



MD 4690 B1 2020.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4690** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C01G 9/02 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
C12P 21/00 (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 2018 0059 (22) Data depozit: 2018.07.31 (41) Data publicării cererii: 2020.01.31, BOPI nr. 1/2020	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.04.30, BOPI nr. 4/2020
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: EFREMOVA Nadejda, MD; BEȘLIU Alina, MD; USATÎI Agafia, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD	

(54) Procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*, care poate fi aplicat pentru obținerea proteinelor utilizate în industria microbiologică, alimentară, farmaceutică și cosmetică.

Procedeul, conform invenției, constă în obținerea suspensiei de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 sau *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 prin cultivare timp de 24 de ore pe mediul YPD, inocularea suspensiei în

2
concentrație de 5% vol. pe mediul YPD cu adăugarea nanoparticulelor de ZnO cu dimensiunea de 50 nm în concentrație de 20,0 mg/L și cultivarea la temperatura de 25...28°C cu agitare continuă la 180...200 rot/min în decurs de 72 ore.

Rezultatul invenției constă în sporirea conținutului de proteine în biomasa de levuri.

Revendicări: 1

MD 4690 B1 2020.04.30

(54) Process for cultivation of *Rhodotorula gracilis* yeasts**(57) Abstract:**

1
The invention relates to biotechnology, in particular to a process for cultivation of *Rhodotorula gracilis* yeasts, which can be applied to produce proteins used in the microbiological, food, pharmaceutical and cosmetic industries.

The process, according to the invention, consists in preparing a *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 or *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 yeast suspension by cultivating for 24 hours on YPD medium, inoculating the

2
suspension in a concentration of 5% vol. on YPD medium with the addition of 50 nm ZnO nanoparticles in a concentration of 20.0 mg/L and cultivating at 25...28°C with continuous stirring at 180...200 rpm for 72 hours.

The result of the invention consists in increasing the protein content in the yeast biomass.

Claims: 1

(54) Способ культивирования дрожжей *Rhodotorula gracilis***(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу культивирования дрожжей *Rhodotorula gracilis*, который может быть применен для получения белков используемых в микробиологической, пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

Способ, согласно изобретению, состоит в получении дрожжевой суспензии *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 или *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 путем

2
культивирования в течение 24 часов на среде YPD, инокуляции суспензии в концентрации 5% об. на среде YPD с добавлением наночастиц ZnO размером 50 нм в концентрации 20,0 мг/л и культивировании при температуре 25...28°C с непрерывным перемешиванием при 180...200 об/мин в течение 72 часов.

Результат изобретения состоит в повышении содержания белков в биомассе дрожжей.

П. формулы: 1

Descriere:

5 Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*, care poate fi aplicat pentru obținerea proteinelor utilizate în industria microbiologică, alimentară, farmaceutică și cosmetică.

10 În tehnologia de cultivare a tulpinilor de levuri în scopul sporirii conținutului substanțelor biologice active se utilizează diverse procedee: modificarea componenței mediului și condițiilor de cultivare (temperatura, pH-ul, aerația), selectarea diferitor stimulatori ai sintezei metaboliților secundari cum ar fi compușii coordinativi ai metalelor de tranziție, radiația electromagnetică în diapazon milimetric.

15 Este cunoscut procedeu de cultivare a levurilor *Saccharomyces cerevisiae* și *Candida scottii* în condiții de aerație, la temperatura de 25-40°C și pH 3,0-6,0 pe mediul nutritiv ce conține surse de carbon, azot, minerale, aditivi și stimulatori de creștere. În calitate de mediu nutritiv în vederea stimulării biosintezei proteinelor se utilizează hidrolizate de cereale. În calitate de stimulatori de creștere au servit următoarele componente: sulfat de sodiu, acizii giberelici, oligozaharide. Dezavantajul procedurii constă în conținutul mic de proteină acumulat în biomasa celulară și utilizarea multor factori de cultivare cu sinecost înalt [1].

20 Se cunoaște un procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula graminis* pe mediul nutritiv YNB + 2% de glucoză cu utilizarea metalelor de tranziție în calitate de factori reglatori ai biosintezei carotenoizilor [2]. Dezavantajul acestui procedeu constă în utilizarea reagenților chimici costisitori pentru cultivarea levurilor, utilizarea mai multor factori biostimulatori într-o schemă complexă, durata de cultivare îndelungată (120 de ore).

25 Conform ultimelor date din literatura de specialitate, nanoparticulele (NPs) oxidurilor metalice demonstrează acțiune semnificativă asupra sintezei substanțelor bioactive la microorganisme. Dimensiunile nanoparticulelor prezintă un factor decisiv. Nanoparticulele oxidului de zinc sunt considerate de perspectivă, deoarece posedă un spectru de proprietăți antibacteriene, antiinflamatoare, anticancerigene și prezintă interes pentru aplicare în diverse domenii: industria farmaceutică, alimentară, cosmetică (Zhang Yin, Mayak Tapas R., Hong Hao, Cai Weibo. Biomedical applications of Zinc oxide nanomaterials. Current Molecular Medicine, 2013, 13(10), p. 1633-1645; Prateek Uikay, Kirti Vishwakarma. Review of zinc oxide (Zno) nanoparticles applications and properties. International Journal of Emerging Technology in Computer Science & Electronics, 2016, vol. 21, 2, p. 239-242).

30 În calitate de cea mai apropiată soluție servește procedeu de cultivare a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 cu utilizarea mediului YPD suplimentat cu 0,5 mg/L de nanoparticule de Fe₃O₄ cu dimensiunea de 30 nm. Cultivarea submersă s-a realizat în baloane Erlenmeyer, pe agitatoare rotative (200 rot/min) la temperatura de 25°C, cu nivelul de aerație 80,0...83,0 mg/l, în decurs de 120 ore [3]. Dezavantajul acestui procedeu constă în obținerea unui conținut scăzut al proteinelor în biomasa levurilor.

40 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis* care asigură sporirea conținutului de proteine în biomasa levurilor, ceea ce poate contribui la lărgirea domeniilor de aplicare practică a preparatelor proteice de origine levuriană.

45 Procedeu de cultivare a tulpinilor *Rhodotorula gracilis* constă în obținerea suspensiei de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 sau *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 prin cultivare timp de 24 de ore pe mediul YPD, inocularea suspensiei în concentrație de 5% vol. pe mediul YPD cu adăugarea nanoparticulelor de ZnO cu dimensiunea de 50 nm în concentrație de 20,0 mg/L și cultivarea la temperatura de 25...28°C cu agitare continuă la 180...200 rot/min în decurs de 72 ore.

50 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea conținutului de proteine în biomasa levuriană cu 23,1...34,5 %.

55 Impactul stimulator al nanoparticulelor oxidului de zinc se datorează proprietăților unice de a interacționa cu celulele microbiene și de a induce modificări în procesele biochimice celulare, inclusiv componente proteice. Aplicarea nanoparticulelor oxidului de zinc la cultivarea tulpinii de levuri pigmentate oferă oportunități vaste pentru modelarea biosintezei proteinelor și utilizarea în diferite domenii ale biotehnologiei, industriei farmaceutice, alimentare și cosmetice.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul I

Se obține suspensia de celule a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 cultivată timp de 24 de ore pe mediul YPD. Ulterior, suspensia de levuri se inoculează în 200 ml mediu nutritiv YPD ce conține, g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie - 10 ml; apă potabilă – 1,0 L, pH 5.5 în volum de 5%. Se adaugă în condiții sterile în calitate de factor stimulator nanoparticule de ZnO cu dimensiunea de 50 nm (Aldrich), suprafața specifică 10,8 m²/g, în concentrație de 20,0 mg/L. Cultivarea tulpinii se realizează în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1,0 L în condiții de agitare continuă la 180...200 rot/min la temperatura de 28⁰C, iluminare permanentă în decurs de 72 ore. În calitate de variantă de control servește proba conform celei mai apropiate soluții. Conținutul maximal al proteinei, determinat prin metoda Lowry, a fost obținut la concentrația de 20 mg/L de nanoparticule de ZnO (50 nm) și constituie 57,89 % fiind cu 23,1% superioară variantei de control.

Tabelul 1

Impactul nanoparticulelor (NPs) de ZnO (50 nm) asupra conținutului de proteine la tulpina de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 în funcție de concentrație

Variante	Concentrația, mg/L	Proteine, %	%, control
NPs ZnO (50 nm)	10,0	49,43±0,48	105,1
	20,0	57,89±0,33	123,1
	30,0	51,36±0,42	109,2
Cea mai apropiată soluție	NPs Fe ₃ O ₄ (30 nm) 0,5 mg/L	47,01±0,37	100

Exemplul II

Se obține suspensia de celule a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 cultivată timp de 24 de ore pe mediul YPD. Ulterior, suspensia de levuri se inoculează în 200 ml mediu nutritiv YPD ce conține, g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie - 10 ml; apă potabilă – 1,0 L, pH 5.5 în volum de 5%. Se adaugă în condiții sterile în calitate de factor stimulator nanoparticule de ZnO cu dimensiunea de 50 nm (Aldrich), suprafața specifică 10,8 m²/g, în concentrație de 20,0 mg/L. Cultivarea tulpinii se realizează în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1,0 L în condiții de agitare continuă la 180...200 rot/min la temperatura de 28⁰C, iluminare permanentă în decurs de 72 ore. În calitate de variantă de control servește proba conform celei mai apropiate soluții. Conținutul maximal al proteinei, determinat prin metoda Lowry, a fost obținut la concentrația de 20 mg/L de nanoparticule de ZnO și constituie 63,25% fiind cu 34,5% superior variantei de control.

Tabelul 2

Impactul NPs de ZnO (50 nm) asupra conținutului de proteină la tulpina de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 în funcție de concentrație

Variante	Concentrația, mg/L	Proteine, %	%, control
NPs ZnO (50 nm)	10,0	59,58±0,50	126,7
	20,0	63,25±0,33	134,5
	30,0	54,78±0,42	116,5
Cea mai apropiată soluție	NPs Fe ₃ O ₄ (30 nm) 0.5 mg/L	47,01±0,37	100

Rezultatele prezentate confirmă posibilitatea utilizării nanoparticulelor oxizilor de zinc pentru sporirea proceselor de biosinteză a proteinelor la levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis*.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. RU 2384612 C2 2010.03.20
2. Buzzini P., Martini A., Gaetani M., Turchetti B., Pagnoni U. M., Davoli P. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36, p. 687-692
3. Usatii A., Kiritsa E., Beshliu A. The effect of Fe₃O₄ nanoparticles on bioproduction parameters of *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 yeast strain with high biotechnological potential. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, 2016, v. 23, 2, p. 67-71

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*, care constă în obținerea suspensiei de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 sau *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 prin cultivare timp de 24 de ore pe mediul YPD, inocularea suspensiei în concentrație de 5% vol. pe mediul YPD cu adăugarea nanoparticulelor de ZnO cu dimensiunea de 50 nm în concentrație de 20,0 mg/L și cultivarea la temperatura de 25...28°C cu agitare continuă la 180...200 rot/min în decurs de 72 ore.