



MD 4532 B1 2017.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4532** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/845 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului

(21) Nr. depozit: a 2016 0124
(22) Data depozit: 2016.11.09

(45) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:
2017.11.30, BOPI nr. 11/2017

(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE INGINERIE ELECTRONICĂ ȘI NANOTEHNOLOGII "D. Ghițu", MD

(72) Inventatori: CILOCI Alexandra, MD; TIURINA Janetta, MD; GUȚUL Tatiana, MD; CLAPCO Steliana, MD; BIVOL Cezara, MD; LABLIUC Svetlana, MD; DVORNINA Elena, MD; DVORNICOV Dmitrii, MD

(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE INGINERIE ELECTRONICĂ ȘI NANOTEHNOLOGII "D. Ghițu", MD

(54) Procedeu de cultivare a tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de cultivare a tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 – producătoare de lipaze.

Procedeul, conform invenției, prevede obținerea suspensiei de spori a tulpinii crescute timp de 30 zile pe un mediu de malț-agar înclinat, adăugarea în suspensie a nanoparticulelor de Fe₃O₄ cu dimensiunea de

2
70 nm în concentrație de 0,005...0,01% cu agitare în decurs de 1...2 min, inocularea suspensiei într-un mediu nutritiv în concentrație de 10% vol. și cultivarea submersă la temperatura de 28...30°C cu agitare continuă la 180...200 rot/min în decurs de 48 ore.

Revendicări: 1

MD 4532 B1 2017.11.30

(54) Process for cultivation of *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 fungus strain**(57) Abstract:**

1
The invention relates to biotechnology, in particular to a process for cultivation of *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 fungus strain – producer of lipases.

The process, according to the invention, provides the preparation of a suspension of spores of a strain grown for 30 days on a sloped wort agar medium, addition in the suspension of Fe₃O₄ nanoparticles with the

2
dimension of 70 nm in a concentration of 0.005...0.01% with stirring for 1 2 min, inoculation of the suspension in a nutrient medium in a concentration of 10% vol. and deep cultivation at a temperature of 28...30°C with continuous stirring at 180...200 rpm for 48 hours.

Claims: 1

(54) Способ культивирования штамма гриба *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03**(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу культивирования штамма гриба *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 – продуцента липаз.

Способ, согласно изобретению, предусматривает получение суспензии спор штамма выращенного в течение 30-ти дней на скошенной сусло-агаризованной среде, добавление в суспензию наночастиц Fe₃O₄ размером 70 нм в концентрации

2
0,005...0,01% с перемешиванием в течение 1...2 мин, инокуляцию суспензии в питательную среду в концентрации 10% об. и глубинное культивирование при температуре 28...30°C с непрерывным перемешиванием при 180...200 об/мин в течение 48 часов.

П. формулы: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de cultivare a tulpinii de funghi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 – producătoare de lipaze exocelulare, care reprezintă o grupă unică de enzime ce catalizează atât reacții de hidroliză, cât și de sinteză, fiind capabile să asigure hidroliza eficientă a diferitor substraturi lipidocomponente (grăsimi naturale, uleiuri, trigliceride sintetice etc.), dar și sinteza gliceridelor, acilarea și alchilarea lipidelor, reacțiile de esterificare etc. și pot fi aplicate în industria alimentară, chimică (obținerea sterioizomerilor), de prelucrare a pieilor, precum și în cercetările științifice, în producerea cașcavalurilor, detergenților biodegradabili, preparatelor medicamentoase destinate profilaxiei și tratamentului disfuncțiilor tractului gastro-intestinal etc.

Procedeele moderne de cultivare a tulpinilor fungice producătoare de lipaze exocelulare se bazează pe aplicarea rezultatelor cercetărilor clasice îmbinate cu realizările tehnologice și fizico-chimice moderne. Astfel, în contextul stabilirii parametrilor optimi de cultivare a producătorilor ce asigură explorarea la maxim a potențialului biosintetic al producătorilor, se realizează studiul particularităților de creștere și sinteză a lipazelor în funcție de regimul termic, aeratie, dinamica variației pH-ului mediului, raportul optim al componentelor mediilor nutritive, cantitatea și tipul materialului semincer, precum și screening-ul inductorilor specifici reprezentați de ingrediente naturale (făină de soia, porumb, tărâțe de grâu etc.).

În scopul sporirii capacității biosintetice a micromicetelor producătoare de lipaze sunt utilizați factori de influență de natură chimică, precum compușii coordinați ai metalelor de tranziție sau/și de natură fizică – tratarea cu unde milimetrice de intensitate joasă [1, 2].

O direcție nouă în sinteza dirijată sporită a substanțelor bioactive de către microorganisme abordează utilizarea în calitate de factori regulatori a nanoparticulelor, caracterizate prin proprietăți fizice, chimice și biologice distincte față de aceleași compozite brute de dimensiuni micro- sau mai mari [3, 4].

În calitate de soluție proximală servește procedeul de cultivare a tulpinii de funghi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, în cultură submersă pe mediul nutritiv selectat ca optimal pentru tulpina dată cu următoarea componență (g/L): făină de soia 35,0; K_2HPO_4 5,0; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0; apă potabilă până la 1,0 L, pH-ul inițial al mediului 8,0, procesul de cultivare fiind realizat în condiții de agitare continuă (180...200 rot.·min⁻¹), timp de 48 ore, la temperatura de 28...30°C. La cultivarea submersă în condiții proximale tulpina *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 manifestă o activitate lipolitică de 37 500...40 000 u/ml [5].

Dezavantajul soluției proximale constă în faptul că procedeul nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al tulpinii, iar biosinteza enzimelor lipolitice nu atinge valoarea maximă.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu pentru cultivarea submersă a tulpinii de funghi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, care să asigure intensificarea biosintezei enzimelor lipolitice, ceea ce ar contribui semnificativ la sporirea eficienței tehnologiei de producere a lipazelor și extinderea sferei de aplicare a preparatelor lipolitice.

Invenția soluționează problema prin aceea că se propune un procedeu de cultivare a tulpinii de funghi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, care prevede obținerea suspensiei de spori a tulpinii crescute timp de 30 zile pe un mediu de malț-agar înclinat, adăugarea în suspensie a nanoparticulelor de Fe_3O_4 cu dimensiunea de 70 nm în concentrație de 0,005...0,01% cu agitare în decurs de 1...2 min, inocularea suspensiei într-un mediu nutritiv în concentrație de 10% vol. și cultivarea submersă la temperatura de 28...30°C cu agitare continuă la 180...200 rot./min în decurs de 48 ore, totodată mediul nutritiv conține, g/L: făină de soia 35,0, K_2HPO_4 5,0, $(NH_4)_2SO_4$ 1,0, apă potabilă restul, pH-ul inițial 8,0.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea biosintezei lipazelor sintetizate de tulpina *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 cu 212,5...230,5% (de 3,1...3,3 ori) față de soluția proximală.

Efectul biostimulator poate fi determinat de reactivitatea înaltă a nanoparticulelor datorită dimensiunilor mici ce le asigură capacitate înaltă de a penetra membranele citoplasmice, a se implica activ în procesele de oxidoreducere din celulă.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Pregătirea materialului semincer. Suspensia de spori și miceliu se obține prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii de *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 crescută timp de 30 zile pe suprafețe oblice de malț-agar. În suspensia de spori astfel obținută se adaugă, în condiții de sterilitate, soluția coloidală de nanoparticule de Fe₃O₄, cu dimensiunea de 70 nm în concentrație determinată (0,0025...0,015%), dispersate prealabil pe o baie de apă cu ultrasunet tipul DA-968 DADI timp de 1...2 min.

Amestecul obținut se agită riguros timp de 1..2 min pe agitator și se inoculează, în cantitate de 10% vol., în mediul nutritiv steril cu următoarea compoziție, g/L: făină de soia 35,0; K₂HPO₄ 5,0; (NH₄)₂SO₄ 1,0; apă potabilă până la 1,0 L; pH-ul inițial al mediului 8,0. Cultivarea se efectuează în vase Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 L ce conține 0,2 L de mediu nutritiv lichid, în condiții de agitare continuă la 180...200 rot·min⁻¹, temperatura de 28°C, timp de 48 ore (vezi tabelul).

Tabel

15 Modificarea activității lipazelor la cultivarea micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 în prezența diferitor concentrații de nanoparticule de Fe₃O₄.

Varianta	Concentrația nanoparticulelor, %	Activitatea lipolitică	
		U·ml ⁻¹	% față de martor
Nanoparticule de Fe ₃ O ₄ *	0,0025	97250	256,6
	0,005	118450	312,5
	0,010	125250	330,5
	0,015	70190	185,5
Soluția proximă	-	37900	100,0

* Sinteza nanoparticulelor Fe₃O₄/PVP prin metoda solvotermală. Nanoparticulele de Fe₃O₄ /PVP au fost obținute prin metoda solvotermală, folosind următoarele componente: FeCl₃·6H₂O (clorură de fier (III)), NaCH₃COO (acetat de sodiu) în prezența poli-*N*-vinilpirolidonului (PVP) cu masa molară Ms=10 000.

Procesul de sinteză constă în: diluarea a 0,460 g de clorură de fier (III) în 35 ml de PEG (polietilenglicol) cu masa molară 3500, se adaugă 3 ml de soluție alcoolică PVP cu concentrația molară de 0,01 mol/L și 3 ml de soluție saturată de acetat de sodiu. Ingredientele se mixează până la o stare omogenă; soluția obținută se plasează în autoclavă Teflon-Lined.

Sinteza durează 12 ore, la temperatura de 185°C. Pulberea neagră de magnetit se separă din soluție prin spălare cu etanol și se usucă la 100°C.

S-a determinat (%): Fe (71,59); O (28,05); C (0,19); H (0,054), N (0,14).

S-a calculat (%): Fe (71,01); O (29,15); C (0,13); H (0,068), N (0,13).

Identificarea produselor obținute – pulberilor (nano Fe₃O₄/(magnetit)), a fost efectuată prin metodele analizei chimice, XRD, IR –spectroscopie, SEM – microscopie.

Picurile de difracție observate corespund fazei cubice a nanoparticulelor de Fe₃O₄ (grupa spațială Fd3m, *a* = 8.3952 Å). Picul principal de difracție corespunde planurilor cristalografice spinel cubic inversat Fe₃O₄: (111), (220), (311), (222), (400), (333), (440), (533). În acest mod, structura cristalină a materialului sintetizat a fost confirmată. Dimensiunea cristalitelor este de *d* = (70±5) nm. Această valoare corespunde datelor măsurărilor microscopice.

Comparația spectrelor nanoparticulelor de Fe₃O₄/PVP și PVP pur dezvăluie benzi de absorbție similare în regiunile 3600...2400 și 1650...650 cm⁻¹. Picul observat în spectrul IR al PVP pur la 1645 cm⁻¹ este atribuit legăturii C=O și este deplasat spre roșu către valoarea 1559.6 cm⁻¹, în rezultatul interacțiunii dintr-un oxigen carbonil și magnetit. În domeniul spectrului de absorbție 1500...1200 cm⁻¹, benzile de absorbție ale PVP se suprapun cu benzile oxidului hidratat, are loc interacțiunea dintre ele. A fost observată o bandă lată cu maximumul la 1406.5 cm⁻¹ și la 1341.3 cm⁻¹. Prima dintre acestea este legată de picul observat pentru nanoparticulele de Fe₃O₄ la 1448.2 cm⁻¹, care rezultă din oxidul de fier hidratat, dar este deplasată la 1406.5 cm⁻¹, în timp ce picul la 1341.3 cm⁻¹ este aparent atribuit legăturii covalente dintre PVP și nanoparticulele de Fe₃O₄. Astfel, studiul FTIR al nanoparticulelor de magnetit și ale stabilizatorului polimeric a demonstrat că are loc coordonarea PVP la nanoparticulele de magnetit prin legăturile de azot și oxigen din PVP, cum a fost evidențiat în referință. Deci, PVP este folosit în calitate de stabilizator polimeric al nanoparticulelor de magnetit. Introducerea polimerului în timpul sintezei presupune formarea grupei carbonil

incărcate negativ pe suprafața nanoparticulelor de magnetit, ceea ce contribuie la formarea unei soluții coloidale stabile. Prezența moleculelor mari de PVP generează apariția efectului steric și împiedică agregarea lor. Soluțiile coloidale bazate pe sinteza nanoparticulelor pot fi folosite pentru bioteste.

5 Nanoparticulele de Fe_3O_4 /PVP obținute sunt folosite la pregătirea soluției coloidale: se ia cantitatea necesară de nanoparticule de magnetit (50 mg/L) care se plasează într-un balon calibrat, se adaugă solvenul – apa distilată; suspensia se omogenizează folosind baia cu ultrasunet. Apoi prin diluare se obțin soluțiile cu concentrațiile necesare. În acest mod, folosirea polivinilpirolidonului în calitate de modificator – (stabilizator) al suprafeței permite formarea nanoparticulelor solubile în apă, cu formarea unor coloizi stabili (¹Grażyna Bystrzejewska-Piotrowska, Monika Asztemborska, Romuald Stęborowski, Halina Polkowska-Motrenko, Bożena Danko, Justyna Ryniewicz. Application of neutron activation for investigation of Fe_3O_4 nanoparticles accumulation by plants, Nukleonika, Vol. 57, №3, 2012, p. 427–430).

15 Activitatea lipolitică maximă, determinată după gradul de hidroliză a suspensiei de ulei de măsline în alcool polivinilic până la acid oleic, s-a marcat la utilizarea nanoparticulelor de Fe_3O_4 în concentrație de 0,005...0,01% și a constituit 118450 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ și 125250 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, alcătuind corespunzător 312,5% și 330,0% față de proba proximă (37 900 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), depășind mărtoarul de 3,1...3,3 ori sau cu 212,5 și 230,05%.

20 Exemplul 2

Cultivarea tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 se efectuează în retorte Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 L cu conținut de 0,1 L de mediu nutritiv lichid, la temperatura de 30°C, celelalte condiții fiind echivalente cu cele din exemplul 1.

25 Activitatea lipolitică maximă, determinată după metoda descrisă în exemplul 1, s-a marcat la utilizarea nanoparticulelor de Fe_3O_4 în concentrație de 0,005...0,01% și a constituit 122 850 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ și 127 920 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, corespunzător, alcătuind 315,0 și 328,0% față de proba proximă (39 000 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$).

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы. Москва, Наука, 1977, p. 132-137
2. MD 2709 F1 2005.02.28
3. Walisko R., Krull R., Wittmann C. Microparticle-based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bio-production. Biotechnology Letters, 2012, vol. 34, Issue 11, p. 1975-1982
4. Driouch H., Roth A., Dersch P., Wittmann C. Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. Appl Microbiol Biotechnol. 2010, 87(6) p. 2011-24
5. MD 2458 F1 2004.05.31

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare a tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, care prevede obținerea suspensiei de spori a tulpinii crescute timp de 30 zile pe un mediu de maț-agar înclinat, adăugarea în suspensie a nanoparticulelor de Fe_3O_4 cu dimensiunea de 70 nm în concentrație de 0,005...0,01% cu agitare în decurs de 1...2 min, inocularea suspensiei într-un mediu nutritiv în concentrație de 10% vol. și cultivarea submersă la temperatura de 28...30°C cu agitare continuă la 180...200 rot/min în decurs de 48 ore, totodată mediul nutritiv conține, g/L: făină de soia 35,0, K_2HPO_4 5,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0, apă potabilă restul, pH-ul inițial 8,0.