

SINTEZA ORIENTATĂ A PROTEAZELOR LA MICROMICETA *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 SUB INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI Ba(II), Sr(II), Ca(II) cu Co(II) ȘI LIGAND POLIDENTAT
DIRECTED SYNTHESIS OF PROTEASES IN THE MICROMYCETE *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 UNDER THE INFLUENCE OF COORDINATION COMPOUNDS OF Ba(II), Sr(II), Ca(II) with Co(II) AND POLYDENTATE LIGAND

Ciloci Alexandra, *doctor, conferențiar cercetător*, Clapco Steliana, *doctor, conferențiar cercetător*, Condruș Viorica, Labluc Svetlana, Dvornina Elena, *UTM*, Ureche Dumitru, *doctorand, USM*, Bulhac Ion, *doctor habilitat, UTM*.

The effect of the heterometallic coordination compounds of Ba(II), Sr(II), Ca(II) with Co(II) and polydentate ligand on the synthesis of proteases in the micromycete *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 was evaluated. Based on the research results, it was found that the heterometallic coordination compounds of Ba(II) and Sr(II) with Co(II), as well as

the ligand 2,6-dicarbonylpyridine dichloride are of interest as potential stimulators of alkaline proteases in the micromycete *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12. The heterometallic coordination compound of Ba(II) with Co(II) - $[\text{Ba}(\text{L})_3-\mu(\text{NCS})_2\text{-Co}(\text{NCS})_2]$ in concentration of 5 and 10 mg/l, ensures the increasing of the alkaline proteases activity on the 4th day of cultivation by 25.7 and 35.8% compared to the control from the same day or by 6.2% and 14.7% compared to the control from the 5th day (the maximum of the control variant). In the case of the heterometallic coordination compound of Sr(II) with Co(II) the activity of alkaline proteases on the 5th day of cultivation was higher than in the control by 83.7% (5 mg/l); 62.8% (10 mg/l) and 44.2% (15 mg/l).

Key-words: proteases, heterometallic coordination compounds, *Fusarium gibbosum*, fungi.

INTRODUCERE

Proteazele aparțin unui grup de hidrolaze care catalizează hidroliza legăturii peptidice în proteine. După pH-ul de acțiune proteazele sunt divizate în proteaze acide, neutre și alcaline. Acestea pot fi produse din diferite surse, cum ar fi bacteriile, funghi, plantele, animalele. Ele au aplicații vaste în numeroase domenii, inclusiv industria alimentară, de prelucrare a pieilor, de producere a detergenților, textilă, farmaceutică, diagnostică și la tratarea deșeurilor [2, 9].

Genurile fungice *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus* și altele sunt considerate surse potențiale de enzime exocelulare și sunt frecvent utilizate pentru producerea de proteaze prin fermentație imersată sau fermentație în strat solid. În scopul optimizării producerii de proteaze au fost cercetate diverse tulpini din genul *Aspergillus*: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* [6-8].

Micromicetele pot produce o gamă largă de enzime proteolitice, active într-un interval larg de pH (4-11), ceea ce este un avantaj biotehnologic important. Investigarea unor noi specii de micromicete producătoare de proteaze și optimizarea condițiilor de cultivare rămâne în atenția multor cercetători la nivel mondial.

În vederea sporirii productivității proteazelor microbiene pe parcursul ultimilor decenii intens se studiază influența compușilor coordinativi asupra randamentului și activității proteazelor exocelulare la micromicete. În cercetările anterioare de evaluare a efectului compusului coordinativ al Cu(II) cu tiosemicarbazona - $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})\text{Cl}]$ s-a înregistrat o sporire semnificativă a biosintezei proteazelor acide și neutre la tulpina de micromicete *Trichoderma koningii* Oudem. CNMN FD 01 [3].

În rezultatul cercetărilor de evaluare a efectului metalocomplexului $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{Thio})_2]_2\text{F}[\text{PF}_6]$ în calitate de adaos în mediul nutritiv pentru tulpina de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 s-a constatat sporirea biosintezei proteazelor neutre cu 56.36–58.92% și reducerea duratei de cultivare a producătorului cu 24 de ore față de proba de referință, cu păstrarea nivelului de activitate a celorlalte componente enzimatică ale complexului (proteaze acide, xilanaze, β -glucozidaze) sintetizat de tulpina-producător [4, 5].

Crearea condițiilor optime de creștere a tulpinilor și utilizarea unor stimulatori chimici pot asigura o sinteză sporită a proteazelor. În acest context, prezintă interes studiul influenței unor compuși coordinativi heterometalici noi ai Ba(II), Sr(II) și Ca(II) cu Co(II) și ligand polidentat asupra sintezei proteazelor la micromiceta *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12.

MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Obiect de cercetare a servit tulpina de micromicete *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, depozitată în *Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie*, Republica Moldova. În calitate de biostimulatori ai biosintezei proteazelor au fost utilizați compușii coordinativi heterometalici ai Ba(II), Sr(II) și Ca(II) cu Co(II) și ligand polidentat 2,6-dicarbonilpiridin diclorură.

Pentru cultivarea *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 s-a utilizat mediul nutritiv cu următoarea compoziție (g): tărâțe de grâu – 20,0; faină de soia – 10,0; CaCO_3 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; restul apă potabilă până la 1 L, pH – 6,25. În calitate de material de inoculare a servit suspensia de spori cu densitatea $2,5 \times 10^6$ spori/ml, obținută prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturilor de 12 zile, crescute pe coloane oblice de malț-agar. Concentrația inoculului a constituit 10% V/V mediu nutritiv. În variantele experimentale mediile de bază au fost suplimentate cu compușii coordinativi menționați în concentrații de 5,0, 10,0 și 15,0 mg/L. Compușii coordinativi s-au adăugat la mediul nutritiv steril concomitent cu materialul semincer. În calitate de martor a servit mediul nutritiv fără compuși coordinativi

Activitatea proteazelor în lichidul cultural rezultat la cultivarea clasică și dirijată a micromicetei *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 s-a determinat conform metodei Anson modificată [1], folosind în calitate de substrat cazeinat de sodiu pentru proteaze neutre (pH 7,4) și alcaline (9,0), precum și gelatina pentru

proteaze acide (pH 3,6). Ca unitate de activitate enzimatică (U/mL) a fost considerată cantitatea de enzimă care timp de 1 minut la 30°C transformă proteinele din substrat în peptide corespunzătoare la 1 μM Tyr (1 μM Tyr = 0,181 mg).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În vederea identificării de noi compuși coordinativi stimulatori ai activității enzimatice la fungii miceliali, a fost evaluat efectul compușilor coordinativi heterometalici ai Ba(II), Sr(II), Ca(II) cu Co(II) și ligand polidentat 2,6-dicarbonilpiridin diclorură, asupra activității proteazelor acide (pH-3,6), neutre (pH-7,4) și alcaline (pH-9,0) sintetizate de tulpina de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12.

Activitatea enzimatică a fost determinată în dinamică în zilele a 4-a, a 5-a și a 6-a de cultivare, perioadă în care micromiceta manifestă cote superioare de acumulare a proteazelor.

Efectul compușilor testați asupra activității enzimatice a variat semnificativ în funcție de compoziția și concentrația compusului, durata de cultivare a tulpinii producătoare și tipul enzimelor cuantificate.

În baza datelor obținute, s-a constatat că valorile maxime ale activității **proteazelor acide** au fost marcate în ziua a 5-a de cultivare, atât în proba martor, cât și în cele cultivate în prezența compușilor coordinativi (Tab. 1).

În ziua a 4-a de cultivare în majoritatea variantelor experimentale activitatea proteazelor acide a fost sub nivelul martorului cu cca 30-85%. Excepție a constituit compusul bariului care a asigurat sporirea activității enzimatice cu 50,0% și, respectiv, 33,3% față de martor la concentrațiile de 5 și 10 mg/l. Maxima de biosinteză a proteazelor acide s-a manifestat în ziua a 5-a de cultivare în cazul concentrației minime testate și coincide cu maxima în varianta martor, constituind 2,10 u/ml față de 1,9 u/ml în varianta martor. Efectul stimulator al compusului s-a păstrat la cote relativ înalte, însă, mult mai joase (10,5%) față de maxima martorului. În a 5-a zi de cultivare, prin efect stimulator asupra sintezei proteazelor acide s-a remarcat compusul ce conține calciu. Metalocomplexul cu Sr (II) a manifestat efect inhibitor asupra acumulării proteazelor acide în toate variantele experimentale, probele prezentând valori ale activității cu cca 12-65% sub nivelul probei martor.

Cu referire la influența ligandului, adăugat individual la mediul de cultivare a micromicetei producătoare, s-a constatat că acesta inhibă activitatea enzimatică a proteazelor acide, efectul fiind mai pronunțat în a 4-a zi de cultivare (cca 75-85%) și moderat (27-33%) în ziua a 5-a.

Tabelul 1. *Influența compușilor coordinativi heterometalici ai Ba(II), Sr(II), Ca(II) cu Co(II) și ligand polidentat asupra activității proteazelor acide (pH-3,6) la micromiceta Fusarium gibbosum CNMN FD 12*

Compuși coordinativi	Concentrație, mg/l	a 4-a zi		a 5-a zi	
		Activitatea, u/ml	%, față de martor	Activitatea, u/ml	%, față de martor
[Ba(L) ₃ -μ-(NCS) ₂ -Co(NCS) ₂]	5	1,26	150,0	2,10	110,6
	10	1,12	133,3	0,25	13,2
	15	0,87	103,6	0,42	22,1
[Sr(L) ₃] [Co(SCN) ₄]	5	0,39	46,4	1,68	88,4
	10	0,81	96,4	0,92	48,4
	15	0,59	70,2	0,84	44,2
[Ca(L) ₃] [Co(SCN) ₄]	5	0,80	95,2	2,20	115,8
	10	0,14	16,7	2,16	113,7
	15	0,13	15,5	2,18	114,7
Ligandul L	5	0,21	25,0	1,27	66,8
	10	0,18	21,4	1,39	73,2
	15	0,14	16,7	0,56	29,5
Martor	-	0,84	100,0	1,90	100,0

p ≤ 0,05

De menționat că în majoritatea variantelor analizate se constată diminuarea activității enzimatice odată cu majorarea concentrației compusului, acest efect fiind relevat inclusiv și în cazul ligandului adăugat la mediu singular.

Valorile superioare ale activității **proteazelor neutre** au fost înregistrate, de asemenea, în ziua a 5-a de cultivare, constituind în proba de referință 2,04 u/ml, comparativ cu 0,62 și, respectiv, 0,55 u/ml în ziua a 4-a

și a 6-a (Tab. 2). Activitatea proteazelor neutre marcată în variantele cultivate în prezența compușilor coordinativi a variat între 0,41-1,97 u/ml, ceea ce reprezintă 20,1-96,5% din valoarea variantei martor.

Deși în unele variante cultivate pe medii ce conțin compuși coordinativi, activitatea proteolitică este semnificativ mai înaltă, comparativ cu martorul zilei, valorile acesteia sunt mult mai joase față de nivelul maxim al activității manifestat de martor în ziua a 5-a de cultivare. Interes potențial biotehnologic prezintă compusul calciului și ligandul L în concentrație de 15 mg/L și, respectiv, 5 mg/L, care au asigurat în a 6-a zi de cultivare cote înalte ale activității enzimatică, atât în raport cu proba de referință din aceeași zi, cât și cu cea din a 5-a zi (valoarea maximă) activitatea constituind 2,24 și, respectiv, 2,32 u/ml și depășind martorul zilei cu 307,3% și 321,8%, corespunzător, și cu 9,8-13,7% maxima martorului din ziua a 5-a.

Tabelul 2. *Influența compușilor coordinativi heterometalici ai Ba(II), Sr(II), Ca(II) cu Co(II) și ligand polidentat asupra activității proteazelor neutre (pH-7,4) la micromiceta Fusarium gibbosum CNMN FD 12*

Compuși coordinativi	Conc., mg/l	a 4-a zi		a 5-a zi		a 6-a zi	
		Activitatea, u/ml	%, față de martor	Activitatea, u/ml	%, față de martor	Activitatea, u/ml	%, față de martor
[Ba(L) ₃ -μ-(NCS) ₂ -Co(NCS) ₂]	5	0,35	56,5	0,70	34,3	0,67	121,8
	10	0,48	77,4	1,71	83,8	0,67	121,8
	15	0,55	88,7	1,27	62,2	0,64	116,4
[Sr(L) ₃][Co(SCN) ₄]	5	0,22	35,5	0,65	31,8	1,37	249,1
	10	1,46	235,5	1,85	94,4	0,78	141,8
	15	0,25	40,3	1,85	90,7	0,78	141,8
[Ca(L) ₃][Co(SCN) ₄]	5	0,60	96,7	1,44	70,5	1,18	214,5
	10	0,60	96,7	1,43	70,1	1,15	209,0
	15	0,60	96,7	0,64	31,4	2,24	407,3
Ligandul - L	5	1,02	164,5	1,01	49,5	2,32	421,8
	10	1,40	225,8	1,58	77,4	1,47	267,2
	15	1,36	219,3	1,97	96,5	0,84	152,7
Martor	-	0,62	100,0	2,04	100,0	0,55	100,0

p≤0,05

Cu referire la proteazele alcaline, similar celor două tipuri de enzime, practic în toate variantele analizate, maxima activității a fost relevată în a 5-a zi de cultivare (Tab. 3). Nivelul activității probei martor a constituit 1,29 u/ml în ziua a 5-a, prezentând valori relativ înalte și apropiate de cele din ziua a 4-a și a 6-a (1,09 și 1,04 u/ml).

Tabelul 3. *Influența compușilor coordinativi heterometalici ai Ba(II), Sr(II), Ca(II) cu Co(II) și ligand polidentat asupra activității proteazelor alcaline (pH-9,0) la micromiceta Fusarium gibbosum CNMN FD 12*

Compuși coordinativi	Conc., mg/l	a 4-a zi		a 5-a zi		a 6-a zi	
		Activitatea, u/ml	%, față de martor	Activitatea, u/ml	%, față de martor	Activitatea, u/ml	%, față de martor
[Ba(L) ₃ -μ-(NCS) ₂ -Co(NCS) ₂]	5	1,37	125,7/106,5	1,04	80,6	0,39	37,5
	10	1,48	135,8/114,7	1,04	80,6	0,52	50,0
	15	0,53	48,6	1,60	124,0	0,6	57,7
[Sr(L) ₃][Co(SCN) ₄]	5	0,22	20,2	2,37	183,7	1,68	161,5/130,2
	10	0,67	61,5	2,10	162,8	1,47	141,3/114,0
	15	1,27	116,5	1,86	144,2	1,26	121,2
[Ca(L) ₃][Co(SCN) ₄]	5	0,84	77,1	1,12	86,8	0,74	71,2
	10	0,81	74,3	1,19	92,2	0,69	66,3
	15	0,5	45,9	1,44	111,6	0,87	83,7
Ligandul (L)	5	0,2	18,3	1,01	78,3	0,87	83,7
	10	1,12	102,8	2,28	176,7	0,63	60,6
	15	0,69	63,3	2,28	176,7	0,64	61,5
Martor	-	1,09	100,0	1,29	100,0	1,04	100,0

p≤0,05

La a 4-a zi de cultivare, complexul heterometalic al Ba(II) cu Co(II) și ligand polidentat în concentrație de 5 și 10 mg/L a asigurat sporirea activității enzimatică până la 1,37 și 1,48 u/ml, aceasta depășind atât nivelul

martorului zilei cu 25,7 și 35,8%, cât și al maximei prezentate de martor în ziua a 5-a cu 6,2 și 14,7%, ceea ce face posibilă reducerea ciclului de cultivare cu 24 ore. La a 5-a zi efectul stimulator se anihilează, iar activitatea în variantele marcate diminuează cu cca 20% față de nivelul variantei martorului zilei, scăzând considerabil în ziua a 6-a de cultivare.

În restul variantelor experimentale, cu excepția variantei cultivate în prezența compusului coordinativ al Sr (II) în concentrație de 15 mg/L (sporul de 16,5% față de martor) în ziua a 4-a s-a relevat efect inhibitor care a variat între 23,0-82,0%.

La a 5-a zi de cultivare maximul valorii enzimatică a fost relevat la probele cultivate în prezența compusului coordinativ al Sr și a ligandului. Astfel, probele cultivate în prezența compusului stronțului, în toate concentrațiile testate, au manifestat o activitate cuprinsă între 1,86-2,37 u/ml, depășind proba de referință cu 44,2-83,7%. Nivelul înalt al activității (1,26-1,68 u/ml) se menține inclusiv și la a 6-a zi de cultivare, sporul constituind 21,2-61,5% față de martorul din aceeași zi și 14-30,2%, comparativ cu maximul marcat de martor în ziua a 5-a. În toate aceste variante, sporul maxim al activității a fost marcat în cazul concentrației minime (5 mg/L), scăzând treptat odată cu majorarea concentrației compusului.

În ceea ce privește ligandul, activitatea a constituit 2,28 u/ml la concentrația 10 și 15 mg/ml, depășind nivelul martorului cu 76,7%. Spre deosebire de probele cultivate în prezența Sr, în cazul ligandului, efectul pozitiv nu este persistent, la a 6-a zi constatându-se diminuarea activității proteazelor alcaline cu cca 40% față de martorul zilei.

În cazul compusului ce conține calciu, efectul asupra acumulării proteazelor alcaline este practic neutru în a 5-a zi de cultivare și inhibitor în ziua a 4-a și a 6-a, determinând scăderea activității cu 16,3-54,1%.

În baza datelor obținute se constată că în calitate de potențiali stimulatori ai proteazelor alcaline la micromiceta *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 prezintă interes compușii coordinativi heterometalici ai Ba(II), și Sr (II) cu Co(II) și ligandul polidentat (2,6-dicarbonilpiridin diclorură). Compusul $[\text{Ba}(\text{L})_3-\mu-(\text{NCS})_2-\text{Co}(\text{NCS})_2]$ în concentrație de 5 și 10 mg/l, asigură sporul activității proteazelor alcaline în a 4-a zi de cultivare cu 25,7 și 35,8% comparativ cu martorul zilei și cu 6,2% și 14,7% față de martorul din ziua a 5-a (maxima variantei martor). Compusul $[\text{Sr}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{SCN})_4]$ – sporul activității proteazelor alcaline în a 5-a zi de cultivare constituie 83,7% (5 mg/l); 62,8% (10 mg/l) și 44,2% (15 mg/l).

CONCLUZII:

1. Compușii coordinativi heterometalici ai Ba(II), și Sr (II) cu Co(II) și ligandul polidentat (2,6-dicarbonilpiridin diclorură) au exercitat influență distinctă stimulatorie și de intensificare asupra biosintezei enzimelor proteolitice la micromiceta *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 și pot fi examinați în calitate de stimulatori și reglatori ai sintezei hidrolazelor exocelulare.
2. Compusul coordinativ heterometalic al Ba(II) cu Co(II) și ligand polidentat în concentrație de 5 și 10 mg/l, contribuie la intensificarea biosintezei enzimatică la tulpina producătoare, asigurând în ziua a 4-a de cultivare nivele mai înalte ale proteazelor acide și alcaline, comparabile cu valoarea maximă prezentată de martor în ziua a 5-a de cultivare – ziua manifestării biosintezei maxime în proba de referință. Astfel, sporul activității proteazelor acide în a 4-a zi de cultivare a constituit 33,3-50,0% față de martorul zilei; activitatea proteazelor alcaline - 25,7 și 35,8% față de martorul zilei și, 6,5 și 14,7% față de maxima martorului (ziua a 5-a).
3. Compusul coordinativ heterometalic al Sr(II) cu Co(II) și ligand polidentat asigură sporul activității proteazelor alcaline cu 83,7, 62,8 și 44,2%, respectiv, la concentrațiile de 5, 10 și 15 mg/L. Efectul se menține la cote înalte și în ziua a 6-a de cultivare ce contribuie la extinderea perioadei de biosinteză activă a producătorului.
4. Compusul coordinativ heterometalic al Ca(II) cu Co(II) și ligand polidentat exercită un efect pozitiv moderat asupra proteazelor acide, în toate concentrațiile testate, asigurând sporul activității cu 13,7-15,8%, iar în concentrația de 15 mg/l majorează activitatea proteazelor alcaline cu 11,6% și extinde perioada de sinteză activă a proteazelor neutre, activitatea depășind cu 307,3% martorul din aceeași zi și cu 9,8% maxima probei de referință.
5. Ligandul din compoziția compușilor testați, în concentrație de 10 și 15 mg/l, asigură sporirea activității proteazelor alcaline cu 76,7%. Efectul pozitiv nu este persistent, la a 6-a zi constatându-se o diminuare puternică a activității proteazelor alcaline.

Cercetările au fost efectuate în cadrul proiectului 20.80009.5007.28 „Elaborarea noilor material multifuncționale și tehnologii eficiente pentru agricultură, medicină, tehnică și sistemul educațional în complexelor metalelor „s” și „d’ cu liganzi polidentati” din cadrul PS 2020-2023 a Republicii Moldova, cu finanțare ANCD.

Bibliografie:

1. Anson, M. *The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin*. In: Journal of General Physiology, 1938, 22 (1), pp. 79–89.
2. Bezerra, V.H.S.; Cardoso, S.L.; Fonseca-Bazzo, Y.; Silveira, D.; Magalhães, P.O.; Souza, P.M. *Protease produced by endophytic fungi: a systematic review*. In: Molecules. 2021,26 (22):7062. doi:10.3390/molecules26227062.
3. Bivol, C.; Ciloci, 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*. În: Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie. 2020, Tom. XXVII, Issue 1, p. 64-70.
4. Coropceanu, E.; Ciloci, A.; Stefirță, A.; Bulhac, I. *Compuși coordinativi oximici în calitate de stimulatori ai proceselor fiziologice la unii fungi și plante de cultură*. În: Modern Technologies in the Food Industry. 20-22 octombrie 2016, Chișinău. - Chisinau, Republic of Moldova: Tehnica-Info, 2016, p. 369-374.
5. Deseatnic, A.; Tiurina, J.; Bologa, O. et al. *Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi Fusarium gibbosum CNMN FD 12*. Brevet de invenție MD 4234. 2013.06.30.
6. Elgammal, E.W.; El-Khonezy, M.I.; Ahmed, E.F.; Abd-Elaziz, A.M. *Enhanced production, partial purification, and characterization of alkaline thermophilic protease from the endophytic fungus Aspergillus ochraceus BT21*. In: Egypt Pharmaceut Journal. 2020, 19, pp. 338-349.
7. Ooi, C.K.; Rasit, N.; Raphizah, W.; Abdullah, W. *Optimization of protease from aspergillus niger under solid-state fermentation utilizing shrimp shell*. In: Biointerface Research in Applied Chemistry. 2021, 11(6), pp. 14809–14824. doi:10.33263/BRIAC116.1480914824.
8. Shu, L.; Si, X.; Yang, X.; Ma, W.; Sun, J.; Zhang, J.; Xue, X.; Wang, D.; Gao, Q. *Enhancement of acid protease activity of Aspergillus oryzae using atmospheric and room temperature plasma substrate*. In: Frontiers in Microbiology. 2020, 11, e:1418. doi.org/10.3389/fmicb.2020.01418.
9. Sanchez, S.; Demain, A.L. *Bioactive products from fungi*. In: Journal of Food Bioactives. 2017, 11, pp. 59–87. doi: 10.1007/978-3-319-51639-4_3. PMID: PMC7122484.
10. Srilakshmi, J.; Madhavi, J; Lavanya, S. *Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects*. In: Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences. 2015, 2 (4), pp. 218-234. IF 2.092.