua a 6-a de cultivare (Tab.4.18).

Tabelul 4.18. Dinamica activității amilolitice la tulpina de micromicete *A. niger* CNMN FD 06 A la cultivare avansată cu aplicarea nanoparticulelor de cupru metalic (60 - 80 nm), conc. 10 mg/L, NaNO₃ - 9,0 g/L, în condiții de stație pilot

Condiții de agitare	Activitatea amilolitică, U/mL			
	a 5-ea zi	%, față de control	a 6-a zi	%, față de control
180 rpm	54,59±0,02	92,1	77,77±0,02	105,4
100 rpm	61,33± 0,03	103,5 / 83,1*	81,25± 0,02	110,1
Control	59,28±0,05	100,0	73,80± 0,12	100,0

*% față de controlul zilei/față de maxima controlului (ziua a 6-a)

După datele din tabel remarcăm că, la cultivarea tulpinii în studiu în prezența nanoparticulelor de cupru cu dimensiuni de 60 - 80 nm, activitatea producătorului a variat între 54,59 - 77,77 U/mL - la I-ul regim, fiind practic la nivelul probei de referință, și între 61,33 -

81,25 U/mL - la al II-lea, prezentând o majorare de cca 10% în ziua a 6-a și o activitate doar cu 17% mai redusă față de maximul probei de referință - în ziua a 5-ea.

Astfel s-a constatat eficiența transferului tehnologiei avansate de cultivare a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 în prezența nanoparticulelor de cupru de la nivel de retortă la cel de stație pilot, intensificarea activității relevate anterior menținându-se inclusiv la cultivarea în fermentator, conform regimului II de cultivare.

Cu referire la procedeul de cultivare a tulpinii producătoare de amilaze în prezența nanooxidului TiO₂, efectul relevat la ambele regimuri de cultivare a fost mai benefic comparativ cu cel stabilit la nivel de retortă. Astfel, în ambele variante experimentale s-a constatat (Tab. 4.19) intensificarea procesului de sinteză a enzimelor amilolitice, micromiceta prezentând valori maxime ale activității enzimice în a 5-ea dea cultivare. La setarea vitezei de rotație la 180 rpm, activitatea a constituit 74,42 și, respectiv, 68,42 U/mL, în a 5-ea și a 6-a zi de cultivare, prima valoare fiind mai înaltă cu 25,5% față de martorul zilei și echivalentă cu nivelul maximal al acestuia.

Tabelul 4.19. Dinamica activității amilolitice la tulpinii *A. niger* CNMN FD 06, la cultivare avansată, cu aplicarea nanoparticulelor TiO₂ (100 nm), conc. 15 mg/L, NaNO₃ - 9,0 g/L), în condiții de stație pilot

Condiții de agitare	Activitatea amilolitică, U/mL			
	a 5-ea zi	%, față de control	a 6-a zi	%, față de control
180 rpm	74,42± 0,04	125,5 / 100,8*	68,42± 0,05	92,71
100 rpm	85,18± 0,02	143,7 / 115,4*	78,06± 0,04	100,8
Control	59,28±0,05	100,0	73,80± 0,12	100,0

*% față de ontrolul zilei/față de maxima ontrolului (ziua a 6-a)

Totodată, un efect stimulator mai pronunțat s-a evidențiat la cultivarea avansată cu aplicarea nanoparticulelor TiO₂, în concentrație de 15 mg/L, în condiții de stație pilot, conform următorului regim: volumul mediului 2 l, aerarea 2,0 L/L mediu / min, agitarea 100 rpm. Astfel, în a 5-ea zi de cultivare activitatea a depășit controlul din aceeași zi cu 43,7% și valoarea maximală a probei de referință (din a 6-a zi) cu 15.4%.

În concluzie, cultivarea micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 la nivel de stație pilot, în condiții dirijate, pe medii ce includ nanooxidului TiO₂, efectul relevat, la ambele regimuri de cultivare, a fost mai benefic comparativ cu cel stabilit la nivel de retortă fapt ce oferă oportunitatea obținerii preparatelor enzimice cu activitate amilolitică sporită, cu reducerea ciclului tehnologic de cultivare a producătorului cu 24 h.

Astfel rezultatele cercetărilor expuse în acest capitol prezintă căile de dirijare a biosintezei enzimelor amilolitice de către tulpina de fungi *A. niger* CNMN FD 06 prin utilizarea undelor milimetrice de intensitate joasă, adăugarea unor compuși complecși ai metalelor de tranziție cât și a unor nanocompozite la mediul de cultivare steril în calitate de biostimulatori ai procesului de enzimogeneză orientată.

4.5. Concluzii la capitolul 4

1. Utilizarea undelor milimetrice de intensitate joasă a demonstrat influență stimuloare asupra procesului de biosinteză a amilazelor la tulpina *A. niger* CNMN FD 06. În funcție de regimul emiterii și durata tratării, iradierea cu UMM atermice stimulează cu 13,0-65,0% biosinteza amilazelor la tulpina *A. niger* CNMN FD 06. Optimal pentru sporirea sintezei amilazelor acid-labile (cu 63,5 - 65,05%) și acid-stabile (cu 48,9 - 43,2%) a fost iradierea cu UMM în regim continuu, frecvența de 16Hz, timp de 20-30 minute.

2. În rezultatul cercetărilor realizate cu utilizarea a 32 de compuși coordinațivi s-a stabilit:

- din 11 compuși coordinațivi ai Zn (II), Cu (II), Co (II) și Cr (II), 8 și anume: DL Serinat Zn (II), L Serinat Zn (II), L Serinat Zn (II), DL Alaninat Zn (II), L Alaninat Zn (II), D Alaninat Zn (II), DL Alaninat DL Serinat Zn(II), Glicinat L Serinat Zn (II), adăuționați la mediul nutritiv steril al micromicetei în studiu în concentrații de 1,0; 5,0 și 10,0 mg/L au *efect de inhibare*, marcând activități net inferioare față de control. Cel mai profund efect de inhibare se atestă la L Serinat Zn (II) –doar 13,93 % față de control (100%);

- compușii coordinațivi ai Cu (II) și 5 compuși coordinațivi ai Co (II)-ului și Cr (II)-ului, au *efect de inhibare* asupra sintezei amilazelor exocelulare, gradul de inhibiție fiind determinat de concentrația aplicată a compusului coordinațiv: mărirea concentrației de la 1,0 mg/l la 10 mg/L a Co (PC)₃ H₂O, a provocat micșorarea activității amilolitice la tulpina în studiu cu 51,88%;

- compușii coordinațivi Glicinat DL Serinat Zn (II), Glicinat D Serinat Zn (II) și Zn (PC)₂ 4H₂O au manifestat *efect neutru* sau la nivelul controlului. De remarcăt că, la mărirea concentrației compusului Zn (PC)₂×4H₂O, de la 1,0 la 10 mg/L s-a observat trecerea de la efect inhibitor (1mg/L) la efect neutru la 5mg/L și creștere neesențială de 101,17 % la aplicarea unei concentrații de 10 mg/L;

- utilizarea dioximațiilor cobaltului cu fluor ([Co(DH)₂(Thio)₂] 3F[SiF₆] 1,5H₂O și [Co(DH)₂(Thio)₂] 2[SiF₆] 3H₂O)), compușilor coordinațivi ai Co (III) noi sintetizați ([Co(DH)₂(Thio)₂]F 3H₂O, [Co(DH)₂(Thio)₂]BF₄ 3H₂O, [Co(DH)₂(Py)₂]BF₄ H₂O) și compușilor coordinațivi ai Co (III) cu liganzi oximici ([Co(DH)₂(Thio)₂] 3F[SiF₆] 1,5H₂O (I),

[Co(DH)₂(Thio)₂]₂[SiF₆] 3H₂O (II)) a demonstrat *efect de stimulare a biosintezei*, odată cu sporirea concentrației compușilor în mediul de cultivare de la 1 mg/L la 5 mg/L. Optimală s-a dovedit a fi concentrația de 5 mg/L;

- rezultatele obținute la utilizarea compusului [Co(DH)₂(Thio)₂] BF₄·3H₂O arată că, concentrația de 1,0-5,0 mg/L, în condițiile experimentului, asigură activitatea superioară a amilazelor acid-labile 153,16- 158,09 U/mL. Activitatea superioară a amilazelor acid-stabile 118,08-131,27 U/mL se asigură de concentrații mai înalte de compus 10,0-40,0 mg/L, acest fapt a fost valorificat prin brevet de invenție (*Brevet de invenție MD Nr. 2833. BOPI. Nr.8. 2005*);

- compușii coordinați ai elementelor „s” (Ba, Sr, Ca) au demonstrat *efect stimulator* de 41,1% față de controlul zilei (70,92 U/mL) la aplicarea *Ba L³* în concentrație de 5 mg/L. Mărirea concentrației la 10 mg/L și 15 mg/L provoacă efect de inhibare, care crește odată cu creșterea duratei de cultivare a producentului: constituind: 9,0% (ziua a 5-ea), 23,6% și 39,4% (ziua a 6-a), 42,5 și 56,7% (ziua a 7-a) în raport cu controlul zilei;

- adăugarea, în mediul de cultură steril, a 5 mg/L de compus coordinațiv al *Sr L³* a manifestat *efect stimulator* în ziua a 5-ea de cultivare, în mărime de 57,1% față de controlul zilei.

3. Urmare a cercetărilor de optimizare a potențialului de biosinteză a tulpinii în studiu prin utilizarea nanoparticulelor deducem:

- utilizarea nanoparticulelor dioxidului de titan TiO₂ de diferite dimensiuni (TiO₂ 21 nm; TiO₂<100 nm; TiSiO₄ <50 nm) asigură activitate sporită a amilazelor în ziua a 5-ea de cultivare, în toate variantele de concentrații testate. De remarcat că aplicarea nanoparticulelor de TiO₂<100 nm, sporește activitatea cu 24,06-30,44 U/mL, iar în variantele cu nanoparticule de TiSiO₄ cu dimensiuni <50 nm cu 23,27-30,29 U/mL. Reieșind din tendințele certe de sporire a activității amilolitice și de reducere a duratei de cultivare, remarcăm nanoparticulele de titan testate ca potențiali biostimulatori ai biosintezei amilazelor exocelulare la micromiceta în studiu;

- aplicarea nanoparticulelor de cupru (CuO <50 nm și Cu 60 - 80 nm), în concentrație de 10 mg/L, în tehnologiile de cultivare a micromicetei în studiu asigură obținerea preparatelor enzimactice amilolitice cu activitate înaltă în termeni restrânși (cu 24 h mai devreme față de control) și, respectiv, cu cheltuieli reduse.

4. Valorificarea rezultatelor obținute prin transferul tehnologiei avansate de cultivare a micromicetei în studiu în prezența nanoparticulelor de TiO₂ (100 nm), în condiții de stație pilot, a demonstrat depășirea controlului cu 43,7% în a 5-ea zi de cultivare, fapt ce oferă oportunitatea obținerii preparatelor enzimactice cu activitate amilolitică sporită, cu reducerea ciclului tehnologic de cultivare a producătorului cu 24h.

5. Ajustarea regimului de cultivare a micromicetei *A niger* CNMN FD 06 prin reducerea vitezei de agitare de la 180 rpm la 100 rpm utilizarea efectului stimulator a compușilor coordinativi ai Ba și Sr cu ligand polidentat și nanooxizilor de Cu și Ti, asigură intensificarea procesului de biosinteză a amidazelor și permite reducerea ciclului tehnologic cu 24 - 48 h.

6. În baza datelor obținute s-au elaborat procedeele de sinteză orientată a amidazelor, care se recomandă pentru obținerea preparatelor amidolitice autohtone cu însușiri avansate la cultivarea tulpinii de micromicete *A. niger* CNMN FD 06:

- cu aplicarea undelor milimetrice de intensitate mică, în regim continuu și periodic, care influențează activitatea biosintetică a tulpinii de fungi *A. niger* CNMN FD 06 în condiții standard (pH 4,7) înregistrând valoarea maximală de 182,52 U/mL (durata de iradiere de 60 min) și 188,33 U/mL (durata de iradiere de 75 min) și asigurând sporirea activității amidolitice cu 28,69%-32,78% corespunzător.

- cu aplicarea compusului coordinativ $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2]\text{BF}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, în volum de 1ml, se asigură sporirea activității de biosinteză a producătorului cu 133,85 - 140,31%;

- cu utilizarea compușilor coordinativi ai bariului și stronțului cu ligand polidentat, $[\text{Ba}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{SCN})_4]$ și $[\text{Sr}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{SCN})_4]$ sau a nanooxizilor de Cu și Ti, care oferă posibilitatea obținerii preparatului enzimatic amidolitic cu activitate înaltă, cu 24 - 48 h mai devreme.

Problema științifică soluționată în acest capitol a constat în argumentarea perspectivelor de utilizare a compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție și a nanoparticulelor în calitate de amelioratori ai sintezei orientate a amidazelor exocelulare, cât și a radiației electromagnetice în diapazon milimetric ca strategii de sporire și reglare a biosintezei microbiene. Compușii coordinativi manifestă efect diferențiat de influență (stimulare și inhibare), fiind o dovadă a perspectivei utilizării acestora pentru obținerea preparatelor enzimatice microbiene cu compoziție programată.

5. PROCEDEE TEHNOLOGICE INOVATIVE DE OBTINERE A PREPARATELOR ENZIMATICE AMILOLITICE LA CULTIVAREA AVANSATĂ A TULPINII DE MICROMICETE *A. NIGER* CNMN FD 06

Marea majoritate a produselor și proceselor din industriile moderne sunt considerate ca fiind neprietenoase mediului. La toate etapele ciclului de viață ale unui produs sau proces se atestă impact negativ asupra mediului prin utilizarea resurselor limitate sau prin generarea de deșeuri. Astfel, în contextul preocupărilor globale de mediu, accentul se pune pe industriile sustenabile [13, 23, 31, 37, 40, 46, 49, 51, 56, 68, 75, 79, 85, 116, 128, 156, 201]. Orice schimbare care reduce consumul de materie primă sau energie, utilizarea în calitate de materie primă a deșeurilor și valorificarea acestora este considerată mai ecologică și mai de perspectivă.

Tehnologia enzimatică oferă alternative curate sau, cel puțin mai puțin poluante, la practicile și procesele convenționale. Utilizarea enzimelor contribuie la procese de sinteză mai sigură cu eliminarea tratamentelor chimice în procesele de producție.

În scopul valorificării complexului amilolitic sintetizat de tulpina fungică *A. niger* CNMN 06 au fost studiați parametrii și condițiile optime de recuperare a enzimelor amilolitice.

5.1. Selectarea condițiilor de separare a complexului enzimatic amilolitic din lichidul cultural al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06

Cel mai utilizat procedeu de recuperare a enzimelor din lichidul cultural este precipitarea fracționată prin adăugarea lentă a solventului rece la o agitare energetică. În acest mod rezultă un produs mult mai curat, cu mai puține substanțe insolubile, mai puține polizaharide și pigmenți, manifestând activități specifice mai superioare. O bună separare a enzimelor se asigură la precipitarea cu utilizarea diferitor solvenților organici și substanțelor stabilizatoare cu concentrații adaptate. Conform datelor din literatură [14, 41, 49, 64, 68, 77, 85] pentru sedimentarea complexelor enzimatică sunt folosiți un șir de solvenți sau amestecul acestora: alcool etilic, alcool izopropilic, acetona etc.

Activitatea enzimelor și randamentul lor este puternic influențat de valoarea pH-ului mediului de reacție, temperatură, durata contactului cu solventul [102]. Reeșind din cele expuse, regimurile de precipitare și separare a enzimelor din soluții se stabilesc individual, pentru fiecare caz concret, în funcție de particularitățile producătorului și a complexului enzimatic sintetizat.

În cercetări, în calitate de solvent (S) a fost utilizat alcoolul etilic de 96⁰ rectificat, cel mai frecvent folosit în industrii adecvate. Pentru stabilirea regimurilor optime de recuperare a

complexului amilolitic din lichidul cultural al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 s-au studiat următorii parametri ai procesului de sedimentare:

- temperatura solventului și lichidului cultural - +5⁰C, +10⁰C, +25⁰C;
- raportul lichid cultural (LC) : solvent (S) - 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6;
- durata contactului lichidului cultural cu solventul: 2 și 24 de ore;
- diapazonul de pH 2,0-8,0, pentru stabilirea influenței acestuia asupra mediului de sedimentare;
- efectul exercitat de ionii de Ca²⁺ și Mg²⁺ asupra procesului de sedimentare s-a studiat prin adăugarea acestora (sub formă de cloruri) în concentrații de 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; 0,25 și 0,30% la amestecul LC: alcool etilic (AE).

Randamentul precipitatului proteic (l/g) din lichidul cultural al micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 în dependență de raportul LC : S a fost calculat în unități enzimatică (U) la un litru de lichid cultural.

Rezultatele obținute la studierea influenței raportului LC : AE sunt prezentate în tabelul 5.1. și este de remarcat că modificarea raportului LC : AE de la 1:1 până la 1:6 conduce la creșterea cantității de precipitat, randamentul maximal fiind înregistrat la raportul 1:5 al LC: AE, constituind 2982 mg/L la durata timpului de precipitare de 2 ore și 3699 mg/L la durata timpului de precipitare 24 ore. Randamentul precipitatului la durata contactului LC:S de 24 ore este în toate variantele mai superior comparativ cu durata contactului de 2 ore constituind 3622mg/L, 3699 mg/L, 3602 mg/L corespunzător pentru variantele de concentrație a precipitatului 1:4; 1:5; 1:6 la durata de precipitare de 24 ore în comparație cu 2891mg/L, 2982mg/L și 2918mg/L la aceleași concentrații a precipitatului la durata de precipitare de 2 ore.

Tabelul 5.1. Randamentul precipitatului proteic (mg/L) din lichidul cultural al micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 în dependență de raportul LC:S.

Durata de contact și raportul LC:S	Randamentul precipitatului proteic (mg/L)					
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
2 ore	2000± 0,03	2021± 0.01	2225± 0,02	2891± 0,01	2982± 0,01	2918± 0,02
24 ore	2010± 0,02	2208± 0.01	2579± 0,03	3622± 0,02	3699± 0,01	3602± 0,03

Rezultatele indică că 2 ore de contact sunt insuficiente pentru precipitarea completă a enzimelor proteice.

5.2. Cercetări privind particularitățile de acid-stabilitate a amilazelor sintetizate de producător și de implementare a preparatului amilazic ca ameliorator în panificație

Datele din literatură [75, 85, 215] indică asupra faptului că tulpinile de mucegaiuri sintetizează două tipuri de amilaze, convențional divizate în acid-stabile și acid-labile. Toți producătorii cunoscuți de α -amilaze - reprezentanți ai genului *Rhizopus* și aspergillii galbeni - verzui produc α -amilaze care manifestă activitate la valori de acid-slabe (pH 4,5-5,6), numai reprezentanții așa numiților aspergili negri sintetizează α -amilază acid-stabilă. Diferența de bază în însușirile acestor amilaze constă în faptul, că α -amilazele acid-labile, la valoarea de pH 2,5 a mediului, pe parcurs a 30 de minute total și ireversibil pierd capacitatea de catalizator, pe când, în aceleași condiții α -amilazele acid-stabile păstrează 90% și mai mult din activitatea inițială [75, 85]. În plan practic, la realizarea proceselor durabile de lichefiere a materialelor bogate în amidon, de importanță sunt amilazele acid-stabile ale ciupercilor microscopice și termostabile produse de bacterii, astfel, cum permit realizarea procesului la valori joase de pH (2,5-3,0) și temperaturi sporite (65-70°C), fapt care reduce semnificativ pericolul contaminării mediului de reacție cu microfloră de altă natură. De perspectivă este utilizarea α -amilazei acid-stabile în enzimoterapie în condiții de aciditate sporită a sucului gastric [75].

Sub acest aspect au fost realizate cercetări în vederea determinării influenței mediului de cultură și gradului de stabilitate acidă a complexelor amilazice, sintetizate de tulpina selectată ca producător perspectiv de amilaze exocelulare, ca un criteriu de caracterizare a însușirilor tehnologice ale preparatelor enzimice. Astfel, la amilazele din lichidul cultural al tulpinii în studiu separate prin sedimentare cu alcool etilic (C₂H₅OH, 96⁰) în raport de 1:5, a fost testată activitatea amilolitică la valoarea pH 4,7 și pH 2,5 în conformitate cu metodele de testare a stabilității acide a complexelor amilolitice [75]. Timpul de expunere a soluțiilor de reacție la valoarea de pH 2,5 a constituit 24 de ore și respective 168 de ore. Rezultatele obținute sunt prezentate mai jos (Tab. 5.2).

Tabelul 5.2. Activitatea amilolitică a amilazelor produse de micromiceta în studiu în condiții de aciditate sporită

Mediul de cultivare	Activitate amilolitică, U/g		
	pH 4,7 (martor, 24 ore)	pH 2,5 (24 ore)	pH 2,5 (168 ore)
8	311,70 ± 0,02	322,58 ± 0,01	300,79 ± 0,01

S-a observat că, pentru amilazele sintetizate de tulpina în studiu, scăderea valorii pH până la 2,5 nu conduce la inhibarea activității, dar se remarcă sporirea activității de la 311,70 U/g la

valoarea pH 4,7 până la 322,58 U/g (24 ore), marcând o scădere ușoară pe parcursul următoarelor 168 de ore (300,79 U/g) la valoarea pH 2,5. Faptul că diminuarea valorii pH-ului nu conduce la scăderea activității amilazelor produse de tulpina în studiu, permite referirea acesteia la *aspergillii negri* - producători de amilaze acid-stabile.

Pentru determinarea randamentului unităților enzimaticice la 1L de lichid cultural, în dependență de concentrația solventului, durata de precipitare, pH-ul lichidului cultural și temperaturile de realizare a procesului de separare, calculele suplimentare, cu luarea în considerație a randamentului masei de preparat enzimatic și activității amilolitice, arată că, concentrația optimală a solventului, care asigură cel mai înalt randament de unități enzimaticice la 1 L de LC, prezintă raportul LC:S 1:4, 1:5 (Tab. 5.3).

Tabelul 5.3. Influența concentrației solventului și durata de contact asupra activității amilazelor produse de micromiceta *A.niger* CNMN FD 06 (U/g)

Valoarea pH	Durata precipitării (ore)	Activitatea amilolitică, U/g			
		Concentrația solventului			
		1:2	1:3	1:4	1:5
4,7	2	153,8± 0,02	277,2± 0,01	263,1± 0,04	269,7± 0,02
	24	161,8± 0,01	213,6± 0,02	212,8± 0,01	225,9± 0,01
2,5	2	123,96± 0,03	132,75± 0,03	375,80± 0,02	271,55± 0,03
	24	119,39± 0,02	146,41± 0,03	306,26± 0,01	298,30± 0,01

Activitatea amilazelor acid-labile (pH 4,7) la durata contactului de 2 ore, raportul LC: S de 1:3, atinge valoarea de 277,2 U/g, menținerea contactului pentru o durată extinsă de 24 de ore micșorează activitatea enzimatică cu 63,6 U/g. Pentru amilazele acid-stabile (pH 2,5) constatăm activitate amilazică sporită (375,80 U/g) la aplicarea raportului LC:S de 1:4 și durata de interacțiune a lichidului de cultură cu solventul de 2 ore, menținerea contactului pentru 24 de ore, ca și în cazul amilazelor acid-labile, duce la scăderea activității amilazelor cu 69,54 U/g.

Determinarea activității enzimaticice la două valori de pH: 4,7 și 2,5 în precipitatele obținute, la aplicarea diferitor concentrații ale solventului și diferite durate de precipitare a permis următoarele constatări:

1. La durata de precipitare de 2 ore activitatea amilolitică maximală se manifestă la concentrația alcoolului etilic în raport de 1:3 pentru amilazele acid-labile (pH 4,7).

2. Mărirea concentrației alcoolului etilic (variante LC:S 1:4) influențează considerabil activitatea enzimatică pentru amilazele acid-stabile (pH 2,5) acesta înregistrând valorile maxime de 375,80 U/g la durata de contact 2 ore, pe când amilazele acid-labile sunt la nivelul valorilor înregistrate la utilizarea raportului LC:AE de 1:3, de aceea putem susține că, raportul optim de separare a amilazelor din lichidul cultural este LC: AE 1:4.
3. Pentru durata de precipitare de 24 de ore activitatea maximală se manifestă în variantele cu concentrația precipitantului 1:4 pentru amilazele acid-stabile și, respectiv, 1:5 pentru amilazele acid-labile, constituind corespunzător **306,26 U/g** și **225,9 U/g**.

Astfel cum diferența în activitatea amilolitică a preparatelor enzimactice obținute la raportul LC:S 1:3 și 1:4 nu este semnificativă putem recomanda raportul LC:S 1:4 ca optimal, pentru obținerea activității superioare a amilazelor.

În tabelul 5.4. sunt prezentate datele privind influența valorii pH-ului, lichidului cultural asupra randamentului și activității amilazelor. S-au înregistrat 2 maxime ale activității amilolitice: la valorile de pH 4,0, pH 6,0 și pH 7,0.

Tabelul 5.4. Randamentul (g/L) și activitatea amilazelor (U/g) micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 în funcție de pH-ul lichidului de cultură

Valorile de pH a lichidului de cultură	Activitatea amilolitică, U/g		Randamentul, g/L
	pH 4,7	pH 2,5	
2,0	93,00± 0,03	2,68± 0,01	1,34
2,5	376,38± 0,01	469,40± 0,04	1,15
3,0	223,84± 0,03	87,39± 0,03	1,14
4,0	379,40± 0,02	300,00± 0,02	1,55
5,0	28,22± 0,01	244,29± 0,01	1,04
6,0	557,99± 0,01	839,44± 0,03	2,80
7,0	485,35± 0,02	810,89± 0,02	2,89

Randamentul amilazelor - la pH 4,0, pH 6,0 și pH 7,0, constituind respectiv 1,55 g/L și 2,80 - 2,89 g/L. Cea de a 2-ua valoare maximă a randamentului amilazelor este aproximativ de 2 ori mai superioară.

După activitatea enzimatică au fost înregistrate trei maxime, la pH 4,0, pH 6,0 și pH 7,0, indiferent de valorile pH-ului (2,5 sau 4,7). Cea mai înaltă activitate enzimatică s-a înregistrat la pH 6,0 constituind 557,99 U/g (hidroliză realizată la pH 4,7) și 839,44 U/g, (hidroliza realizată la pH 2,5). Rezultatele obținute indică, repetat că, la realizarea hidrolizei în condiții extremal acide (pH 2,5) activitatea amilazelor este semnificativ mai superioară decât în condiții ordinare de pH

(4,7), fapt care confirmă că amilazele sintetizate de tulpina *A. niger* CNMN FD 06 sunt acid-stabile.

Randamentul și activitatea amilazelor poate fi influențat de temperatura solventului și a lichidului cultural la momentul interacțiunii acestora. În tabelul 5.5 sunt prezentate datele privind randamentul și activitatea amilazelor în funcție de factorul de temperatură a amestecului de reacție.

Sedimentarea complexului amilazic s-a realizat din amestecul de LC cu etanol, care a fost răcit până la temperaturile de +5⁰C, +10⁰C și la temperatura de cameră +25⁰C.

Cel mai înalt randament de enzime s-a urmărit la temperaturi joase: 4,0735 g/L (5⁰C). Dacă testăm acest randament ca 100%, atunci randamentul enzimelor la 10⁰C constituie 79%, iar la 25⁰C - 65%. Activitatea amilolitică a șarjelor de precipitat obținute la diferite valori de temperatură (5⁰C, 10⁰C, 25⁰C) determinată în condiții ordinare de pH (4,7) puțin diferă de la preparat la preparat, constituind 257,91 U/g, 259,14 U/g și 260,04 U/g.

Însușirile acid-stabile ale amilazelor obținute, însă, sunt influențate de regimul de temperatură a procesului de precipitare. Activitatea maximală a amilazelor, dozată la pH 2,5 se manifestă la precipitatul obținut la 10⁰C și constituie 286,90 U/g.

Tabelul 5.5. Randamentul și activitatea amilazelor din lichidul de cultură al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 în funcție de temperatură (raportul LC:S 1:4)

Temperatura, ⁰ C		5 ⁰ C	10 ⁰ C	25 ⁰ C
Randamentul g/L		4073,50	3231,50	2649,00
Randamentul global al unităților enzimatic, la 1 litru de LC	pH 4,7	233,70	190,60	159,00
	pH 2,5	428,40	603,70	470,30
Activitatea amilolitică, U/g	pH 4,7	257,91	259,14	260,04
	pH 2,5	204,54	286,90	278,59

Randamentul unităților enzimatic din 1L de LC este maxim la temperatura de 5⁰C (233,70 U/L la petrecerea hidrolizei la valoarea pH 4,7 și la temperatura de 10⁰C în condiții de pH 2,5 (603,70 U/L).

Cercetările efectuate au permis selectarea regimului de separare a amilazelor din LC al micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 la raportul LC: AE 1:4, pH LC la precipitare 6,0, durata timpului de precipitare - 2 ore, temperatura precipitării 10⁰C, pentru amilazele utilizate în procese industriale realizate la valoarea pH-ului 2,5.

Randamentul global al unităților enzimactice din 1 L de lichid cultural al micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 în funcție de durata de precipitare

Pentru verificarea timpului de precipitare (contactul LC cu AE) în regimurile selectate au fost obținute 2 preparate amilolitice, realizând două variante a timpului de contact al LC cu AE: 2 ore și - 24 de ore. Rezultatele sunt prezentate în Fig.5.1.

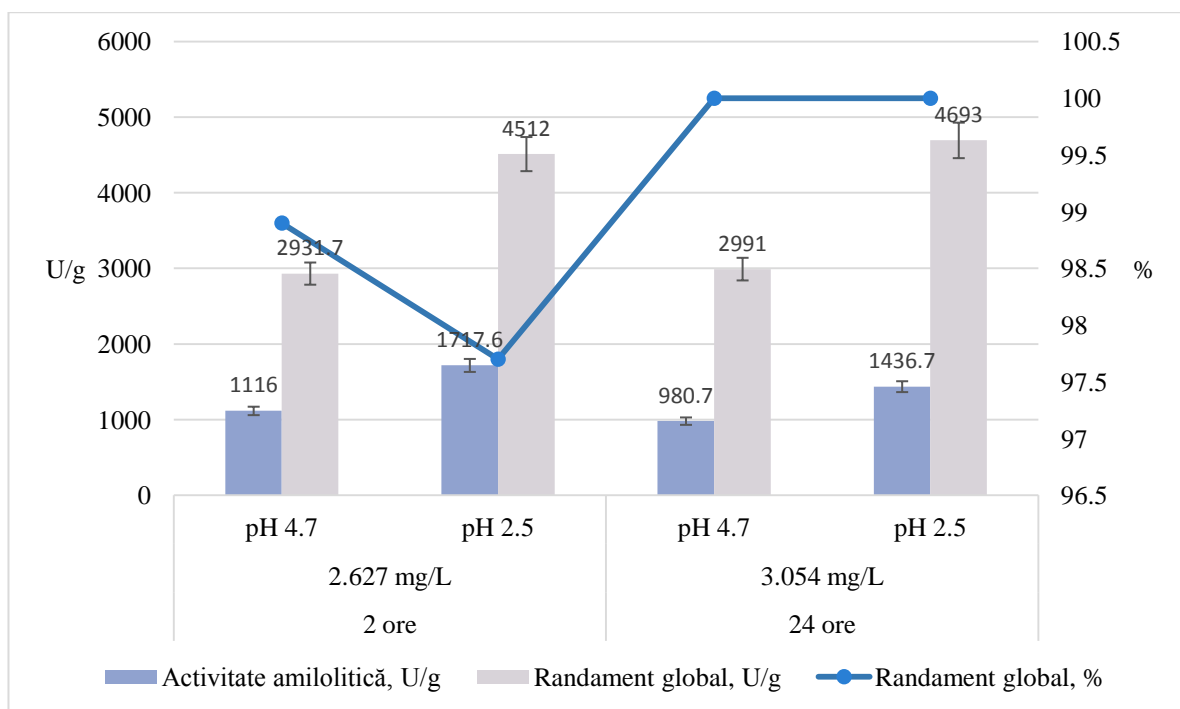


Fig. 5.1. Randamentul global a unităților enzimactice din 1L de lichid cultural, al micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 în coraport cu durata de precipitare

Diferența randamentului global al unităților enzimactice la 1 L de LC în raport procentual constituie 1-2%. Pierderea în randamentul de masă a precipitatului la durata de contact al LC cu AE 2 ore față de 24 de ore se acoperea prin activitatea mai sporită a preparatului în varianta timpului de contact 2 ore.

După gradul de puritate enzimele obținute prin sedimentare din LC cu alcool se plasează la gradul de puritate G10x. Preparatele enzimactice cu așa grad de puritate sunt permise pentru utilizarea în diferite ramuri ale industriei alimentare: fabricarea pâinii și produselor de patiserie, în cofetărie, în obținerea amidonului, melaselor, siropurilor, fabricarea sucurilor din fructe și legume, fabricarea berii etc.

Astfel, în rezultatul cercetărilor efectuate a fost stabilită influența parametrilor fizico-chimici: pH, $t^{\circ}\text{C}$, durata de interacțiune a LC cu AE, raportul LC:AE (concentrația solventului), asupra randamentului și activității enzimactice la separarea amilazelor din lichidul cultural al micromicetei *A. niger* CNMN FD 06.

Astfel prin cumularea tuturor cercetărilor realizate asupra tulpinii în studiu s-a elaborat „Schema tehnologică de obținere a preparatului enzimatic amilolitic sintetizat de tulpina *A.niger* CNMN FD 06”, figura 5.2.

Preparatul enzimatic extras prezintă un praf de culoare albă-gri, solubil în apă (la t°C 20-25°C) și în soluții tampon de acetat și glicină. Umiditatea preparatului nu depășește 7-13%.

Preparatul conține două tipuri de amilaze: amilaze care hidrolizează amidonul în condiții moderate de aciditate la pH - 4,7, posedând în aceste condiții o activitate de 1384,0 U/g (substrat - amidon solubil) și amilaze acid-stabile, care realizează hidroliza amidonului în condiții extreme de activitate la pH - 2,5 și posedă activitatea de 1399,0 U/g (substrat amidon solubil).

Preparatul enzimatic amilolitic, obținut din tulpina de *A. niger* CNMN FD 06 se păstrează în ambalaj ermetic, în încăperi uscate și reci. Durata păstrării fără a pierde esențiale de activitate - 9 luni.

Studierea influenței preparatelor enzimatice autohtone ca amelioratori în procesul de panificație deschide perspectiva utilizării acestora și, eventual, micșorarea prețului de cost al produselor finite. Esențiale pentru activitatea organismelor vii, enzimele folosite în panificație sunt componente biologice de natură vegetală sau produse de fermentație ale mușcăiurilor și bacteriilor. Enzimele amilazice ajută la îmbunătățirea proprietăților fizice (prelucrabilitate) și biochimice (fermentative) ale aluatului, îmbunătățește comportamentul general al aluatului în timpul procesului tehnologic. Ele conduc la obținerea unor produse de calitate în ceea ce privește structura miezului, culoarea cojii, aspectul, volumul, prospețimea și aroma produselor de panificație.

Caracteristicile grâului de panificație variază în funcție de condițiile climatice, condițiile de recoltare și amestecul de soiuri din cadrul unui lot. De asemenea, calitatea făinii diferă. Acești factori de variație justifică folosirea amelioratorilor de panificație, care permit celor din domeniu să facă pâine de calitate, folosind echipamentele și materiile prime pe care le au la dispoziție. Enzimele amilazice constituie unul din principalii ingrediente utilizați în panificație ca amelioratori ai calității, datorită capacității lor de a hidroliza amidonul [121, 134, 140, 184].

Valorificarea preparatelor enzimatice amilolitice, extrase din lichidul cultural al tulpinii de *A.niger* CNMN FD 06 și stabilirea efectului acestora asupra calității pâinii s-a realizat în cadrul Laboratorului Central de Control al Asociațiilor Fabricilor de Pâine al S.A. „Franzeluța”.

SCHEMA TEHNOLOGICĂ

de obținere a preparatului enzimatic cu acțiune amilolitică la cultivarea submersă a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 în retorteretorte, în condiții de agitare continuă.

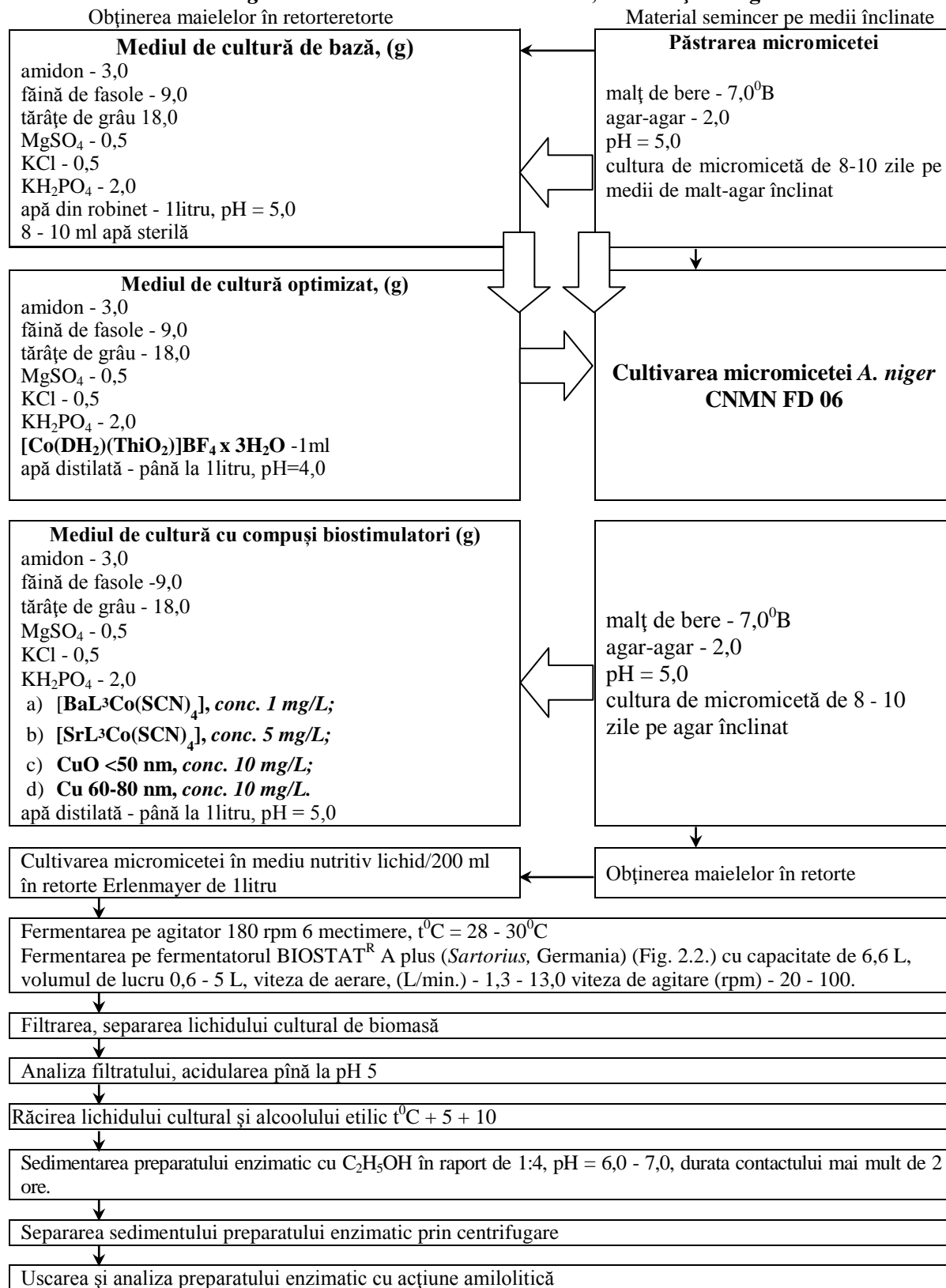


Fig. 5.2. Schema tehnologică de sinteză orientată și obținere a preparatului enzimatic cu acțiune amilolitică la cultivarea submersă a micromicetei *A. niger* CNMN FD 06

De remarcat că, însușirile de acid stabilitate considerabil sporesc valoarea practică a preparatului, creând condiții de realizare a proceselor tehnologice cu risc redus de contaminare microbiană. Trierile s-au făcut prin frământări paralele ale aluatului cu adăugarea preparatului amilolitic cu conținut cantitativ de 0,003%, 0,0035% și 0,0040%. Aluatul de control nu avea aditivi. Preparatul enzimatic amilolitic a fost adăugat la formula de coacere la etapa de amestecare a materiilor prime. Pâinea a fost făcută cu făină comercială de calitate superioară. Analiza prospețimii a fost efectuată cu penetrometru prin măsurarea rezistenței opuse, la o forță aplicată, timp de 10 secunde. Acțiunea preparatului enzimatic amilolitic s-a estimat la fiecare etapă a procesului tehnologic. Durata procesului de fermentare în cele 3 variante experimentale s-a menținut la valori cuprinse între 10 - 15 min. Aluatul devine mai tolerant și se remarcă ameliorarea plasticității. La etapa de dospire are loc creșterea volumului în variantele experimentale, iar la coacere se îmbunătățește culoarea, structura miezului și aroma produsului finit. Rezultatele experimentale sunt prezentate în Tab. 5.6.

Tabelul 5.6. Influența preparatului amilazic, sintetizat de tulpina fungică *A. niger* CNMN FD 06 asupra indicilor tehnologici în procesul fermentativ al pâinii

Indicii tehnologici	Cu preparat amilazic, în cantitate de 0,003%	Fără preparat amilazic (control)
Umiditatea făinii, %	14,8	14,8
Indicele de incidență, sec.	416	416
Stabilitate la modelare	0,62	0,47
Porozitate, %	97	83

De menționat că, durata procesului de fermentare a aluatului, în mostrele cu preparat amilazic s-a redus cel mai bun rezultat fiind înregistrat la adăugarea a 0,003% (34 mg/kg). Pâinea din aluatul cu preparat este mai înaltă (h=95 cm), decât în probele control (h=76,5 cm). A fost influențată stabilitatea la modelarea pâinii cu adaos de preparat, depășind controlul cu 0,15 unități.

Preparatul enzimatic cu acțiune amilazică îmbunătățește calitatea pâinii, reduce durata fermentării cu 10 - 15 minute, sporește procesul de creștere a aluatului, pâinea este mai stabilă ca formă la modelare.

5.3. Concluzii la capitolul 5

1. Separarea complexului amilolitic din lichidul cultural al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 prin sedimentare cu 4 volume de alcool (96%), durata sedimentării o oră, temperatura

amestecului de reacție 5⁰C și pH-ul natural, în prezența ionilor de Ca²⁺ în concentrație de 0,2%, asigură recuperarea maximă a amilazelor;

2. Cercetările în vederea determinării gradului de stabilitate acidă a complexelor amilazice, sintetizate de tulpina *A. niger* CNMN FD 06 au demonstrat că activitatea amilolitică la pH 2,5 este sportită față de control, constituind 322,58 U/mL și se menține pe parcursul următoarelor 7 zile (168 de ore) de expunere în condiții extremal acide, micșorându-se doar cu 21,79 U/g, astfel poziționând amilazele sintetizate ca perspective din punct de vedere a acid-stabilității;

3. Preparatul enzimatic cu acțiune amilazică, testat în Laboratorul Central de Control al Asociațiilor Fabricilor de Pâine SA „Franzeluța”, îmbunătățește calitatea pâinii, reduce durata fermentării cu 10 - 15 minute, sporește procesul de creștere a aluatului, pâinea este mai înaltă cu 19,5 mm și mai stabilă ca formă la modelare;

4. Tehnologia de obținere prin sinteză orientată a complexului amilolitic cu aplicarea stimulatoarelor chimici (compuși complecși și nanooxizi), asigură randamente crescute de preparate amilolitice. Preparatele obținute conțin două tipuri de amilaze: amilaze care hidrolizează amidonul solubil în condiții moderate de aciditate (pH 4,7), posedând în aceste condiții o activitate de 1384,0 U/g și amilaze acid-stabile, care realizează hidroliza amidonului în condiții de aciditate sporită (pH 2,5) și posedă o activitate de 1399,0 U/g.

Problema științifică soluționată la acest capitol a constat în stabilirea parametrilor optimi de separare a complexului enzimatic amilolitic din lichidul cultural al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 și valorificarea preparatelor enzimactice amilolitice obținute pentru utilizarea acestora în tehnologiile de panificație.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Rezultatele obținute în raport cu scopul și obiectivele formulate în cadrul tezei de doctorat „Sinteza orientată a amidazelor exocelulare la tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 06”, au condus la formularea următoarelor concluzii generale:

1. Screeningul micromicetelor din colecția Laboratorului Enzimologie, în vederea evaluării capacității de sinteză a enzimelor amilolitice, a relevat tulpina *A. niger* CNMN FD 06 potențial producător de enzime amilolitice (*Brevet MD 2836. BOPI. Nr.8. 2005*) cu activitate și stabilitate superioară.
2. Studiul variabilității naturale a tulpinii *A. niger* CNMN FD 06, a permis identificarea și izolarea variantei morfologice cu cel mai înalt potențial de sinteză enzimatică, manifestat pentru ambele tipuri de amidaze acid-labile (197,04 U/mL) și acid-stabile (243,53 U/mL), înregistrând o creștere procentuală față de martor cu 81,28% pentru valoarea pH-ului 4,7 și cu 104,88 % la valoarea de pH 2,5.
3. Activitatea enzimelor amilolitice, atât constitutive cât și de inducere, produse de micromiceta *A. niger* CNMN FD 06 este maximal sporită (de 1,30-3,19 ori față de martor) prin adăugarea în mediul de cultivare a amidonului ca inductor și a făinii de fasole și tărâței de grâu, utilizarea cărora poate avea impact pozitiv prin valorificarea deșeurilor industriilor alimentare, precum și prin asigurarea condițiilor optime de cultivare (28-30°C, pH inițial 5,0, durata de cultivare – 6 zile).
4. În funcție de regimul emiterii și durata tratării, iradierea cu UMM atermice stimulează cu 13,0-65,0% biosinteza amidazelor la tulpina *A. niger* CNMN FD 06. Optimal pentru sporirea sintezei amidazelor acid-labile (cu 63,5 - 65,05%) și acid-stabile (cu 48,9 - 43,2%) a fost iradierea cu UMM în regim continuu, frecvența de 16Hz, timp de 20-30 minute.
5. Dintre 32 de compuși coordinațivi testați, în premieră, a fost stabilită eficiența aplicării compușilor coordinațivi ai Co (III) cu liganzi oxalici și anioni fluorurați, cu compoziție diferită (BF₄, SiF₆, F[SiF₆]) în sfera externă, ca stimulatori, reglatori și stabilizatori ai activității amilolitice la tulpina *A. niger* CNMN FD 06.
6. Utilizarea heterometalocomplecșilor „s” cu liganzi polidentati [BaL³][Co(NCS)₄], și [SrL³][Co(NCS)₄], unde L³ – prezintă esterul dimetilic al acidului 2,6-piridindincarboxilic, în concentrații mici (5,0 mg/L) manifestă influență cert stimulatorie și de intensificare a biosintezei amidazelor exocelulare la tulpina în studiu, depășind maxima martorului cu 91,6% (ziua a 5-a) și 84,4% (ziua a 6-a) și asigurând reducerea ciclului tehnologic cu 24 de ore.

7. Utilizarea NP dioxidului de titan TiO_2 de diferite dimensiuni (TiO_2 21 nm; $\text{TiO}_2 < 100$ nm, $\text{TiSiO}_4 < 50$ nm) și NP de Cu ($\text{CuO} < 50$ nm și Cu 60-80 nm), în concentrații de 5-10 mg/L, sporește activitatea amilazelor cu 15,4% și reduce durata de cultivare cu 24 de ore, fapt care permite considerarea nanoparticulele testate ca potențiali biostimulatori ai biosintezei amilazelor exocelulare la micromiceta în studiu.
8. Au fost stabiliți parametrii tehnologici principali (concentrația O_2 dizolvat, viteza de agitare, durata ciclului biologic) la cultivarea avansată cu aplicarea compușilor coordinativi ai Ba L^3 și Sr L^3 și nanooxizilor de Cu și Ti, în condiții de stație pilot, care permit intensificarea procesului de biosinteză a amilazelor, reducerea ciclului tehnologic cu 24-48 de ore și sporirea semnificativă al activității amilolitice, comparativ cu activitatea martorului.
9. Complexul enzimatic amilolitic, obținut prin aplicarea parametrilor regimurilor tehnologice optime (raportul LC:AE – 1:4; durata de sedimentare - 2 ore; pH-ul lichidului cultural 5,0; $t^{\circ}\text{C}$ precipitării 5°C .) are un grad de puritate 10x, activitate amilolitică de 1116,0 U/mL la valorile de pH 4,7 și de 1717,6 U/mL la pH 2,5, demonstrând însușiri acid-stabile înalte, prezintă un avantaj în utilizarea acestuia în biotehnologiile moderne.

Aportul personal: Lucrarea a fost realizată în cadrul Laboratorului „Enzimologie” (actualmente „Biotehnologia fungilor”) al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie în conformitate cu direcțiile și planurile de cercetare și pregătire a cadrelor de profil ale laboratorului sub conducerea dr. șt. biologice, conferențiar cercetător Alexandra Ciloci (Deseatnic). Rezultatele experimentale aparțin autoarei.

Originalitatea științifică a cercetărilor:

A fost introdusă în cultură, ca obiect cu semnificație biotehnologică, o tulpină nouă de fungi miceliali *Aspergillus niger* CNMN FD 06, distinctă prin capacitate înaltă de sinteză a enzimelor amilolitice extracelulare. Au fost stabilite particularitățile fiziologo-biochimice, morfologo-culturale, exigențele nutritive și condițiile optime de biosinteză a amilazelor extracelulare de către tulpina producător.

În premieră a fost evaluat efectul compușilor coordinativi ai metalelor de tipul „s” cu liganzi polidentati, a unor nanocompozite de diferită origine și a radiațiilor electromagnetice în diapazon milimetric asupra metabolismului la microorganisme, stabilită perspectiva aplicării acestora în sinteza microbiană orientată.

A fost relevat efectul biostimulator și stabilizator semnificativ al compușilor coordinativi ai cobaltului(III) cu anioni fluorurați din clasa dioximelor cu formula generală $[\text{Co}(\text{DH})_2\text{L}_2]\text{X}\cdot n\text{H}_2\text{O}$ (unde L= Thio, Anilină, Py; X= F⁻, [BF₄]₂, [SiF₆]₂ asupra biosintezei amilazelor exocelulare la tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

S-a stabilit că, compuși heterometalici ai metalelor de tip „s” Ba și Sr cu Co și ligand polidentat în bază de 2,6 dicarbonilpiridină diclorură, adăugați în mediul de cultivare a micromicetei în studiu, modifică termenul de manifestare a maximei de biosinteză a amilazelor cu reducerea ciclului de dezvoltare a micromicetei.

În baza rezultatelor experimentale au fost elaborate rețete noi de medii nutritive, cu conținut de compuși coordinativi, ce asigură sporirea considerabilă a activității amilazelor exocelulare, precum și reducerea duratei de cultivare (*Brevet de invenție* MD 2836).

Evaluarea efectului unor nanocompozite ale metalelor Ti, Fe, Zn și Cu, cu caracteristici diferite, la cultivarea tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 06 în cultură submersă a demonstrat dependența efectului de originea metalului, structură și dimensiunile nanoparticulelor, cât și de concentrația aplicată. Rezultatele obținute au fost aplicate în elaborarea procedeeleor de cultivare submersă avansată a producătorului în prezența nanodioxidului de titan (nano- TiO₂), titan siliciu oxid (nano- TiSiO₄), nano- CuO și nano- Cu 99% metalic marcate prin sporirea activității amilolitice a micromicetei și reducerea ciclului de cultivare.

A fost stabilită influența biostimulatoare a undelor milimetrice de intensitate joasă asupra procesului de sinteză a enzimelor amilolitice la tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 06. S-a demonstrat dependența efectului exercitat de undele milimetrice în funcție de durata de expoziție la iradiere, lungimea de undă (λ) și regimul de emiterie (continuu, periodic) a undelor milimetrice de intensitate joasă (UMM), tipul de material semincer (vegetal, sporifer) iradiat.

Rezultate științifice principale: Industriei microbiologice se propune o tulpină nouă de fungi - *Aspergillus niger* CNMN FD 06 cu potențial înalt de sinteză a enzimelor amilolitice exocelulare. Se recomandă o variantă nouă de mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a producătorului ce conține stimulator de origine chimică și asigură eficiență economică esențială prin majorarea randamentului de amilaze și reducerea duratei de cultivare (*Brevet de invenție* MD Nr. 2836. BOPI. Nr.8. 2005). A fost stabilită influența compușilor coordinativi în calitate de stimulatori al sintezei microbiene la tulpina fungică în studiu (*Brevet de invenție* MD Nr. 2833. BOPI. Nr.8. 2005). A fost demonstrată influența nanocompozitelor în scopul sporirii biosintezei enzimelor (*Brevet de invenție* MD Nr. 4847 BOPI Nr.2.2023). A fost obținut un preparat

enzimatic amilolitic, cu activitate înaltă, necesar în diverse ramuri ale economiei naționale (*Act de experimentare, Anexa 5*).

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în *fundamentarea științifică* a utilizării tulpinii de funghi miceliali *Aspergillus niger* CNMN FD 06 ca *sursă nouă* de enzime amilolitice cu semnificație biotehnologică, prin optimizarea condițiilor de sinteză orientată a enzimelor cu ajutorul compușilor coordinați ai metalelor de tipul „s” și „d”, nanoparticulelor și iradierii electromagnetice în diapazon milimetric, *fapt ce a permis* elaborarea unor tehnologii avansate cu randamente crescute de obținere a preparatelor enzimactice amilolitice cu activitate și însușiri tehnologice înalte.

In aspect teoretic. Rezultatele obținute argumentează perspectiva utilizării compușilor coordinați, a nanoparticulelor și a radiației electromagnetice în diapazon milimetric ca strategie în soluționarea problemelor valorificării microorganismelor ca surse de substanțe bioactive și vor servi ca suport științific informațional în fundamentarea sintezei microbiene orientate a substanțelor bioactive.

Sub alt aspect, rezultatele cercetărilor de evaluare a efectului compușilor coordinați ai metalelor de tipul „s”, a unor nanoparticule ai metalelor Ti, Fe, Cu, Zn diferite după structură, dimensiuni și alte caracteristici, iradierii electromagnetice în diapazon milimetric ca factori de sporire a biosintezei amilazelor prin sinteză microbiană orientată la tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 06, prezintă contribuții importante în dezvoltarea interacțiunii acestor factori cu obiectul biologic și elucidarea mecanismelor de acțiune.

Investigarea micromicetelor sub aspectul relevării performanțelor biotehnologice, cu abordarea iradierii electromagnetice în diapazon milimetric (UMM) ca factor de influență, diversifică suportul științific informațional în fundamentarea sintezei orientate a substanțelor bioactive, creează premise de elaborare a unor tehnologii avansate, ecologic inteligente, iar potențialul câmpurilor electrice, deși apreciat ca enorm, este puțin explorat.

In aspect aplicativ. Industriei microbiologice se propune o tulpina nouă de micromicete - *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - producător de amilaze exocelulare (*Brevet de invenție MD Nr. 2836. BOPI. Nr.8. 2005*).

Se recomandă două variante de medii nutritive pentru cultivarea submersă a producătorului, ce conțin stimulatori de origine chimică și asigură eficiențe economice esențiale - majorarea randamentului de amilaze și reducerea ciclului tehnologic (*Brevet de invenție MD Nr.2833. BOPI. Nr.8. 2005*).

Se propun două procedee de sinteză orientată sporită a amilazelor la tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 06 la cultivare avansată cu aplicarea nanoparticulelor dioxidului de titan TiO₂ și a Cu metalic 99%.

În condiții de stație pilot au fost elaborate două tehnologii avansate cu randamente crescute de obținere a enzimelor amilolitice prin sinteză orientată la cultivarea submersă a tulpinii în studiu cu aplicarea în calitate de factori reglatori a compușilor coordinativi heterometalici (*Brevet MD Nr.4847 BOPI Nr.2.2023*) și a nanoparticulelor.

Au fost obținute preparate enzimactice amilolitice cu activitate și însușiri tehnologice înalte necesare în diverse ramuri ale economiei naționale (*Act de experimentare, Anexa 5*).

Aprobarea lucrării: Rezultatele cercetărilor au fost comunicate și apreciate la Expozițiile Specializate și Saloanele Internaționale de Invenții: Saloanele internaționale de invenții: „ECOINVENT” (Iași, România, 2003, Chișinău, 2005), „INFOINVENT” (Chișinău, 2004-2005, 2007, 2009), „INVENTICA” (Iași, 2003, 2006), „ECOINVENT” (Iași, 2007, 2010), „PROINVENT” (Cluj-Napoca, 2007, 2010), „EUROINVENT” (2009, 2010, 2013), Международный салон изобретений и новых технологий «НОВОЕ ВРЕМЯ» (2011), 5th EUROPEAN EXHIBITION OF CREATIVITY AND INIVATION (Iași, 2013), Salonul Internațional de INVENȚII INOVAȚII „Traian Vuia” (Timișoara, 2022); la a 3-ea Conferință Națională cu participare internațională consacrată 50 de ani ai AȘM. (Chișinău, 1996), Congresul al XXII-lea al Academiei Româno-Americane de Știință și Arte (ARA), (Tîrgoviște, România, 1997), Congresul al-7-lea (jubiliar) al Societății Științifice a Geneticienelor și Amelioratorilor din Republica Moldova (Chișinău, 1999), Conferința științifico-practică Tehnologiile avansate în pragul secolului 21 (Chișinău, 2000), Conferința a XXVIII-a Națională de Chimie (Călimănești-Căciulata, Vâlcea, România, 2004), Международная научная конференция ОНУ им. И.И. Мечникова (Одесса, 2005), Congresul al-8-lea al Societății Științifice a Geneticienelor și Amelioratorilor din Republica Moldova (Chișinău, 2005), Romanian International Conference on chemistry and chemical engineering XIV (2005), The IInd International Conference of the Chemical Society of the Republic of Moldova, „Achievements and Perspectives of Modern Chemistry” (Chișinău, 2007), Conferința științifică națională cu participare internațională consacrată celei de-a 50-ea aniversare de la fondarea Secției de Microbiologie (Chișinău, 2009), Al 33-lea congres al Academiei Român-Americane de Arte și Științe (Sibiu, România, 2009), XIth International congress of geneticists and breeders from the Republic of Moldova (Chișinău, 2010), Simpozionul Științific Internațional „Sectorul agroalimentar - realizări și perspective” (Chișinău, 2021), Conferința științifico-practică Internațională „Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă”, ediția a IX-a (Chișinău, 2022), Conferința „Știința în Nordul Republicii

Moldova: realizări, probleme, perspective” (Bălți, 2023) Юбилейная конференция по микологии и микробиологии (Москва, 2023).

Publicații: În baza materialelor tezei au fost publicate 29 de lucrări științifice (18 articole, 11 teze și rezumate ale comunicărilor științifice), inclusiv 5 fără coautori, au fost obținute 3 brevete de invenție, 5 medalii de aur, 3 medalii de argint și 4 medalii de bronz.

Implementarea rezultatelor științifice. Tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 06 a fost depozitată ca producător perspectiv de amilaze exocelulare cu semnificație biotehnologică în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (Adeverință de depozitare, *Anexa 1*), fiind utilizată ca obiect biologic în cercetările de evidențiere și argumentare a perspectivei de aplicare a compușilor coordinativi ai metalelor „s” și „d”, nanocompozitelor și iradierii electromagnetice în diapazon milimetric pentru sporirea capacității de sinteză a hidrolazelor la producătorii de origine fungică, inclusiv în cercetările de scalare, la nivel de stație pilot, a tehnologiilor de cultivare clasică și avansată cu aplicarea compușilor coordinativi ai metalelor „s” și „d”, nanocompozitelor și iradierii electromagnetice în diapazon milimetric. Preparatele amilolitice obținute în baza tulpinii au fost testate în Laboratorul Central de Control al Asociațiilor Fabricilor de Pâine al S.A. „Franzeluța” în procesul de coacere a pâinii (Act experimental, *Anexa 5*).

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Tulpina nouă de micromicete – *A. niger* CNMN FD 06 se recomandă industriei microbiologice în calitate de sursă de preparate amilolitice cu multiple domenii de aplicare (Brevet de invenție MD Nr. 2836. BOPI. Nr.8. 2005).
2. Pentru cultivarea tulpinii *A. niger* CNMN FD 06 se recomandă două variante de medii nutritive, ce conțin stimulatori de origine chimică și asigură eficiențe economice esențiale - majorarea randamentului de amilaze și reducerea ciclului tehnologic (Brevet de invenție MD Nr.2833. BOPI. Nr.8. 2005, MD Nr.4847 BOPI Nr.2.2023).
3. Preparatul enzimatic amilolitic, obținut din lichidul cultural al tulpinii *A. niger* CNMN FD 06, se recomandă spre aplicare în panificație (Act de experimentare).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

În limba română

1. ANGHEL, A., KAYCKA, A., DATAREY, E. Selecționarea de tulpini cu randament ridicat în obținerea de enzime amilolitice. In: *Microbiologie industrială și biotehnologie*. Iași, 1988, p. 211-216.
2. BACIU, E. Influența metalocomplexului de Zn asupra activității glucozidazelor lizozomale în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale. In: *Materialele Conferinței Științifice Anuale a col. și stud. USMF „N. Testemițianu”*. Chișinău, 1995, p. 104.
3. BEȘLIU, A., EFREMOVA, N., USATÎI, A., BATÎR, L. Evaluarea impactului nanoparticulelor de oxid de zinc asupra tulpinii de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03. In: *Studia Universitatis*. Seria Științe Reale și ale Naturii. 2019, vol. 121, nr. 1, pp. 95-99. ISSN 1814-3237.
4. BEȘLIU, A. *Efectele nanoparticulelor oxizilor metalici asupra levurilor din genul Rhodotorula*. tz. de doctor în biologie. Chișinău 2020. 184 p.
5. BIVOL, C., CILOCI, A., TIURINA, J., LABLIUC, S., DVORNINA, E., CLAPCO, S., GUTUL, T., RUSU, E. Strategie de izolare a lipazelor sintetizate de micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 01 cultivată în prezența nano-dioxidului TiO₂. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei*, Seria Științele vieții. 2019, 1(337), p. 148-157. ISSN 1857-064X.
6. BURȚEVA, S., USATÎI, A., TODERAȘ, A. Variabilitatea formelor spontane a tulpinii *Streptomyces sp.* 36 producătoare de substanțe bioactive. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei*. Științe biologice și chimice. 1996, nr. 1, pp. 27-32.
7. CEPOI, L., COJOCARU, A., CHIRIAC, T., RUDI, L. Utilizarea compușilor coordinativi ai metalelor în finobiotehnologie. In: *Tezele conferinței tinerilor cercetători consacrată aniversării a 40-a a AȘM și a 55-a de la formarea primelor instituții academice*. Chișinău, 2001, p. 91.
8. CILOCI (DESEATNIC), A., COROPCEANU, E., CLAPCO, S., RIJA, A., TIURINA, J., BIVOL C., BOLOGA, O., BULHAC, I. Influența compușilor coordinativi ai Co (III), Cu (II) și Zn (II) cu liganzi oximici asupra biosintezei hidrolazelor exocelulare la fungii miceliali. In: *Studia Universitas Moldaviae*, 2014, p. 57-70.

9. CLAPCO, S. *Selectarea unor tulpini de micromicete producătoare de enzime pectolitice și optimizarea condițiilor de dezvoltare și biosinteză*: tz. de doctor în biologie. Chișinău, 2006. 135 p.
10. COMANESCU, Ș.T., TOPALA, N.D., ARTENIE, V., TANASE, D., POPA, M. Obținerea unor preparate amidazice de la unele specii de *Bacillus*. In: *Lucrările celui de-al II-lea Simpozion de Microbiologie industrială*, Iasi, 25-26 mai 1979 [apărută în 1980].
11. **CONDRUC, V., CILOCI, A., BULHAC, I., CLAPCO, S., COCU, M., BOUROSH, P., DVORNINA, E., LABLIUC, S., URECHE, D.** Influența compușilor coordinațivi ai bariului și stronțului asupra biosintezei amidazelor extracelulare la micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 06. In: *9th edition International Scientific-Practical Conference "Training by research for a prosperous society"*, Chișinău 2022, vol. II Chimie, p. 95-102.
12. CROITORU, V., RUDIC, V. Biosinteza enzimelor lipolitice de către *Pseudomonas CNM-PSB*, microflora satelit a *Dunaliella salina*. In: *Akados*. 2011, nr. 3(22), pp. 89-92.
13. CRISTESCU, D. *Bacterii și enzime în biotehnologia țesutului colagenic*. București: Ed. Tehnica, 1989. 256 p.
14. DAN, V., BAHIM, G., NICOLAU, A. Condiții de obținere a complexului amidazo-proteazic prin cultivarea tulpinii *Bacillus subtilis* MIUG 961 pe medii semisolide. In: *Lucrările celui de-a IX-lea Simpozion de Microbiologie și Biotehnologie*. Iași, 1998, pp. 37-45.
15. DESEATNIC-CILOCI, A., ȘÎRBU, T., TIURINA, J., LABLIUC, S. Tulpină de fungi *Aspergillus niger* producătoare de enzime lipolitice: Brevet de invenție MD nr. 2362, C 12 N 1/14, 9/20 // (C 12 N 1/14; C 12 R 1:685). Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova. Nr. depozit: a 2001 0302. Data depozit: 2001.09.13. Publ.: 31.01.2004. In: *Buletin Oficial de Proprietate Intelectuală*. 2004, nr. 1, p. 32.
16. DESEATNIC-CILOCI A., COROPCEANU E., CLAPCO S., RIJA A., TIURINA J., BIVOL C., BOLOGA O., BULHAC I. Influența compușilor coordinațivi ai Co(III), Cu(II) și Zn(II) cu liganzi oximici asupra biosintezei hidrolazelor exocelulare la fungi miceliali. In: *Studia Universitatis Moldaviae. Științe reale și ale naturii*, Chișinău, 2014, nr. 6(76), p. 57-70. ISSN 1814-3237.
17. DIACONU, M., ROȘU, G., PAȘA, R. Stabilirea condițiilor optime de cultivare a tulpinii *Aspergillus niger* A 4 pentru biosinteza poligalacturonazelor. In: *Noutăți în Microbiologie și Biotehnologie: cel de-al IX-lea Simpozion național de Microbiologie și*

- Biotehnologie*, Iasi, 18-19 septembrie. Iași, 1998, pp. 612-617. ISBN 973-98259-8-2.
18. ELENCIUC, D., ZOSIM, L., BULIMAGA, V., CHIRIAC, T., BATÎR, L., PRODIUS, D., TURȚĂ, C., RUDIC, V. Productivitatea cianobacteriei *Spirulina platensis* și capacitatea de acumulare a fierului și cromului în biomasa de cultivare în prezența compușilor coordinați ai Fe (III) și Cr (III). In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2011, nr. 2 (314), pp. 145-152. ISSN 1857-064X.
 19. ENACHE, M., FACHI, A.-M. Activitatea amilolitică la tulpini izolate din lacuri salinice în condiții diferite ale raportului ionic $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$. In: *Noutăți în Microbiologie și Biotehnologie: cel de-al IX-lea Simpozion național de Microbiologie și Biotehnologie*, Iasi, 18-19 septembrie. Iași, 1998, pp. 705-711. ISBN 973-98259-8-2.
 20. HEFSCO, G., OLTEANU, Z., TANASE, A. Influența unor vitamine hidrosolubile asupra biosintezei α -amilazei și catalazei în fermentația cu *Bacillus subtilis*. In: *Noutăți în microbiologie și biotehnologie: cel de-al IX-lea Simpozion național de Microbiologie și Biotehnologie*, Iasi, 18-19 septembrie. Iași, 1998, pp. 671-677. ISBN 973-98259-8-2.
 21. IONESCU, A., JURCOANE, S., GLORIA-PETRISOR, I. Studii privind zaharificarea amidonului cu ajutorul unor preparate de β - și glucoamilaze produse la nivel pilot. In: *Noutăți în microbiologie și biotehnologie: cel de-al IX-lea Simpozion național de Microbiologie și Biotehnologie*, Iasi, 18-19 septembrie. Iași, 1998, pp. 227-231. ISBN 973-98259-8-2.
 22. IONIȚĂ, I. Studii privind îmbunătățirea potențialului de biosinteză prin lucrări de selecție artificială la o tulpină de *Bacillus subtilis* producătoare de proteaze alcaline. In: *Lucrările celui de-al III-lea Simpozion de microbiologie industrială*. București, 1982, pp. 254-260.
 23. JURCOANE, Ș. și col. *Tratat de biotehnologie*. Vol. I. București: Ed. Tehnică, 2004. 688 p.
 24. MOLODOI, E. Efectele undelor milimetrice de intensitate joasă asupra capacității biosintetice la drojdii. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2007, nr. 1(301), pp. 150-155.
 25. NICOLAU, A. Utilizarea culturilor mixte de fungi selectionați pentru producerea de amilaze. In: *Noutăți în microbiologie și biotehnologie: cel de-al IX-lea Simpozion național de Microbiologie și Biotehnologie*, Iasi, 18-19 septembrie. Iași, 1998, pp. 105-115. ISBN 973-98259-8-2.
 26. PALAMARU, M.N., IORDAN, A.R., CELAC, A. Chimie bioorganică și metalele vieții. Iași: BIT, 1997. 393 p.

27. POLONSKY, V.I., ASANOVA, A.A. Evaluarea impactului nanoparticulelor de dioxid de titan asupra organismelor vii. In: *Probleme teoretice ale ecologiei*. 2018. nr. 3, pp. 5-11.
28. ROSETTI-COLȚOIU, M. *Biochimie*. București: Editura Didactică și Pedagogică, 1985. 424 p.
29. RUDI, L., CEPOI, L., CHIRIAC, T., VALUȚA, A., DJUR, S., MISCU, V., DUMBRĂVEANU, V., CODREANU, L., TAȘCĂ, I., ROTARI, I., RUDIC, V. Unele aspecte ale aplicării nanoparticulelor de aur în biotehnologia microalgei *Porphyridium cruentum*. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2021, nr. 2(344). DOI 10.52388/1857-064X.2021.2.12.
30. RUDIC, V., CEPOI, L., RUDI, L., CHIRIAC, T., GUȚU, T., NICORICI, A., TODOSICIUC, A. Aprecierea efectelor nanoparticulelor CdSe asupra proceselor de protecție antioxidantă la microalge și cianobacterii. Conferința științifică internațională "Biotehnologia microbiologică – domeniu scientintensiv al științei contemporane". Chișinău, 6-8 iulie 2011, p.95-96.
31. RUDIC, V.F. *Aspecte noi ale biotehnologiei moderne*. Chișinău: Știința, 1993. 139 p. ISBN 5-376-01829-6.
32. RUDIC, V., CEPOI, L., RUDI, L., MISCU, V., CHIRIAC, T., COJOCARI, A., LOZAN, V., COROPCEANU, E., BOLOGA, O. Acțiunea compușilor coordinațivi ai cobaltului cu dioximinele asupra unor procese biosintetice la alga roșie *Porphyridium cruentum*. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2012, nr. 1 (316), pp. 144-151. ISSN 1857-064X.
33. RUDIC, V., COJOCARI, A., CEPOI, L., MISCU, V. Studiul căilor de reglare a biosintezei polizaharidelor la cyanobacteria *Nostoc linckia (roth) Born et Flahs* CNM-CB-03. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2007, nr. 1(301), pp. 163-169.
34. RUDIC, V., CIUMAC, D. Investigarea căilor de majorare a conținutului de proteine în biomasa de spirulină la cultivare în prezența unor coordinațivi ai Cr(III). In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2008, nr. 2(305), pp. 133-142. ISSN 1857-064X.
35. RUDIC, V., BATÎR, L., GULEA, A., ȚAPCOV, V. Studiul influenței compușilor coordinațivi ai Cu (II) asupra productivității cianobacteriei *Spirulina platensis*. In: *Studia Universitatis. Seria Științele naturii. Biologie*. 2009, nr. 1(21), pp. 29-33. ISSN 1857-1735.

36. RUGINĂ, V., HEFSCO, G. Influența adaosului de aminoacizi în biosinteza enzimelor α -amilază, amiloglucozidază, catalază în fermentația speciei *Bacillus subtilis*. In: *Noutăți în microbiologie și biotehnologie: cel de-al IX-lea Simpozion național de Microbiologie și Biotehnologie*, Iasi, 18-19 septembrie. Iași, 1998, pp. 657-667. ISBN 973-98259-8-2.
37. SCRIBAN, R. *Biotehnologie*. 3e éd. rev. et augm. Paris: Technique et Documentation, 1988. 906 p. ISBN 978-2-85206-440-9.
38. SCUTARAȘU, E.-C. *Studii privind influența folosirii unor preparate enzimaticice în tehnologia de obținere a vinurilor albe în podgoria Iași: tz de doctor în științe tehnice*. Iași. 2021. 157 p.
39. SÎRBU, T. *Particularitățile fiziologo-biochimice de cultivare a unor tulpini de micromicete producători de enzime lipolitice: tz de doctor în științe biologice*. Chișinău. 2004. 134 p.
40. SORU, E. *Biochimia medicală*. Vol. 1. București: Ed. Medicală, 1959. 925 p.
41. STRATAN, M. *Biotehnologii de cultivare a tulpinii Aspergillus niger 33-19 CNMN FD 02A producător de amilaze: teză de doctor în științe biologice*. Chișinău, 2011. 127 p.
42. TODERAȘ, A. Variabilitatea naturală și sinteza aminoacizilor la *Streptomyces sp.* 36. In: *Genetica și ameliorarea plantelor și animalelor în Republica Moldova: materialele științifice ale Congresului VII (jubiliar) al Societății Științifice a Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova*, Chișinău, 23-24 septembrie 1999. Chișinău, 1999, pp. 819-823.
43. TODERAȘ, I., GULEA, A., GUDUMAC, V., ROȘCOV, E., GARBUZ, O. Metodă de apreciere a toxicității substanțelor chimice: Brevet de invenție MD 1279, G01N 21/00 (2006.01), C12N 1/10 (2006.01). Institutul de Zoologie al Academiei de Științe a Moldovei. Nr. depozit: s 2017 0067. Data depozit: 2017.05.23. Publ.: 31.08.2018. In: *Buletin Oficial de Proprietate Intelectuală*. 2018, nr. 8, pp. 67-68.
44. TOLOCICHINA, S., SLANINA, V., BURȚEVA, S., POSTOLACHI, O., SÎRBU, T., LUPAȘCU, T., STEPANOV, V. Standartizarea procedurii de conservare a tulpinilor de bacterii păstrate în CNMN. II. Standartizarea procedurii de conservare a tulpinilor din genul *Bacillus* păstrate în CNMN. Buletinul AȘM. Științele vieții. 3(313), Chișinău, 2012, p. 165-172. ISSN 1857-064X.
45. VASILESCU, I. *Enzimele*. Bucuresti: Editura Academiei Romane, 1961. 428 p.
46. VASILESCU, I. *Tehnologia și aplicațiile industriale ale enzimelor*. București: Editura Tehnică, 1963. 356 p.

47. USATĂI, A. et al. Productivitatea, lipidogeneza și carotinogeneza drojdiei *Rhodotorula gracilis*-CNMN-YS-III/20 la cultivarea în prezența compușilor coordinați ai Mo (IV), Co (III), Cr (III), V (V). In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe biologice și chimice*. 2003, nr. 1, pp. 99-103.
48. USATÎI, A., CHISELIȚA, N., BEȘLIU, A., EFREMOVA, N., BEJENARU, L., BATÎR, L., DADU, C., TANASE, A. Perspectiva biotehnologică privind aplicarea nano-oxizilor metalici la cultivarea levurilor de interes biotehnologic. In: *Studia Universitatis Moldaviae*. 2019, vol. 121, nr. 1, pp. 103-111. ISBN 1814-3237.
49. ZARNEA, G., MENCINICOPSCII, Gh., BRAGAREA, Șt. *Bioingineria preparatelor enzimatic microbiene*. București: Editura Tehnică, 1980. 420 p.
50. ZARNEA, G. *Tratat de microbiologie generală*. Vol. 5. București: Editura Academiei Române, 1994. 1078 p.

În limba rusă

51. АЛИХАНЫ, С.И. *Селекция промышленных микроорганизмов*. Москва: Наука, 1968. 392 с.
52. БАЛЪСИС, А.Б., БАХМАТОВА, У.В., ЧЮРИН, Т.К. α -амилазы морфологических вариантов и их каталитические свойства. В: *V Всесоюзный Биохимический съезд: Тезисы стендовых сообщений*. Москва: Наука, 1986.
53. БАСНАКЪЯН, И.А. *Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами*. Москва: «Медицина», 1992. 191 с. ISBN 5-225-02142-5.
54. БЕЦКИЙ, О.В., КИСЛОВА, В.В., ЛЕБЕДЕВА, Н.Н. Миллиметровые волны и живые системы. Москва: «Сайнс пресс», 2004. 271 с. ISBN 5-94818-024-7.
55. БЕЗБОРОДОВ, А.М. *Микробные метаболиты - ингибиторы ферментов*. Москва: Наука, 1986. 95 с.
56. БЕЗБОРОДОВ, А.М., АСТАПОВИЧ, Н.И. *Секреция ферментов у микроорганизмов*. Москва: Наука, 1984. 70 с.
57. БИЛАЙ, В.И. и др. *Методы экспериментальной микологии*. Киев: Наукова Думка, 1973. 242 с.
58. БИЛАЙ, В.И., КОВАЛЬ, Э.З. *Аспергиллы. Определитель*. Киев: Наукова Думка, 1988. 204 с.
59. БОЧЕВА, С.С., СЕМОТИНА, С.Н., КРУКЕР, И.И. Возрастные особенности продукции секретируемой амилазы гриба *Aspergillus oryzae*. В: *Вопросы биохимии*

- и физиологии микроорганизмов*: межвуз. науч. сб., Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1986, вып. 10.
60. БУРЦЕВА, С.А., МАСЛОБРОД, С.Н., ГАРАЕВА, С.Н., БРАТУХИНА, А.А., ПОСТОЛАКИЙ О.М. Биологический эффект электромагнитных волн слабого напряжения в миллиметровом диапазоне на стрептомицеты. В: *Миллиметровые волны в медицине и биологии*. Сборник трудов 14-го Рос Симпозиума с международным участием. Москва, 2007, с. 308-312.
 61. ВАРДУНИ, Т.В., СЕРЕДА, М.М., КАПРАЛОВА, О.А., ЧОХЕЛИ, В.А., ШИМАНСКАЯ, Е.И. Влияние наночастиц диоксида титана на рост и развитие томата (*Lycopersicon Esculentum*) в культуре *in vitro*. В: *Современные проблемы науки и образования*. 2017, № 6, с. 268-268.
 62. ВИНОХОДОВ, Д.О. *Научные основы биотестирования с использованием инфузорий*: дисс. на соиск. ученой степени доктора биологических наук. Санкт-Петербург, 2007. 353 с. Доступ: https://new-disser.ru/product_info.php?products_id=707052
 63. ВОРОБЬЕВА, И.С., ПОПОВ, М.П. Модифицированный метод определения активности амилаз зерна по числу падения. В: *Прикладная биохимия и микробиология*. 2002, т. 38, № 4, с. 455-458.
 64. ГАЛИЧ, И.П. *Амилазы микроорганизмов*. Киев: Наукова думка, 1987. 192 с.
 65. ГОСТ 20264.4-89. *Препараты ферментные. Методы определения амилитической активности. Enzyme preparations. Methods for the determination of amylase activity*. Москва: Издательство Стандартов, 1989. 27 с.
 66. ГИЦУ, Д.В., ПАРХОМЕНКО, В.Ф., РОТАРУ, А.Х. Фундаментальные и прикладные исследования взаимодействия электромагнитных волн КВЧ с медико-биологическими объектами. In: *13 Russian symposium with participation of Foreign Scientists Millimeter waves in medicine and biology*. Moscow, 2003, с. 115.
 67. ГРАЧЕВА, И.М. и др. *Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов*. Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1982. 240 с.
 68. ГРАЧЕВА, И.М. *Технология ферментных препаратов*. 2-е изд., перераб. и доп. Москва: Агропромиздат, 1989. 335 с.
 69. ДЕДЮХИНА, Э.Г., ЕРОШИН, В.К. Незаменимые химические элементы в регуляции метаболизма микроорганизмов. В: *Успехи микробиологии*. 1991, вып. 25, с. 127-141.

70. ДЕСЯТНИК, А.А., ТЮРИНА, Ж.П., ВИНОГРАДОВ, С.П., ЛАБЛЮК, С.В. Эффективные технологии производства новых ферментных препаратов микробного происхождения и их использование в перерабатывающих отраслях. Кишинэу, 1998. 35 с. (Обзор.информ./МолдНИИТЭИ).
71. ДОСПЕХОВ, Б. *Планирование полевого опыта и статистическая обработка данных*. Москва: Колос, 1985. 351 с.
72. ЕФРЕМОВА, Н.В., БУЛЬМАГА, В.П., РЕВА, В.А., РУДИК, В.Ф., КИРИАК, Т.В., ГУЛЯ, А.П., ЗОСИМ, Л.С., ЕЛЕНЧУК, Д.И., ДЖУР, С.В., БИВОЛ, С.М. Влияние некоторых металлокомплексов на содержание фикоцианина и активность супероксиддисмутазы в биомассе *Spirulina platensis* (NORDST) GEITLER (СЯНОРНИТА). В: *Альгология*. 2012, №22(3), с. 250-257. ISSN 0868-8540.
73. ЖЕРЕБЦОВ, Н.А., РУАДЗЕ, И.Д., ЯКОВЛЕВ, А.Н. О механизме кислотного и ферментативного гидролиза крахмала. В: *Прикладная биохимия и микробиология*. 1995, т. 31, № 6, с. 599-603.
74. Каталог культур микроорганизмов, поддерживаемых в учреждениях СССР. М., Изд. "Наука", 1981., стр.110.
75. КВЕСИТАДЗЕ, Г.И. *Грибные и бактериальные амилазы*. Тбилиси: Мецниереба, 1984. 154 с.
76. КВЕСИТАДЗЕ, Г.И. *Ферменты микроорганизмов, живущих в экстремальных условиях*: 42-м ежегод. Бахов. чтении 17 марта 1986 г. Москва: Наука, 1990. 51 с. ISBN 5-02-004059-2.
77. КИЧАКОВА, Н.А., ПАВЛОВА, И.Н., ЗАХАРОВА, И.Я. Очистка и идентификация амилолитических ферментов *Bacillus licheniformis*. В: *Прикладная биохимия и микробиология*. 1998, т. 34, №5, с. 503-508.
78. КЛАПКО, С., ПАША, Л., **КОНДРУК, В.**, ДЕСЯТНИК, А., ТЮРИНА, Ж., СТРАТАН, М. Влияние миллиметровых волн низкой интенсивности на энзиматическую активность некоторых штаммов микроскопических грибов. В: *II-я Международная научная конференция, посвященная 140-летию Одесского Национального Университета им. И.И. Мечникова*, Одесса, 28.03-01.04.2005. Одесса, 2005, с. 128.
79. КОНОВАЛОВ, С.А., КОТОВ, В.Б. *Селекция микроорганизмов - продуцентов ферментов*. Москва, 1970. 185 с.
80. КОНОВАЛОВ, С.А. *Биосинтез ферментов микроорганизмами*. Москва: Пищевая промышленность. 1972. 273 с.

81. КОРШУНОВА, В.В., ЛОГИНОВА, Л.Г. Синтез глюкоамилазы и α -амилазы термотолерантным грибом *Aspergillus awamori*. ИНМИ. В: *Прикладная биохимия и микробиология*. 1988, т. 24, №1, с. 80-83.
82. КУРАСОВА, В.В., КОСТИН, В.В., МАЛИНОВСКАЯ, Л.С. *Методы исследования в ветеринарной микологии*. Москва: Изд-во «Колос», 1971. 312 с.
83. ЛАКИН, Г.Ф. *Биометрия*. Москва, 1980. 291 с.
84. ЛОБАНОК, А.Г., АСТАНОВИЧ, Н.И., МИХАЙЛОВА, Р.В. Биотехнология микробных ферментов. В: *Наука и техника*. Минск, 1989, с. 129-166.
85. *Микробные ферменты и биотехнология*. Под ред. В.М. Фогарти. Москва: Агропромиздат, 1986. 208 с.
86. ПОЗМОГОВА, И.Н. *Культивирование микроорганизмов в переменных условиях*. Москва: Наука, 1983. 104 с.
87. РЕБРОВА, Т.Б. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на жизнедеятельность микроорганизмов. В: *Миллиметровые волны в биологии и медицине*. 1992, №1, с. 37-44.
88. РУХЛЯДЕВА, А.П., ПОЛЫГАЛИНА, Г.В. *Методы определения активности гидролитических ферментов*. Москва: Лёгкая и пищевая промышленность, 1971. 288 с.
89. САТТОН, Д., ФОТЕРГИЛЛ, А., РИНАЛЬДИ, М. *Определитель патогенных и условно патогенных грибов*. Москва: Мир, 2001. 468 с.
90. СТЕПАНОВ, В.И., ИВАНОВ, В.В. *Микробные ферментные препараты и их применение в пищевой и перерабатывающей промышленности*. М.: «Пищепромиздат», 1999, с. 40-41.
91. ТАМБИЕВ, А.Н., КИРИКОВА, Н.Н., ЛУКЪЯНОВ, А.А. Применение активных частот электромагнитного излучения миллиметрового и сантиметрового диапазона в микробиологии. В: *Наукоёмкие технологии*. 2002, т. 3, №1, с. 34-53.
92. ЧИЛОЧИ, А.А., ТЮРИНА, Ж.П., БИВОЛ Ч.М., КЛАПКО С.Ф., ДВОРНИНА, Е.Г., ЛАБЛЮК, С.В. Новые биотехнологии культивирования микроскопических грибов – продуцентов внеклеточных гидролаз с использованием наноматериалов. Четвертый Международный Микологический Форум, Москва, 2021. В: *Современная микология в России*. 2020, Том 8, вып. 6, с.399-401
93. ЧИЛОЧИ, А.А., ТЮРИНА, Ж.П., КЛАПКО, С.Ф., СТРАТАН, М.В., ЛАБЛЮК, С.В., ДВОРНИНА, Е.Г., **КОНДРУК, В.Ф.** Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на биосинтез внеклеточных гидролитических

- ферментов микромицетов из родов *Aspergillus* и *Penicillium*. В: *Электронная обработка материалов*. 2011, т. 47 (6), с. 87-93. ISSN 0013-5739.
94. ЧИЛОЧИ, А., ТЮРИНА, Ж., ЛАБЛЮК, С., ДВОРНИНА, Е., КЛАПКО, С., БИВОЛ, Ч., ГУЦУЛ, Т., РУСУ, Е. Особенности биосинтеза липаз микромицетом *Rhizopus arrhizus* CNMN- FD- 03 под влиянием наночастиц окислов некоторых металлов. В: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2017, nr. 2(332), pp. 116-125. ISBN 1857-064X.
95. ЦУРИКОВА, Н.В., НЕФЕДОВА, М.И., КОСТЫЛЕВА, Е.В., ЗВЕНИГОРОДСКИЙ, В.И. Получение ацивного штамма *Bacillus licheniformis* - продуцента термостабильной α -амилазы. В: *Прикладная биохимия и микробиология*. 2002, т. 38, №5, с. 502-508.
96. ЗАКИРОВ, М.З. *Ферменты плесневых грибов*. Ташкент, 1975. 123 с.

În limba engleză

97. ABADA, E. Application of microbial enzymes in the dairy industry. In: *M. Kuddus, ed. Enzymes in Food Biotechnology. Production, Application, and Future Prospects*. 2019, pp. 61-72.
98. ABE, J-I., CHIAKI, U., SUSUMU, H. Expression of the isoamylase gene of *Flavobacterium odoratum* KU in *Escherichia coli* and identification of essential residues of the enzyme by site-directed mutagenesis. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, vol. 65, no. 9, pp. 4163-4170. ISSN 0099-2240.
99. el-ABYAD, M.S., el-SHANSHOURY, A.-R., HAFEZ, M. Purification and characterization of the glucoamylase produced by a strain of *Aspergillus flavus*. In: *Microbios*. 1994, 80 (322), pp. 7-15.
100. ADEFILA, O., BAKARE, M., ADEWALE, O. Characterization of an α -amylase from sorghum (*Sorghum bicolor*) obtained under optimized conditions. In: *Journal of the Institute of Brewing*. 2012, vol. 118(1), pp. 63-69. ISSN 2050-0416.
101. AGRAWAL, M., PRADEEP, S., CHANDRARAJ, K., GUMMADI, S.N. Hydrolysis of starch by amylase from *Bacillus sp. KCA102*: a statistical approach. In: *Process Biochemistry*. 2005, vol. 40(7), pp. 2499-2507. ISSN 1359-5113.
102. AGUILAR, G., MORLON-GUYOT, J., TREJO-AGUILAR, B., GUYOT, J.P. Purification and characterization of an extracellular amylase produced by *Lactobacillus*

- manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lacticacid bacterium. In: *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, vol. 27, pp. 406-413.
103. AKMEDOVA, Z.R., DALIMOVA, G.N. Biotechnology for production of different hydrolitic, oxidative enzymes from fungi. In: *Modern Problems of Microbial Biochemistry and Biotechnology: international symposium*. Pushcino, 2000, pp. 139-141.
 104. ALVA, S. et al. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp.* JGI 12 in solid state culture. In: *African Journal of Biotechnology*. 2007, vol. 6(5), pp. 576-581. ISSN 1684-5315.
 105. AMOOZEGAR, M.A., MALEKZADEH, F., MALIK, K.A. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus sp.* strain MA-2. In: *Journal of Microbiological Methods*. 2003, vol. 52(3), pp. 353-359.
 106. ASGHER, M., ASAD, M.J., RAHMAN, S.U., LEGGE, R.L. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. In: *Journal of Food Engineering*. 2007, vol. 79(3), pp. 950-955. ISSN 1873-5770.
 107. AURONG LEB, M., QUDEER, M.A., IGBAL, I. Snake flask Studies on the production of roin souch pydrolyzing amylolytic enzymes by *Aspergiilus niger* POSIR-10. In: *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. 1991, vol. 34(7-8), pp. 296-300. ISSN 2223-2567.
 108. BAKER, R.A., TATUM, J.H. Novel anthraquinones from stationary cultures of *Fusarium oxysporum*. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1998, nr. 85, pp. 359-361.
 109. BAKER, S., VOLOVA, T., PRUDNIKOVA, S., SATISH, S., PRASAD, N. Nanoagroparticles emerging trends and future prospect in modern agriculture system. In: *Environmental toxicology and pharmacology*. 2017, vol. 53, pp. 10-17.
 110. BALKAN, B., ERTAN, F. 2007. Production of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* under solid state fermentation by using some agricultural by-products. In: *Food Technology and Biotechnology*. 2007, vol. 45(4), pp. 439-442. ISSN 1330-9862.
 111. BANERJEE, S., GHOSH, U. Production and characterization of Glucoamylase by *Aspergillus niger*. In: *Applied Food Biotechnology* [online]. 2017, vol. 4 (1), pp. 19-26. [viewed 08 iulie 2023]. ISSN 2345-5357. Available: <https://doi.org/10.22037/afb.v4i1.13261>.
 112. BANO, T., PRIYANKA, PADMADEO, S.R. Sustainable Industrial Development through Enzyme Technology: An approach toward cleaner production- a literature review. In: Review, IOSR-JBB. 2017, vol. 3, pp. 1-7.

113. BARRENTINE, L.B. An Introduction to Design of Experiments: a simplified approach. Milwaukee, Wisconsin: ASQ Quality Press, 1999. 116 p. ISBN 0-87389-444-8.
114. BEHAILU, A., ABEBE, G. Isolation, production and characterization of amylase enzyme using the isolate *Aspergillus niger* FAB-211. In: *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*. 2008, vol. 9(2), pp. 7-14.
115. Biological aspects of low intensity Millimeter Waves. Eds.: N. D. Devyatkov, O.V. Betskii. Moscow: Seven plus, 1994.
116. BINOD, P. et al. Industrial Enzymes - Present Status and Future Perspectives for India. In: *Journal of Scientific and Industrial Research: JSIR*. 2013, vol. 5, pp. 271-286. ISSN 0022-4456.
117. BIVOL C., CILOCI (DESEATNIC) A., TIURINA J., CLAPCO S., LABLIUC S., DVORNINA E., LAZARESCU A., REVA V. Impact of thiosemicarbazone [Cu(H₂L)Cl] coordination compound on acid and neutral proteases from *Trichoderma koningii* CNMN FD 15 strain. 2020, p. 64-70.
118. BOUSSARSAR, H. et al. Physico-chemical approach of the amylolytic action pattern of a thermostable amylopullulanase. In: *Food Biophysics* [online]. 2007, vol. 2, pp. 100-107. [viewed 28 iulie 2023]. ISSN 1557-1858. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11483-007-9036-5>
119. BRUHOVA, A.K., et al. Influence of electromagnetic radiation of MM-bond, laser radiation and its complete action on behaviour of microorganisms. In: *Electron industry*. Moscow, 1985, pp. 6-9.
120. BUFFO, M.M., ESPERANÇA, M.N., FARINAS, C.S., BADINO, A.C. Relation between pellet fragmentation kinetics and cellulolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in conventional bioreactor with different impellers. In: *Enzyme Microb Technol* [online]. 2020, [viewed 28 iulie 2023]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32732036/>
121. BURHAN, A. et al. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6. In: *Process Biochemistry* [online]. 2003, vol. 38(10), pp. 1397-1403. [viewed 28 iulie 2023]. DOI 10.1016/S0032-9592(03)00037-2.
122. CAIRNS, T.C, NAI, C., MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. In: *Fungal Biology and Biotechnology*. 2018, nr. 13, pp. 5-13.
123. CHAKRABORTY, M.B. et al. Production, assay and optimisation of amylase by submerged fermentation using *Aspergillus niger*. In: *Annals of Plant Sciences* [online].

- 2018, vol. 7(6), pp. 2357-2360. [viewed 28 iunie 2023]. Available: <https://www.annalsofplantsciences.com/index.php/aps/article/view/544>.
124. COROPCEANU, E., CILOCI, A., ȘTEFÎRȚĂ, A., BULHAC, I. Study of useful proprieties of some coordination compounds containng oxime ligands. *Academica Greifswald*, 2020. 258 p. ISBN 978-3-9402237-24-8.
 125. COROPCEANU, E., CROITOR, L., CILOCI, A., CLAPCO S., LABLIUC, S., CODREANU and FONARI, M. Synthesis and Structure of Some Zinc and Cadmium 1,2-Cyclohexanedione Dioximines. *ISSN 1070-3284, Russian Journal of Coordination Chemistry*, 2017, Vol. 43, No. 7, pp. 433–440. © Pleiades Publishing, Ltd., 2017 (IF: 0.541).
 126. COROPCHEANU, E., et al. Co (III) dioximate fluorine containing compounds as stabilizers of biosynthesis processes. In: *Buletinul Institutului Politehnic din Iași*. 2003, vol. XLIX, fasc. 5, pp. 293-298.
 127. CHANG, Y.N., ZHANG, M., XIA, L., ZHANG, J., XING, G. The Toxic Effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. In: *Materials*. 2012, vol. 12, nr. 5, pp. 2850-2871. ISSN 1996-1944.
 128. CHAPMAN, J., ISMAIL, A.E., DINU, C.Z. Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. In: *Catalysts*. 2018, vol. 8(6), pp. 1-26.
 129. CILOCI, A., BIVOL, C., STRATAN, M., TIURINA, J., CLAPCO, S., REVA, V., LABLIUC, S. Action of millimeter-range electromagnetic radiation on polypeptide spectrum of amylyolytic preparations from *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02A strain. In: *Surface Engineering and Applied Electrochemistry*. 2014, 50 (1), 78-83. ISSN 1068-3755 (IF: 0.289).
 130. CHILOCHI, A.A., TURINA, Zn.P., KLAPCO, S.F., STRATAN, N.V., LABLYUK, S.V., DVORNINA, E.G., **KONDRUK, V.F.** Effect of millimeter - range electromagnetic radiation of the biosynthesis of extracellular hydrolytic enzymes in *Aspergillus* and *Penicillium* Micromycetes. In: *Surface Engineering and Applied Electrochemistry*. 2011, vol. 47(6), pp. 558-564. ISSN 1068-3755.
 131. CORTESÃO, M. et al. *Aspergillus niger* spores are highly resistant to space radiation. In: *Frontiers in Microbiology* [online]. 2020, vol. 11, p. 560. [viewed 08 iulie 2023]. DOI 10.3389/fmicb.2020.00560.
 132. COURI, S., SAAVEDRA PINTO, G.A., de SENNA L.F., LABARTHE MARTELLI, H. Influence of metal ions on pellet morphology and polygalacturonase synthesis by *Aspergillus niger* 3t5b8. In: *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2003, vol. 34,

- pp. 16-21. [viewed 08 iulie 2023]. Available: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000100005>.
133. ČURIĆ, Duška et al. The influence of fungal α -amylase supplementation on amyolytic activity and baking quality of flour. In: *International Journal of Food Science Technology*. 2002, vol. 37 (6), pp. 673-680. [viewed 28 iulie 2023]. Available: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00598>.
134. DESEATNIC-CILOCI A., TIURINA J., BIVOL C., CLAPCO S., LABLIUC S., DVORNINA E. The dependence of biosynthetic properties of micromycete *Aspergillus niger* 10 – producer of extracellular cellulases and xylanases on cultivation factors. IMB. Scientific International Conference On Microbial Biotechnology (2nd edition). Chisinau, Moldova, October 9-10 2014, p. 122.
135. DIBA, K. et al. Identification of aspergillus species using morphological characteristics. In: *Pakistan Journal of Medical Sciences* [online]. 2007, vol. 23 (6), pp. 867-872. [viewed 08 iulie 2023]. ISSN 1681-715X. Available: <https://www.pjms.com.pk/issues/octdec207/article/article9>.
136. DOJNOV, B., GRUJIĆ, M., PERČEVIĆ, B., VUJČIĆ, Z. Enhancement of amylase production using carbohydrates mixtures from triticale in *Aspergillus sp.* In: *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2015, vol. 80 (10), pp. 1279-1288.
137. DRIOUCH, H., SOMMER, B., WITTMANN, C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. In: *Biotechnology and bioengineering*. 2010, vol. 105, nr. 10, pp. 58-68. ISSN 1097-0290.
138. DRIOUCH, H., HÄNSCH, R., WUCHERPFENNIG, T., KRULL, R., WITTMANN, C. Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: targeted morphology engineering using titanate microparticles. In: *Biotechnol Bioeng*. 2012 vol. 109(2), pp. 462-71. DOI 10.1002/bit.23313.
139. DUCROO, P. Utilization industrielle des enzymes. In: *Industries Alimentaires et Agricoles*. 1982, pp. 401-416.
140. ERIKSSON, E., BLANCHETTE, R.A., ANDER, P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin: Springer-Verlag Hedelberg, 1990. 407 p. ISBN 9780387516004.
141. FINKELSTEIN, D. *Biotechnology of Filamentous Fungi*. London, 1991.
142. FISER, F.H., MONTMOLLIN, R. Proprietes de α -amilase: *Aspergillus oryzae* cristalisee. Sur les enzymes amyloplitiques. 19. In: *Helvchim. acta*. 1951, vol. 34, nr. 6, pp. 1994-1999.

143. GĂRBĂLĂU, N. et al. Study and properties of fluorine containing cobalt (III) dioximates. In: *Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași*. Iași, 1999, pp. 281-284.
144. GĂRBĂLĂU, N. et al. Cobalt (III) dioximates which contain fluorine stimulators of the biosynthesis of microorganisms enzymes. București: „Politehnica”, 1999, pp. 89-92. (
145. GOLANT, M.V. et al. Low - intensity mm-wave radiation effects on bioobjects. In: *Institute of Radioengineering and Electronics (IRE) of Russian Academy of Sciences*. 1983, pp. 1215-1220.
146. GOTO, M., EKINO, K., FURUKAWA, K. Expression and functional analysis of a hyperglycosylated glucoamylase in a parental host, *Aspergillus awamori* var. *kawachi*. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, vol. 63 (7), pp. 2940-2943.
147. GUDUMAC, V., BACIU, E., RÎVNEAC, V. Beneficial effect of zinc administration on collagen degradation during recovery experimental hepatic fibrosis. In: *Metal Elements in Environment, Medicine and Biology: the 4th International Symposium of Timisoara*, November 6-8, 2000. Abstract and programme. 2000, p. 2.
148. GUPTA, R. et al. Microbial α -Amylases: a biotechnological perspective. In: *Process Biochemistry*. 2003, vol. 38 (11), pp. 1599-1616. ISSN 1359-5113.
149. HAIDUC, I. Organometallic compounds in the environment, medicine and biology. In: *Proceedings of the 3rd International Symposium on Metal Elements in Environment, Medicine and Biology*”. Timișoara, 1998, pp. 19-22.
150. HATZINIKOLAOU, D.G., MACRIS, B.J. Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. In: *Enzyme and Microbial Technology*. 1995, vol. 17 (6), pp. 530-534.
151. HARADA, T. Bacterial Isoamylase and Pullulanase. In: *Journal of the Japanese Society of Starch Science*. 1984, vol. 31 (2), pp. 38-47.
152. HERMERSDORFER, H. et al. Influence of culture conditions on mycelial structure and polygalacturonase synthesis of *Aspergillus niger*. In: *Journal of basic microbiology*. 1987, vol. 27 (66), pp. 309-315.
153. HINTON-SHELEY, P. What is *Aspergillus niger*? In: *News Medical Life Sciences* [online] [viewed 10 iunie 2023]. Available: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Aspergillus-niger>.
154. JING, H., CHAN, W., HONGXUAN, R., YUNQIANG, W., JUNLI, L., JIN, H. Comparative Analysis of Physiological Impact of γ -Fe₂O₃ Nanoparticles on

- Dicotyledon and Monocotyledon. In: *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018, nr. 18 (1), pp. 743-752. DOI 10.1166/jnn.2018.13921.
155. HUND-RINKE, K., SIMON, M. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and *Daphnids*. In: *Environmental Science and Pollution Research*. 2006, vol. 13, pp. 225-232. ISSN 0944-1344.
156. IHEANZI, O. et al. The role of biotechnology in the socio-economic advancement and national development: an overview. In: *African journal of Biotechnology*. 2006, vol. 5(19), pp. 2354-2366.
157. IGARASHI, K. et al. Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, vol. 64 (9), pp. 3282-3289.
158. IBRAHIM, D., WELOOSAMY, H., LIM, S.H. Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. In: *World Journal Biological Chemistry* [online]. 2015, vol. 6(3), pp. 265-271. [viewed 08 iulie 2023]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549767/>
159. KHANNA, P., ONG, C., BAY, B.H., BAEG, G.H. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. In: *Nanomaterials*. 2015, nr. 5, pp. 1163-1180. ISSN 2079-4991.
160. KHURSHID, S. et al. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger*. In: *African Journal of Biotechnology* [online]. 2011, vol. 10(9), pp. 1674-1678. [viewed 08 iulie 2023]. ISSN 1684-5315. Available: DOI 10.5897/AJB08.100.
161. KOHJI, O. et. al. Characterizatics of two forms of α -amylases and structural implication. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, vol. 65(10), pp. 4652-4667.
162. KONISHI, H., SATO, T., YAMAGATA, H., UDAKA, S. Efficient production of human α -amylase by a *Bacillus brevis* mutant. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1990, pp. 297-302.
163. KRAUSE, M., WIERENGA, R.K. Toward new nonnatural tim-barrel enzymes using computational design and directed evolution approaches. In: A. Svendsen, ed. *Understanding Enzymes*. 2016, pp. 561-611. DOI 10.1201/b19951-20.
164. KUEK, C. Production of glucoamylase using *Aspergillus phoenicus* immobilized in calcium alginate beads. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1991, vol. 35 (4), pp. 466-471.

165. KUDDUS, M. Introduction to Food Enzymes. Enzymes in food biotechnology, production, application, and future prospects [online]. 2018. ISBN 9780128132807. [viewed 02.07.2023]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/357335538>.
166. KUMAR, P., SHARMA, S.M. Enzymes in Green Chemistry: The Need for Environment and Sustainability. In: *International Journal of Advanced Research (IJAR)*. 2016, vol. 2, pp. 337-341.
167. LARUE, C., KHODJA, H., HERLIN-BOIME, N., BRISSET, F., FLANK, A. M., FAYARD, B., CHAILLOV, S., CARRIERE, M. Investigation of titanium dioxide nanoparticles toxicity and uptake by plants. In: *Journal of Physics: Conference Series*. 2011, vol. 304 (1). DOI 10.1088/1742-6596/304/1/012057.
168. LIN, P.-J., KRULL, R. Influence of the volumetric power input on morphology and productivity of *Aspergillus niger*. In: *ResearchGate* [online]. 2023. [viewed 08.07.2023]. Available: "https://www.researchgate.net/figure/Morphological-characteristics-of-Aspergillus-niger-volumetric-power-input-100-W-m-3_fig1_268427977."
169. LINARDI, V.R., MACHADO, K.M. Production of amylases by yeasts. In: *Canadian Journal of Microbiology*. 1990, vol. 36 (11), pp. 751-753.
170. LIMA, M-A.S. et al. *Aspergillus niger*: A hundred years of contribution to the natural products chemistry. In: *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2019, vol. 30.
171. MACHONA, O., MLAMBO, R., ZHARARE, T., MANGOYI, R. Isolation and activity determination of enzymes secreted by *Aspergillus niger*. In: G.D. Yadav, M. Lakshmikantam, B. Bhanage, eds. *Catalysis in Green Chemistry and Engineering*. 2019, vol. 2(1), pp. 67-74.
172. MATHEW, J.J., VAZHACHARICKAL, P.J., SAJESHKUMAR, N.K., ASHOKAN, A. Amylase production by *Aspergillus niger* through submerged fermentation using starchy food byproducts as substrate. In: *International Journal of Herbal Medicine*. 2016, vol. 4 (6), pp. 34-40. ISSN 2321-2187.
173. MICROSCOPE Master. *Aspergillus*. Identification of Common Types, *Niger - Flavus - Fumigatus - Nidulans*. Characteristics and Morphology. What is *Aspergillus*?. In: *Microscope Master* [online]. 2021. [viewed 08 iulie 2023]. Available: <https://www.microscopemaster.com/aspergillus.html>.
174. MOHAMMADI, M., HOSEINI, N.M., CHAICHI, M.R., ALIPOUR, H., DASHTAKI, M. SAFIKHANI, S. Influence of nano-iron oxide and zinc sulfate on physiological characteristics of peppermint. In: *Communications in Soil Science and Plant Analysis*.

- 2018, vol. 49, nr. 18, pp. 2315-2326. [viewed 04.04.2023]. DOI 10.1080/00103624.2018.1499766.
175. MOHAPATRA, M., ANAND, S. Synthesis and applications of nano-structured iron oxides/hydroxides - a review. In: *International Journal of Engineering. Science and Technology*. 2010, vol. 2(8), pp. 127-146.
176. MONGA, M., GOYAL, M., KALRA, K.L., SONI, G. Production and stabilization of amylases from *Aspergillus niger*. In: *Mycosphere*. 2011, pp. 129-134.
177. NAHAS, E., WALDEMARIN, M. Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillus ochraceus*. In: *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2002, vol. 44, nr. 1, pp. 5-10.
178. NIELSEN, J. Modelling the morphology of filamentous microorganisms. In: *Trends in Biotechnology* [online]. 1996, vol. 14(11), pp. 438-443. [viewed 02 iunie 2023]. Available: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10055-X](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10055-X).
179. NIDIALCOVA, N.A., VARBANETS, L.D., SEIFULINA, I.I., SHMATCCOVA, N.V. The effect of stanum (IV) and germanium (IV) coordination compounds on *Bacillus thuringiensis var. israelensis* IMV B-7465 peptidases activity. In: *Biotehnologia acta*. 2015, vol. 8, no 4, pp. 82-91.
180. OTERO-GONZÁLEZ, L. *Fate and Toxicity of Engineered Inorganic Nanoparticles: a dissertation* [online]. 2014. [viewed 27 iulie, 08 septembrie 2023]. Available: <https://repository.arizona.edu/handle/10150/316783>
181. OTERO-GONZALEZ, L. et al. Toxicity of TiO₂, ZnO₂, FeO, Fe₂O₃, and Mn₂O₃ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Chemosphere*. 2013, vol. 93, pp. 1201-1206.
182. PALACIOS, H.R. et al. Effect of α -Amylases from Different Sources on the Retrogradation and Recrystallization of Concentrated Wheat Starch Gels: Relationship to Bread Staling. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, vol. 52 (19), pp. 5978-5986. [viewed 01 iulie 2023]. Available: <https://doi.org/10.1021/jf030377z>.
183. PATIL, S.G., PATIL, B.G. Acceleration of ethanol production activity of yeast in cane molasses fermentation by the addition of fungal mycelium. In: *Enzyme and Microbial Technology*. 1990, vol. 12 (2), pp. 141-149.
184. PEL, H.J., et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. In: *Nature Biotechnology* [online]. 2007, vol. 25, pp. 221-231. [viewed 11.08.2023]. Available: <https://www.nature.com/articles/nbt1282>.

185. PERSON, A.K. et al. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. In: *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2010, vol. 59 (7), pp. 834-838. [viewed 08.07.2023]. DOI 10.1099/jmm.0.018309-0.
186. PETER, C.P., SUZUKI, Y., BUCHS, J. Hydromechanical stress in shake flasks: correlation for the maximum local energy dissipation rate. In: *Biotechnol. Bioeng.* [online]. 2006, vol. 93(6), pp. 1164-1176. [viewed 11.08.2023]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16470882/>.
187. POLAINA, J., MACCABE, A. Industrial enzymes, structure, function and application [online]. Springer, 2007. 633 p. [viewed 11.08.2023]. ISBN 978-1-4020-5377-1. Disponibil: <https://enzimo.files.wordpress.com/2012/09/industrial-enzymes-structure-function-and-applications.pdf>.
188. POSTOLACHI, O., RASTIMESINA, I., JOSAN, V., MAMALIGA, V., STREAPAN, N., GUTUL, T. Impact of magnetite and zero-valent iron nanoparticles on growth of *Streptomyces*. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology*. 4th edition. 2018, p. 154. ISBN 978-9975-3178-8-7.
189. PUNEKAR, N.S. *Enzymes: Catalysis, kinetics and mechanisms* [online]. Singapore: Springer Nature, 2018, vol. 15. [viewed 14.06.2023]. Available: <https://educons.edu.rs/wp-content/uploads/2020/05/2018-ENZYMES-Catalysis-Kinetics-And-Mechanisms.pdf>.
190. RALIYA R., TARAFDAR J. Novel approach for silver nanoparticle synthesis using *Aspergillus terreus* CZR-1: mechanism perspective. *J. Bionanosci.* 2012; 6:12–16.
191. RALIYA, R., PRATIM, B., TARAFDAR, J.C. TiO₂ nanoparticle biosynthesis and its physiological effect on mung bean (*Vigna radiata* L). In: *Biotechnology reports* (Amsterdam, Netherlands). 2014, nr. 5, pp. 22-26. ISSN 2215-017X. 341.
192. ROBICHAUD, C. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. In: *Environmental Science & Technology*. 2009, vol. 43, no. 12, pp. 4227- 4233.
193. REDDY, N.S. et al. An overview of the microbial α -amylase family. In: *Frontiers of Agriculture and Food Technology*. 2019, vol. 9(12), pp. 001-004. ISSN 7295-2849.
194. RUDIC, V., BĂLAN, G., COJOCARI, D. et al. Antibacterial and antifungal properties of algae product BioR. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology* (3rd edition). Chişinău, 2016, pp. 81. ISBN 978-9975-3129-3-6
195. SACHDEV, S., OJHA, S.K., MISHRA, S. *Bacillus spp.* Amylase: production, isolation, characterisation and its application. In: *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology (IJASB)*. 2016, vol. 4(1), pp. 3-14.

196. SAHAYARAJ, K., RAJESH, S. Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. In: A. Méndez-Vilas, ed. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 1st ed. Spain: A. Méndez Vilas, 2011. 244 p.
197. SCHINDLER, R. et al. Simultaneous determination of α -amylase and amyloglucosidase activities using flow injection analysis with fourier transform infrared spectroscopic detection and partial least-squares data treatment. In: *Analytica Chimica Acta* [online]. 1998, vol. 366(1-3), pp. 35-43. [viewed 01.07. 2023]. Available: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00636-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00636-3).
198. SCHRAUZER, G.N., WINDGASSEN, R.J. Cobalamin model compounds. Preparation and reactions of substituted alkyl- and alkenylcobaloximes and biochemical implications. In: *Journal of the American Chemical Society*. 1967, vol. 89(9), pp. 1999-2007.
199. SCHUSTER, E.S. On the safety of *Aspergillus niger*: A review. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2002, vol. 59(4-5), pp. 426-350. [viewed 14.07.2023]. DOI 10.1007/s00253-002-1032-6.
200. SIDDIQI, K.S., RAHMAN, A., HUSEN, A. Properties of zinc oxide nanoparticle and their activity against microbes. In: *Nanoscale Research Letters*. 2018, vol. 13, nr.1, pp. 1-13. ISSN 1556-276X.
201. SINDHU, R. et al. Applications of microbial enzymes in food industry. In: *Food Technology and Biotechnology*. 2018, vol. 56(1), pp. 16-30.
202. SINGH, A., AGRAWAL, A.K., ABIDI, A.B., DARMWAL, N.S. Properties of cellobiase from *Aspergillus niger*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1990, vol. 34, pp. 356-358.
203. SINGH, R., KUMAR, M., MITTAL, A., MEHTA, P.K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. In: *Biotech*. 2016, vol. 6(2), pp. 1-15.
204. STADEN, J.F. van, MULAUDZI, L.V. Flow injection spectrophotometric assay of α -amylase activity. In: *Analytica Chimica Acta* [online]. 2000, vol. 421(1), pp. 19-25. [viewed 02.07.2023]. Available: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01026-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01026-6).
205. STEPHENSON, K., HARWOOD, C.R. Influence of a Cell-Wall-Associated Protease on Production of α -Amylase by *Bacillus subtilis*. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, vol. 64(8), pp. 2875-2881.
206. SUBIN, S.R., BHAR, S.G. Enzymes: concepts, nomenclature, mechanism of action and kinetics, characteristics and sources of food-grade enzymes. In: *Enzymes in food and beverage processing*. 1st ed. CRC Press, 2015, p. 36. [viewed 05.07.2023]. ISBN

9780429157301.

Available:

<https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/b19408-7/enzymes-concepts-nomenclature-mechanism-action-kinetics-characteristics-sources-food-grade-enzymes-raghul-subin-sarita-bhat>.

207. SUMAN, T.Y., RADHIKA, R., KIRUBAGARAN, R. Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles for *Chlorella vulgaris* algae using flow cytometry, cytotoxicity and oxidative stress. In: *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015, no. 113, pp. 23-30. ISSN 0147- 6513.
208. SUNDARAM, P.A. et al. Extracellular biosynthesis of iron oxide nanoparticles by *Bacillus subtilis* strains isolated from rhizosphere soil. In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 2012, vol. 17, pp. 835-840.
209. STENSBERG, M. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. In: *Nanomedicine.* 2011, vol. 6, no. 5, pp. 879-898.
210. TALREJA, N. Engineered Nanoparticles' Toxicity: Environmental Aspects. In: *Nanotechnology in Environmental Science.* 2018, pp. 737-758.
211. TAMBIEV, A.H., KIRIKOVA, N.N. Novel concepts of the causes of EHF-radiation induced stimulating effects. In: *Critical Review of Biomed. Engin.* 2000, vol. 28, no. 5-6, pp. 60-76.
212. THAKUR, S. Bio-Nanotechnology and its Role in Agriculture and Food Industry. In: *Journal of Molecular and Genetic Medicine.* 2018, vol. 12, no. 324, pp. 1747-0862.
213. TRABELSI, S. et al. *Aspergillus oryzae* S2 AmyA amylase expression in *Pichia pastoris*: production, purification and novel properties. In: *Molecular Biology Reports.* 2018, vol. 46(4), pp. 921-932. DOI 10.1007/s11033-018-4548-2.
214. VALUȚA, A., CODREANU, L., CEPOI, L., RUDI, L., CODREANU, S. Metal complexes with different ligands in cultivation of cyanobacterium *Nostoc linckia*. In: *Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community*, Chișinău, 21-22 2019. Chișinău: Tipogr. "Biotehdesign", 2019, pp. 183-184.
215. VARALAKSHMI, K.N. et al. Production and characterization of α -amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 Isolated in Bangalore. In: *Polish Journal of Microbiology* [online]. 2009, vol. 58(1), pp. 29-36. [viewed 04 iulie 2023]. Available: http://www.pjmonline.org/wp-content/uploads/archive/vol_5812009029.pdf.

216. VLAD-OROS, B. et al. Performance of immobilized bacterial alpha-amylases in methyltriethoxysilane/tetraethoxysilane sol-gel matrices. In: *Annals of West University of Timisoara. Series Chemistry*. 2007, vol. 16(2), pp. 261-266.
217. VRIES, R.P., VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. In: *Microbiology and molecular biology reviews*. 2001, vol. 65 (4), pp. 497-522.
218. VRIES, R.P. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, vol. 61, pp. 10-20.
219. USATÎ, A., CHISELIȚA, O., RUDIC, V., CHISELIȚA, N., MOLODOI, E., EFREMOVA, N. The effect of some compounds of Mn (II) and Zn (II) on the biosynthesis of carbohydrates in the biomass of wine yeasts. In: *Analele Universității din Oradea. Fascicula Biologie*". 2010, nr. 17(2), pp. 306-312. CNCSIS B.
220. USATÎ, A., BEȘLIU, A. EFREMOVA, N. Effect of Fe₃O₄ and TiO₂ nanoparticles on catalase activity and β-carotene content at pigmented yeast strain *Rhodotorula gracilis*. In: *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*. 2017, vol. 21, nr. 1, pp. 35-40. ISSN 2344-1496.
221. YEARY, L.W. et al. Magnetic properties of bio-synthesized magnetite nanoparticles. In: *IEEE Transactions on Magnetics*. 2005, vol. 41, pp. 4384-4389.
222. YIM, D.K., PARK, Y., SATO, H., SILVA, E.R. Purification and characterization of extracellular amyloglucosidase from *Candida sp.* and its use for the production of glucomaltose syrup. In: *Revista de Microbiologia*. 1995, vol. 26, pp. 41-45.
223. YU, L., CHAO, Y.P., WENSEL, P. S., CHEN, L. Hydrodynamic and kinetic study of cellulase production by *Trichoderma reesei* with pellet morphology. In: *Biotechnol. Bioeng.* 2012, vol. 109, pp. 1755-1768. [viewed 04.07. 2023]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22252572>.

ANEXE

Anexa 1.

Adeverința de depozitare și pașaportul tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 06

ADEVERINȚĂ DE DEPOZITARE

Deseatinic Alexandra, Condruș Viorica, Tiurin Janetta, Labluc Svetlana.
(numele, prenumele)

Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a R.M.
(denumirea organizației)

str. Academiei, 1, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova
(adresa depozitorului)

Microorganismul *Aspergillus niger* 33 posedă
o înaltă capacitate de biosinteză a enzimelor amilolitice.

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii depozitate de către
Colecția: CNMN FD 06 A
Data depozitării: 20.07.2004

Denumirea și adresa colecției: COLECȚIA NAȚIONALĂ DE MICROORGANISME
NEPATOGENE a Republicii Moldova, str. Academiei, 1, MD-2028, Chișinău, Republica
Moldova.

Director a CNMN a R. M. dr. în biol. S. Codreanu



PAȘAPORTUL TULPINII MICROORGANISMULUI

Cifru atribuit de către
Colecția Națională de Microorganisme
Neapatogene (CNMN): CNMN FD 06A

Data depunerii în CNMN

20 iulie 2004

- 1. Denumirea de specie a tulpinii:** *Aspergillus niger* (V. Tiegh, Rapet, Fenell).
- 2. Denumirea atribuită tulpinii de către depozitar:** *Aspergillus niger* 33.
- 3. Autorii:** Deseatinic Alexandra, Condruș Viorica, Tiurin Janetta, Labluc Svetlana.
- 4. Originea tulpinii:** Tulpina a fost primită de la Institutul Tehnologie de Cercetări Științifice a Antibioticeilor (or. Sanct-Petersburg) după testarea negativ ca producător de antibiotice cu numărul 33 (Каталог культур микроорганизмов, подлежащих в учреждениях СССР. Наука; 1981 с. 110).
- 5. Particularitățile morfologo-culturale ale tulpinii:** Colonii albe-cenușii cu dimensiunile de 5-6 cm. În diametru, netede sau pufoase, sporilează abundent, d pe mediu de must de malț. Odată cu formarea conidioforilor cu conidii coloniiile capătă o culoare cenușie-închisă având o suprafață uniformă catifelată. După 5 zile de cultivare bordura coloniei este de culoare albă, rar cu nuanță gălbuie. Reversul este de culoare galben-cafenie cu striuri radiale. Pe mediu agarizat Czapek formează colonii limitate de 2,5 - 3,5 cm. Miceliul de substrat este compact, alb sau galben-pal, submers sau distribuit pe suprafața mediului, sub aspect de substrat afinat. Capetele conidioforilor sînt negre, conglomerate, inițial centrate apoi radiale, la maturizare se risipesc în câteva septuri afinate dar bine conturate de 700-800 mkm. Înălțimea conidioforilor variază între 1,5-3,0 mm, lățimea 1,5-2,0 mm cu membrane netede, groase cu nuanță cafenie, scufundat în strat spongios, măciulile conidiale sînt concentrate în centrul coloniei divizându-se în câteva colonii spongioase bine conturate. Conidioforii incolori sau cafenii în partea superioară, lipsește exsudat, miros tipic de mușeșug.
Identificarea tulpinii s-a făcut în conformitate cu Билал В. И., Кональ Э. Э., «Аспергиллы» определитель. Киев: Наукова Думка, 1988. с.203.
- 6. Proprietățile fiziologo-biochimice:** Tulpina crește și se dezvoltă bine pe mediu cu compoziția (g/l) făină de fasole - 9,0; amidon - 3,0; tărțe de grâu - 18,0; MgSO₄ - 0,5; KH₂PO₄ - 2,0; KCl - 0,5; apă de robinet până la 1 litru, pH-ul inițial -5,0. Temperatura optimă de creștere și biosinteză - 28-30°C. La temperatura 14-15°C tulpina nu crește. *Aspergillus niger* reglează efectiv aciditatea mediului submers prin utilizarea anumitor cationi cît și prin eliminarea metabolitelor care influențează valoarea pH-ului variind de la 3,62 pînă la 7,2. Fungul asimilează amidonul și derivatele lui.

- 3. Originalitatea tulpinii:** Tulpina *Aspergillus niger* 33 sintetizează complexul amilolitic cu capacitatea de a hidroliza substratul bogat în amidon în condiții moderate de aciditate (pH 4,7) cît și puternic acide (pH 2,5), posedând acid-stabilitatea caracteristică aspergilorilor negri.
- 4. Denumirea cererii:** Tulpina de fung *Aspergillus niger* 33 - sursă de enzime amilolitice.
- 5. Metoda, condițiile și componența mediilor pentru păstrarea îndelungată a tulpinii:** Cultura se păstrează pe medii înclinate de malț (7B) la temperatura de +4 - 5°C. Pasajele se efectuează prin porțiuni de miceliu cu conidii, odată la 2 luni. Creșterea în termostate la temperatura +30°C timp de 10-14 zile.
- 6. Metoda, condițiile și componența mediilor pentru fermentare:** Cultivarea submersă în baloane Erlenmayer de 0,75 litri, cu 0,2 litri mediu nutritiv compoziția optimă (p. 6); apă de robinet până la 1 litru, pH-ul inițial -5,0. Cultivarea se efectuează timp de 144 ore la temperatura de 30°C în condiții de agitare continuă (180 rot/min).
- 7. Condițiile de verificare a vitalității tulpinii:** Mediul nutritiv, condițiile indicate în punctul 9.
- 8. Informații despre prezența proprietăților patogene:** Cultura nu este patogenă.

Depozitarii-autori:

Deseatinic Alexandra A. Deseatinic
Condruș Viorica V. Condruș
Tiurin Janetta J. Tiurin
Labluc Svetlana S. Labluc


Organizația-depozitar: Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Republicii Moldova MD-2028, Chișinău, str. Academiei. Tel./fax: 72-53-06

Director al CNMN al R.M. dr. în biol. S. Codreanu
Colecția confirmă faptul că pașaportul de față a fost obținut la 20.07. 2004
Reprezentantul Colecției S. Codreanu






 p 34 MD 2836 G2 2005.08.31

REPUBLICA MOLDOVA


(19) Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală (11) **2836** (13) **G2**
 (51) Int. Cl. Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/685 (2006.01)
C12N 9/30 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2004 0226 (22) Data depozit: 2004.09.16	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2005.08.31, BOPI nr. 8/2005
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: DESEATNIC Alexandra, MD; CONDRUC Vioreca, MD; BOLOGA Olga, MD; TIURIN Jana, MD; GĂRBĂLĂU Nicolae, MD; LABLIUC Svetlana, MD; STRATAN Maria, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	
(54) Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi <i>Aspergillus niger</i> 33 CNMN FD 06a	
(57) Rezumat: 1 Invenția se referă la biotehologie, în particular la un mediu de cultură a tulpinii de fungi <i>Aspergillus niger</i> 33 CNMN FD 06a și poate fi aplicată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor amilolitice. 5 Mediu nutritiv, conform invenției, conține, g/L: amidon 3,0, făină de fasole 9,0, tirăte de grâu 18,0, KH ₂ PO ₄ 2,0, KCl 0,5, MgSO ₄ 0,5 și [Co(DH ₂ bio)]BF ₄ ·3H ₂ O 0,005..0,040, având pH-ul inițial 5,0. 10 Rezultatul constă în sporirea activității amilolitice și în reducerea duratei de cultură a tulpinii. Revendicări: 1	



MD 2833 G2 2005.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **2833** (13) **G2**
(51) Int. Cl.: *C07F 15/06* (2006.01)
C07C 251/70 (2006.01); *C01B 7/19* (2006.01)
C01B 25/00 (2006.01); *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 9/30 (2006.01); *C12N 9/42* (2006.01)
C12R 1/685 (2006.01); *C12R 1/80* (2006.01)
C12R 1/845 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2004 0152 (22) Data depozit: 2004.06.21	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2005.08.31, BOPi nr. 8/2005
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: GĂRBĂLĂU Nicolae, MD; SIMONOV Yurie, MD; BOUROȘ Paulina, MD; DESEATNIC Alexandra, MD; BOLOGA Olga, MD; COROPCEANU Eduard, MD; CONDRUC Viorica, MD; CLAPCO Steliana, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Fluorură de hexafluorofosfat-bis[di(tiocarbamid)bis(dimetilgloximato) cobalt(III)], care posedă proprietăți de stimulator al creșterii microorganismelor

(57) Rezumat:

1 Invenția se referă la o clasă de compuși coordinați pe bază de cobalt și dimetilgloximă, care pot să-și găsească aplicare în calitate de stimulatori și catalizatori în diferite procese biotehnologice și chimice.

2

5 legături chimice și interacțiuni nevalente, precum și o poziționare a liganzilor, care permite introducerea într-un singur compus chimic individual a trei microelemente - Co, P și F, necesare pentru dezvoltarea unor microorganisme, în particular a tulpinilor de micomicete din genurile *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

10 Revendicări: 1
Figuri: 4

15 Analiza roentgenostrucurală a acestui compus a relevat o îmbinare neobișnuită a diferitelor tipuri de

MD 2833 G2 2005.08.31

COPIE

F-01-BI-02
STATE AGENCY ON INTELLECTUAL PROPERTY OF THE REPUBLIC OF MOLDOVA
PATENTS DIRECTORATE

AGPI
IDNO 1015601000112

DIRECȚIA BREVETE

nr. 16675
din 2022.12.21

JOVMIR Tudor, Institutul de Chimie
str. Academiei nr. 3,
MD-2028, Chișinău, Republica Moldova

BOP1 2/2023
28 febr. Bz. MD 4847 comp. Ba - Yentind...

HOTĂRÂRE
nr. 10182 din 2022.12.21

În urma examinării dosarului cererii de brevet de invenție:

(21) nr. depozit: a 2021 0059
(22) data depozit: 2021.09.09
(54) titlu: **Tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di-μ-(izotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II) cu proprietăți de stimulatori biologici activi la fungi**

și în temeiul art. 51(7) din Legea nr. 50/2008 privind protecția invențiilor, Direcția Examinare

HOTĂRÂȘTE

Acordarea brevetului de invenție conținând următoarele date:

(13) B1
(51) Int.Cl: **C07F 3/00** (2006.01) **C12N 1/38** (2006.01)
 C07F 15/06 (2006.01) **C12N 9/26** (2006.01)
 C07D 213/79 (2006.01) **C12R 1/645** (2006.01)
 A01G 18/20 (2018.01) **C12R 1/685** (2006.01)
 C12N 1/14 (2006.01)

(21) a 2021 0059
(22) 2021.09.09
(71)(73) INSTITUTUL DE CHIMIE, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ, MD;
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD
(72) BULHAC Ion, MD; URECHE Dumitru, MD; BOUROȘ Pavlina, MD
MD; CILOCI Alexandra, MD; CONDRUC Viorica, MD; DVORNINA Elena
(74) JOVMIR Tudor
(54) **Tris(2,6-dimetil piridindicarboxilat-1kONO)-di-μ-(izotiocianato-2kN)bariu(II)cobalt(II) cu proprietăți de stimulatori biologici activi la fungi**

(57) Rezumat: Invenția se referă la chimia coordinativă, în special la un complex heterodinuclear de Ba-Co cu proprietăți de stimulator al sintezei principiilor

Str. Andrei Doga nr. 24/1, MD-2024, Chișinău, Republica Moldova
Tel: (+373-22) 400-511, (+373-22) 400-514 Fax: (+373-22) 440-119
www.agepi.gov.md, e-mail: office@agepi.gov.md

24/1 Andrei Doga str. MD-2024,
Tel: (+373-22) 400-511, (+373-22) 400-514
www.agepi.gov.md, e-mail: office@agepi.gov.md

Societatea pe Acțiuni
Combinatul de Panificație din Chișinău
"FRANZELUȚA"

2032, Republica Moldova, Chișinău
str. Sarmizegetusa, 30
Fax: (+37322) 52-81-65, tel.: 55-14-45
C/d 222400008100688 la BCA "Victoriabank"
filiala nr. 8, or. Chișinău, IDNO: VICBMD2X802
Codul fiscal 1002600004030; Cod TVA 0300331
marketing@franzeluța.md www.franzeluța.md



Акционерное общество
Кишиневский Хлебокомбинат
"FRANZELUȚA"

2032, Республика Молдова, г. Кишинев,
ул. Сармизежгетуса, 30
Факс: (+37322) 52-81-65, тел.: 55-14-45
ф/с 222400008100688, в АКБ "Victoriabank"
филиал № 8, г. Кишинев, IDNO: VICBMD2X802
Фиск. код 1002600004030; Код НДС 0300331
marketing@franzeluța.md www.franzeluța.md

la nr. 12-03/27 de la _____
Nr. 12-03/27 de la 11.05.2010

Directorului Institutului de
Microbiologie
și Biotehnologie al AȘM
D-lui V. Rudic

Stimate Domn Director!

Prin prezenta, Vă aducem la cunoștință rezultatele testării în tehnologia de
panificație a preparatului enzimatic amilolitic de origine microbiană α -amilaza.
Raportul despre efectuarea lucrărilor se anexează.

Cu respect
Directorul general

E. Baleca

Material (proba)	Proba nr. 1 10-20002	Proba nr. 2	Proba nr. 3
Pâinea de pâine pentru panificație	1000 g	1000 g	1000 g
Leaven (preparat enzimatic)	10 g	10 g	10 g
Sare	10 g	10 g	10 g
Apă	270 g	270 g	270 g
Alte ingrediente	-	1000 g	1000 g

OK: off

APROB:
Șef Laborator central de încercări
S.A. „Combinatul de Panificație
din Chișinău „Franzeluța”
O. Niculica
„11” mai 2010

ACT

privind testarea preparatului enzimatic amilolitic de origine microbiană α -amilaza în
tehnologia coacerii pâinii.



AGENCIA DE STAT PENTRU PROPRIETATEA INTELLECTUALA
A REPUBLICII MOLDOVA

Diplomă

Medalia de Bronz

Se acordă

*Deseatnic A., Tiurin J., Labliuc S., Clapco S., Paşa L., Sârbu T.,
Condruş V., Lazarescu A., Stratan M.*

pentru

*Tulpini de fungi cu însuşiri tehnologice înalte –
producători de enzime hidrolitice*



EXPOZIȚIA
INTERNATIONALA
SPECIALIZATĂ



2004

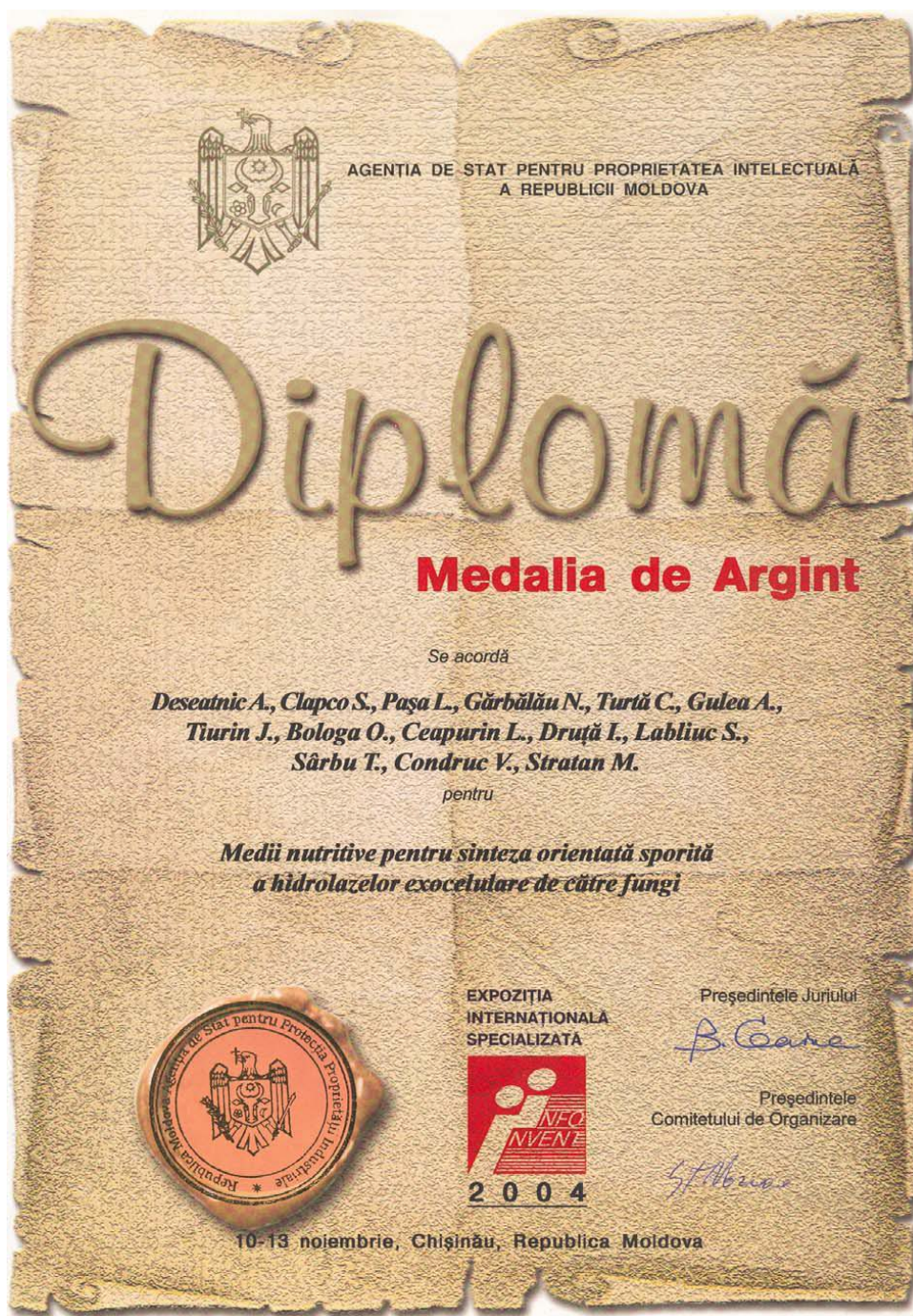
Preşedintele Juriului

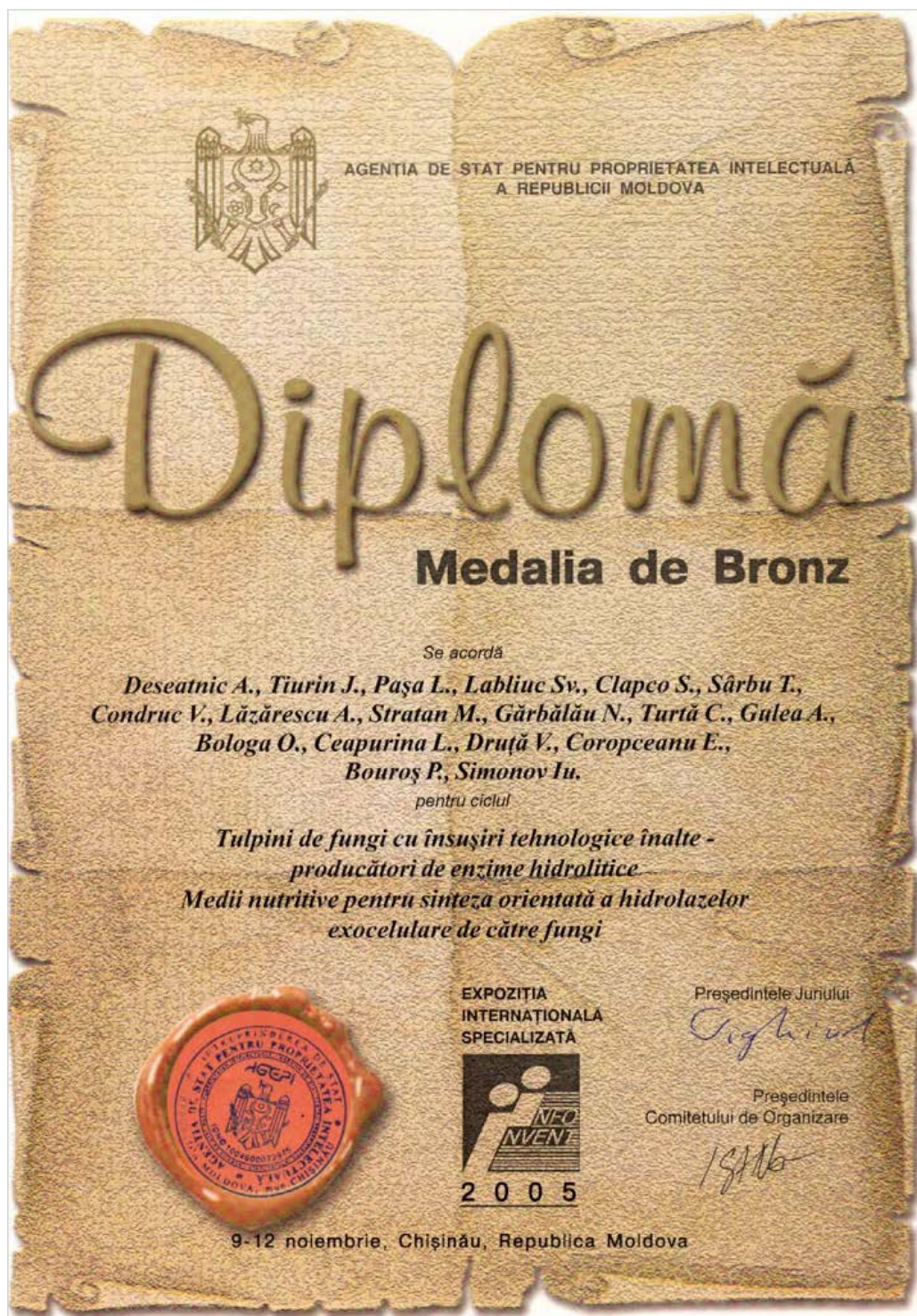
P. Coşca

Preşedintele
Comitetului de Organizare

St. Al. ...

10-13 noiembrie, Chişinău, Republica Moldova







МІЖНАРОДНИЙ САЛОН ВІНАХОДІВ
ТА НОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ «НОВИЙ ЧАС»
«Сталий розвиток під час змін»



ДИПЛОМ

НАГОРОДЖУЄТЬСЯ

ЗОЛОТОЮ МЕДАЛЛЮ

А. Десятник, В. Рудик, С. Клапко, Л. Паша,
Ж. Тюрина, Н. Гербэлэу, К. Туртэ, А. Гуля, О.Болога,
Э. Коробчану, Л. Чапурипа, В. Друцэ, С. Лаблюк,
Т. Сырбу, В. Кондрук, М. Стратан, А. Лэзэреску
(Кишинэу, Молдова)

за разработку

**ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ
ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО СИНТЕЗА
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ГИДРОЛАЗ
МИКРОМИЦЕТАМИ**

Президент
Міжнародного журі

професор Пьер Фюмьер
(Бельгия)

Голова
Нагородної комісії

професор Василь Гоч
(Україна)

г. Севастополь
27-29 сентября 2006 г.



SOCIETATEA INVENTATORILOR DIN ROMÂNIA

Diploma de participare

Se acorda Dlui./Dnei.

**DESEATNIC ALEXANDRA, CLAPCO STELIANA, PAȘA LILIA,
TIURINA JANETTA, LABLIUC SVETLANA, STRATAN MARIA,
CONDRUC VIORICA, GHIȚU DUMITRU**

Pentru inventia prezentata in cadrul salonului.

**Salonul International al Inventiilor, Cercetării Științifice
și Transferului Tehnologic
ediția a-XIII-a
ECOINVENT 2007**

30 mai- 2 iunie 2007, Iași Romania

SOCIETATEA INVENTATORILOR DIN ROMÂNIA
Prof. univ. dr. ing.fiz. Constantin Marin Antohi





CAMERA DE COMERȚ ȘI INDUSTRIE CLUJ
EXPO TRANSILVANIA S.A. CLUJ-NAPOCA
UNIVERSITATEA TEHNICĂ CLUJ-NAPOCA
FORUMUL INVENTATORILOR ROMÂNI
SOCIETATEA INVENTATORILOR DIN ROMÂNIA
sub egida MINISTERULUI EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII - A.N.C.D.
ACADEMIA DE ȘTIINȚE TEHNICE DIN ROMÂNIA, FILIALA CLUJ

**SALONUL NAȚIONAL DE INVENTICĂ
PRO INVENT** ediția a V-a, 2007, Cluj-Napoca

DIPLOMA

DE EXCELENȚĂ și medalia de bronz

Se acordă D-nei / D-ului **Deseatnic-Ciloci Alexandra, Clapco Steliana, Pața Lilia,
Tiurin Janetta, Labliuc Svetlana, Condruș Viorica, Stratan Maria Ghițu Dumitru**
pentru **PROCEDEE DE SPORIRE A ACTIVITĂȚII ENZIMATICE A MICROMICETELOR
CU APLICAREA RADIAȚIEI ELECTROMAGNETICE ÎN DIAPAZON MILIMETRIC**



CAMERA DE COMERȚ ȘI INDUSTRIE CLUJ
EXPO TRANSILVANIA S.A. CLUJ-NAPOCA
UNIVERSITATEA TEHNICĂ CLUJ-NAPOCA
FORUMUL INVENTATORILOR ROMÂNI
SOCIETATEA INVENTATORILOR DIN ROMÂNIA
sub egida MINISTERULUI EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII - A.N.C.D.
ACADEMIA DE ȘTIINȚE TEHNICE DIN ROMÂNIA, FILIALA CLUJ

**SALONUL NAȚIONAL DE INVENTICĂ
PRO INVENT** ediția a V-a, 2007, Cluj-Napoca

DIPLOMA

DE EXCELENȚĂ și medalie de EXCELENȚĂ

Se acordă D-nei / D-ului **Deseatnic-Ciloci Alexandra, Clapeo Steliana, Pața Lilia, Tiurin Janetta, Labliuc Svetlana, Condruș Viorica, Stratan Maria Ghițu Dumitru.**
pentru **PROCEDEE DE SPORIRE A ACTIVITĂȚII ENZIMATICE A MICROMICETELOR
CU APLICAREA RADIAȚIEI ELECTROMAGNETICE ÎN DIAPAZON MILIMETRIC**

PREȘEDINTELE JURIULUI
Prof. Univ. Dr.
RADU MUNTEANU
Rectorul Universității Tehnice Cluj

Ing.
IOAN AVRAM
Director General Executiv
EXPO-TRANSILVANIA





AGENTIA DE STAT PENTRU PROPRIETATEA INTELECTUALA
A REPUBLICII MOLDOVA

Diplomă

DE MENȚIUNE

Se acordă

*Deseatnic Alexandra, Tiurina Janetta, Labliuc Svetlana,
Clapeo Steliana, Pașa Lilia, Condruș Viorica, Stratan Maria,
Șirbu Tamara*

pentru

*Tehnologii perfecționate de obținere a preparatelor enzimatică
cu acțiune hidrolitică de origine microbiană*



EXPOZITIA
INTERNATIIONALĂ
SPECIALIZATA



2007

Președintele Juriului

Președintele
Comitetului de Organizare

27-30 iunie, Chișinău, Republica Moldova



AGENCIA DE STAT PENTRU PROPRIETATEA INTELECTUALA
A REPUBLICII MOLDOVA

Diplomă

Medalia de Bronz

se acordă

Deseatnic Alexandra, Stratan Maria, Tiurin Janeta, Bologa Olga, Clapco Steliana,
Coropceanu Eduard, Labliuc Svetlana, Rija Andrei, Condruce Viorica, Rudic Valeriu,
Bulhac Ion, Usafii Agafia, Topala Lilia, Molodoi Elena, Moldoveanu Taisia

pentru ciclul

Medii nutritive pentru sporirea activității amilolitice
a unor tulpini de micromicete din genul *Aspergillus*

Tehnologie de obținere a preparatelor sterolice din drojdii

EXPOZIȚIA
INTERNACIONALĂ
SPECIALIZATĂ



2009

Președintele Juriului



24-27 noiembrie, Chișinău, Republica Moldova



DIPL^{OM}MA



Awarded to
Deseatnic-Ciloci A., Stratan M., Tiurina J., Labliuc S., Clapco S.,
for Rudic V., Bologa O., Coropceanu E., Rija A., Codruc V.,
Gărbălău N., Ceapurin L., Bulhac I., Sîrbu T.
Tehnologii perfecționate de obținere a preparatelor enzimatiche

GOLD MEDAL

President of International Jury
Dan CASCAVAL

President of Exhibition
Prof. Ion SANDII



VII МЕЖДУНАРОДНЫЙ САЛОН
ИЗОБРЕТЕНИЙ И НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
«НОВОЕ ВРЕМЯ»

«Устойчивое развитие во время перемен»



ДИПЛОМ
ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЬЮ
НАГРАЖДАЕТСЯ

**А. Десятник-Чилочи, М. Стратан, Ж. Тюрина,
О. Болога, С. Клапко, Э. Коропчану, С. Лаблюк,
А. Рижя, В. Кондрук, В. Рудик, И. Булхак
(г. Кишинэу, Молдова)**

за разработку

**ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ
ШТАММОВ ГРИБОВ МИКРОМИЦЕТОВ**

Президент
Международного жюри

профессор Пьер Фюмьер
(Бельгия)

Почетный
Президент Салона

профессор А. Онипко
(Украина)

Председатель
Наградной комиссии

профессор В.П. Гоч
(Украина)

**г. Севастополь
22-24 сентября 2011 г.**



INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE – DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI PETROCHIMIE -
ICECHIM - BUCUREȘTI

DIPLOMA DE EXCELENȚA

Se acordă *Deseatnic - Ciloci A., Tiurina J., Clapco S., Bobga O., Corpocianu E.,*
pentru invenția *Bivol.C., Stratian M., Condruș V., Labluc S., Rijo A., Dornina E.,*
Răduț V., Buihac I.
"Nutrient media and methods for enhancement and stabilization of
enzymatic activity of mycelial fungal strains, producers of extracellular
hidrolases."
prezentată în cadrul
5th EUROPEAN EXHIBITION OF CREATIVITY AND INNOVATION, 9 - 11 May 2013, IASI - Romania

Director General ICECHIM
Dr. Ing. SANDA VELEA





IAȘI - ROMÂNIA



DIPL^{EURO INVENT}OMA

NUTRIENT MEDIA AND METHODS FOR ENHANCEMENT AND STABILIZATION OF ENZYMATIC ACTIVITY OF MYCELIAL FUNGAL STRAINS, PRODUCERS OF EXOCELLULAR HYDROLASES
DESEATNIC-CILOCI ALEXANDRA, TIURINA JANETTA, CLAPCO STELIANA, BOLOGA OLGA, COROPCEANU EDUARD, BIVOL CEZARA, STRATAN MARIA, CONDRUC VIORICA, LABLIUC SVETLANA, RIJA ANDREI, DVORNINA ELENA, RUDIC VALERIU, BULHAC ION.

GOLD MEDAL





President of International Jury
Prof. Adrian GRAUR


President of Exhibition
Prof. Ion SANDU



SALONUL INTERNAȚIONAL DE
**INVENȚII
INOVAȚII**
„TRAIAN VUIA” TIMIȘOARA



Diplomă


SE ACORDĂ  MEDALIA
DE ARGINT

pentru invenția
TRIS(2,6-DIMETHYL PYRIDINECARBOXYLATE-1KONO)-DI-M-
(ISOTHIOCYANATO-1,2KN)-
(DIISOTHIOCYANATO-2KN)BARIUM(II)COBALT(II) WITH
BIOSTIMULATORY PROPERTIES OF THE SYNTHESIS OF BIOACTIVE
PRINCIPLES ON FUNGI


autori
**Bulhac Ion, Ureche Dumitru, Bourosh Pavlina, Cocu Maria, Ciloci
Alexandra, Condruc Viorica, Dvornina Elena**

instituția
INSTITUTE OF CHEMISTRY, REPUBLIC OF MOLDOVA; INSTITUTE OF
APPLIED PHYSICS, REPUBLIC OF MOLDOVA; INSTITUTE OF
MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, REPUBLIC OF MOLDOVA


Președinte juriu
Prof. dr. habil. **Narcisa MEDERLE**



Președinte salon
Remi RĂDULESCU



Data 10 octombrie 2022





170
1852 - 2022



Universitatea de Științe Agronomice și
Medicină Veterinară din București

ACORDĂ

Diploma de Excelență

*Bulhac Ion, Ureche Dumitru, Baroșu Paulina, Coșu Maria,
Ciloci Alexandra, Condruș Viorela, Dvorina Elena*

PENTRU

*Tris(2,6-dimethyl pyridinecarboxylate-1K-ON)-di-μ-(isothio-
cyanato-1,2K-N)-(diisothiocyanato-2K-N)barium(II)cobalt(II) with
biostimulatory properties of the synthesis of
bioactive principles on fungi*

10/10/2022



Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Condruș Viorica

11.09.2024

CV-ul autorului

Numele de familie și prenumele: Condruc Viorica

Data și locul nașterii: 04 august 1970, s. Bădiceni, r-nul Soroca

Cetățenia: Republica Moldova

Studii:

2015 - 2018 Academia de Administrare Publică, facultatea Economie și Management, titlul Master în Management public;

1987 - 1992 Universitatea de Stat din Moldova, facultatea Biologie și pedologie, specialitatea Pedologie;

1977 - 1987 Școala medie, satul Bădiceni, r-nul Soroca.

Activitatea profesională:

2021 - prezent Consultant principal, Direcția Cadrul national al calificărilor, Ministerul Educației și Cercetării
Cercetător științific, Laboratorul Biotehnologia fungilor, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei, (cumul)

1997 - 2013 Cercetător științific stagiar, Laboratorul Enzimologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

1994 - 1997 Doctorand, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

Domeniile de activitate științifică: Microbiologia și biotehnologia fungilor microscopici producători de enzyme lipolitice. Activitatea științifică cuprinde cercetări de screening, de ameliorare a capacității biosintetice a micromicetelor potențiali producători de enzime hidrolitice, elaborarea unor procedee și tehnologii avansate de cultivare dirijată a producătorilor, folosind în calitate de factori stimulatori și reglatori radiația electromagnetică în diapazon milimetric, compușii coordinativi ai metalelor și nanocompozitelor.

Participări la foruri științifice internaționale: Congresul al XXII-lea al Academiei Româno-Americane de Știință și Arte (ARA), (1997), Conferința a XXVIII-a Națională de Chimie (România, 2004), Международная научная конференция ОНУ им. И.И. Мечникова (Одесса, 2005), Romanian International Conference on chemistry and chemical engineering XIV (2005), Юбилейная конференция по микологии и микробиологии (Москва, 2023).

Lucrări științifice publicate: 29 de lucrări științifice: 18 articole, 11 teze și rezumate ale comunicărilor științifice, 3 brevete de invenție.

Participări la Expoziții Specializate și Saloane Internaționale de Invenții: Saloanele internaționale de invenții: „ECOINVENT” (Iași, România, 2003, Chișinău, 2005), „INFOINVENT” (Chișinău, 2004-2005, 2007, 2009), „INVENTICA” (Iași, 2003, 2006), „ECOINVENT” (Iași, 2007, 2010), „PROINVENT” (Cluj-Napoca, 2007, 2010), „EUROINVENT” (2009, 2010, 2013), Международный салон изобретений и новых технологий «НОВОЕ ВРЕМЯ» (2011), 5th EUROPEAN EXHIBITION OF CREATIVITY AND INIVATION (Iași, 2013), Salonul Internațional de INVENȚII INOVAȚII „Traian Vuia” (Timișoara, 2022).

Participări în proiecte științifice naționale și internaționale: Proiectul 20.80009.5007.28 *Elaborarea noilor materiale multifuncționale și tehnologii eficiente pentru agricultură, medicină, tehnică și sistemul educational în baza complexilor metalelor „s” și „d” cu liganzi polidentati* (2020-2023), conducător proiect: dr. hab. Bulhac Ion, Compartimentul: Tehnologii inovative de obținere a preparatelor enzimatic microbiene cu proprietăți avansate pentru aplicare în medicină, industria farmaceutică, alimentară, agricultură (2020-2023), responsabil: Cîlci Alexandra, dr. în biologie, conf. cercet.

Premii și mențiuni:

2022 - Diplomă de Excelență, Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București

2022 - Medalia de Argint, Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia” Timișoara, România

2013 - Medalia de aur, Expoziția Europeană a Creativității și Inovării, Iași România

2013 - Diplomă de Excelență, 5th European Exhibition of Creativity and Innovation, Iași România

2011 - Medalia de aur, VII Международный Салон Изобретений и новых технологий „Новое время”, Севастопол, Россия

2007 - Medalie de argint - Salonul Național de Invenții „PRO INVENT 2007”, România, Cluj-Napoca

2006 - Medalie de aur - Salonul Internațional de Invenții și Transfer Technologic ECOINVENT, România, Iași

Medalie de aur - Expoziția Internațională “New Time 2006”, Sevastopol, Ucraina

Medalie de argint - Expoziție Internațională “New Time 2006”, Sevastopol, Ucraina

2005 - Medalie de bronz - Salonul Internațional de Invenții INFOINVENT, Chișinău, Moldova

2004 - Medalie de argint - Salonul Internațional de Invenții INFOINVENT, Chișinău, Moldova

Medalie de bronz - Salonul Internațional de Invenții INFOINVENT, Chișinău, Moldova.

Date de contact: Chișinău, str. Academiei, 1, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei, MD-2028, Republica Moldova, 069499674, viocondruc@gmail.com