



MD 4709 B1 2020.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4709** (13) **B1**
(51) Int.Cl: C12N 1/14 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C01G 5/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
C12Q 1/30 (2006.01)
C12Q 1/26 (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 2019 0066 (22) Data depozit: 2019.07.25	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.08.31, BOPI nr. 8/2020
(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* și poate fi utilizată pentru obținerea enzimelor antioxidante superoxid dismutaza și catalaza cu potențial înalt de aplicare în industria microbiologică, farmaceutică și cosmetică.

Procedeul, conform invenției, include obținerea suspensiei de levuri a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 prin

2
cultivare timp de 24 de ore pe mediul YPD, inocularea suspensiei în concentrație de 5% vol. pe mediul YPD cu adăugarea nanoparticulelor de Ag cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 10,0...15,0 mg/L și cultivarea la temperatura de 25...28°C cu agitare continuă la 180...200 rot/min în decurs de 72 ore.

Revendicări: 1

MD 4709 B1 2020.08.31

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

1
The invention relates to biotechnology, in particular to a process for cultivation of *Rhodotorula gracilis* yeast and can be used to produce antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase with high potential for use in the microbiological, pharmaceutical and cosmetic industries.

The method, according to the invention, comprises production of a yeast suspension of *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 strain by

2
cultivation for 24 hours on YPD medium, inoculation of the suspension at a concentration of 5% vol. on YPD medium with addition of Ag nanoparticles with a size of 5 nm at a concentration of 10.0...5.0 mg/L and cultivation at a temperature of 25...28°C with continuous stirring at 180...200 rpm for 72 hours.

Claims: 1

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

1
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу культивирования дрожжей *Rhodotorula gracilis* и может быть использовано для получения антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы с высоким потенциалом применения в микробиологической, фармацевтической и косметической промышленности.

Способ, согласно изобретению, включает получение дрожжевой суспензии

2
штамма *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 путем культивирования в течение 24 часов на среде YPD, инокуляцию суспензии в концентрации 5% об. на среде YPD с добавлением наночастиц Ag с размером 5 нм в концентрации 10,0...15,0 мг/л и культивирование при температуре 25...28°C с непрерывным перемешиванием при 180...200 об/мин в течение 72 часов.

П. формулы: 1

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

5 Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis* și poate fi utilizată pentru obținerea enzimelor antioxidante superoxid dismutaza și catalaza cu potențial înalt de aplicare în industria microbiologică, farmaceutică și cosmetică.

10 În prezent o importanță deosebită au cercetările destinate dezvoltării biotehnologiilor de producere a enzimelor antioxidante superoxid dismutaza (SOD) și catalaza (CAT). SOD și CAT îndeplinesc un rol important în distrugerea radicalilor liberi și neutralizarea consecințelor stresului oxidativ. Un concept inovator în producerea biotehnologică a enzimelor este utilizarea nanoparticulelor de Ag ca factor stimulator și regulator al proceselor de biosinteză.

15 Se cunoaște procedeul de cultivare a microalgei *Chlorococcopsis minuta* cu utilizarea diferitor strategii: excluderea nitrogenului și includerea fosforului, includerea nitrogenului și excluderea fosforului, excluderea nitrogenului și fosforului, includerea nitrogenului și fosforului [1]. Activitatea antioxidantilor enzimatici a fost determinată în condiții de stres oxidativ. Dezavantajul acestui procedeu constă în activitatea insuficientă a enzimelor SOD și CAT, utilizarea regimului de iluminare permanentă și a multor factori de cultivare cu sinecost înalt.

20 Mai este cunoscut procedeul de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu utilizarea compușilor coordonativi V(IV) și Co(III) cu diferiți liganzi de natură organică: L1 - [(VO)₂(2PyTCH)]SO₄·4H₂O; L2 - [(VO)₂(2PyCH)]SO₄·4H₂O; L3 - [(VO)₂(2PyFx)]SO₄·4H₂O; L4 - [Co(L-H)En]·3H₂O; L5 - Na[Co(DH)₂(NO₂)₂] [2]. Dezavantajul acestui procedeu constă în timpul îndelungat de cultivare, utilizarea regimului de iluminare permanentă și inhibarea productivității cianobacteriei, iar în cazul utilizării compușilor coordonativi L1, L2 și L3 se manifestă scăderea SOD sub nivelul probei de control.

30 În calitate de cea mai apropiată soluție servește procedeul de cultivare a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 cu utilizarea mediului YPD, suplementat cu nanoparticule de oxid de zinc cu dimensiuni de 50 nm și 100 nm. Cultivarea submersă s-a realizat în baloane Erlenmayer, pe agitatoare rotative (200 rot/min) la temperatura de 25°C, cu nivelul de aerație de 80,0...83,0 mg/L, în decurs de 120 ore [3]. Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că nu asigură un nivel înalt de biosinteză a enzimelor antioxidante SOD și CAT și în timpul îndelungat de cultivare.

35 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*, care asigură sporirea biosintezei enzimelor antioxidante superoxid dismutaza și catalaza în biomasa levuriană.

40 Procedeul, conform invenției, constă în obținerea suspensiei de levuri a tulpinii *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 Ag cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 10,0...15,0 mg/L și cultivarea la temperatura de 25...28°C cu agitare continuă la 180...200 rot/min în decurs de 72 ore.

45 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea semnificativă a activității SOD cu 40...52% și CAT cu 33...45% în biomasa levuriană și reducerea timpului de cultivare până la 72 ore.

Impactul stimulator al nanoparticulelor de Ag se datorează proprietăților unice de activare a sistemelor antioxidante de protecție a celulelor levuriene și capacității de a modifica metabolismul proteic. Nanoparticulele de Ag posedă un spectru de proprietăți antibacteriene, antiinflamatoare, anticancerigene și prezintă interes pentru aplicare în industria farmaceutică și cosmetică.

50 Exemple de realizare a invenției

Exemplul I

55 Se obține suspensia de levuri a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03, crescută timp de 24 de ore pe mediul YPD. Ulterior, suspensia de levuri se inoculează în 200 ml de mediu nutritiv YPD, ce conține g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie - 10 ml; apă potabilă – 1 L, pH 5,5, în volum de 5%. Se adaugă în condiții sterile în calitate de factor stimulator nanoparticule de Ag cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 10,0 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 +28...30°C, în decurs de 72 ore. În calitate de control servește proba de biomasă levuriană din mediul nutritiv fără adăugarea

nanoparticulelor. Activitatea catalazei a fost determinată conform metodei spectrofotometrice (Titova N.M., Subbotina T.N. Enzymology: Laboratory Workshop. Krasnoyarsk, Siberian Federal University, 2012, p. 60). Metoda se bazează pe tratarea probei suspensiei de levuri cu peroxid de hidrogen și un amestec de acetonă și iodură de potasiu. Activitatea superoxid dismutazei se măsoară prin metoda spectrofotometrică bazată pe capacitatea superoxid dismutazei de a inhiba reducerea tetrazolului nitro-albastru prin superoxid în prezența riboflavinei. O unitate de activitate a enzimei SOD a fost determinată ca cantitatea de SOD necesară pentru o reducere cu 50% a tetrazolului nitro-albastru. Activitatea SOD a fost exprimată în unități/mg/proteină (Nekrasova G.F., Kiseleva I.S. Guide to laboratory and practical classes. Ural State University, Ekaterinburg, 2008, p. 157).

Extractul proteic se caracterizează prin activitatea SOD de $275 \pm 1,04$ unități/mg proteină față de $196 \pm 0,5$ unități/mg proteină în cazul celei mai apropiate soluții și activitatea CAT de $73,27 \pm 0,15$ unități/mg proteină față de $55,0 \pm 0,8$ unități/mg proteină în cazul celei mai apropiate soluții. Sporul activității SOD este de 40% și CAT de 33%.

Exemplul II

Se obține suspensia de levuri a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03, crescută timp de 24 de ore pe mediu YPD. Ulterior, suspensia de levuri se inoculează în 200 ml de 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 Ag cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 15,0 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 $+28...30^{\circ}\text{C}$, în decurs de 72 ore. În calitate de variantă de control servește proba cu mediul nutritiv fără aplicarea nanoparticulelor.

Extractul proteic se caracterizează prin activitatea SOD de $258 \pm 0,82$ unități/mg proteină față de $196 \pm 0,5$ unități/mg proteină în cazul celei mai apropiate soluții și activitatea CAT de $80,0 \pm 0,12$ unități/mg proteină față de $55,0 \pm 0,8$ unități/mg proteină în cazul celei mai apropiate soluții. Sporul activității SOD este de 52% și CAT de 45%.

Tabel

Impactul nanoparticulelor (NPs) de Ag (5 nm) asupra activității SOD și CAT la tulpina de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03

Variante	Concentrația, mg/L	SOD, unități/mg proteină	%	CAT, unități/mg proteină	%
Invenția	10	$275 \pm 1,04$	140	$73,27 \pm 0,15$	133
	15	$298 \pm 0,82$	152	$80,0 \pm 0,12$	145
Cea mai apropiată soluție	NPs ZnO (50 nm) 30 mg/l	$196 \pm 0,5$	100	$55,0 \pm 0,8$	100

Rezultatele prezentate demonstrează o creștere a activității enzimatiche antioxidante și confirmă posibilitatea utilizării nanoparticulelor de Ag pentru sporirea activității SOD și CAT la levurile pigmentate *Rhodotorula gracilis*.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Shoaib H., Sibi G. Antioxidant System Response in Green Microalga *Chlorococcopsis minuta* Against Nutrient Stress in Growth Media. *Journal of Biological Sciences*, 2018, 11, p. 210-216
2. Bulimaga V., Rudic V., Efremova N., Djur S., Elenciuc D., Dencicov L., Lozan V. The utilization of some coordination compounds of V(IV) and Co(III) as regulators of the content of bioactive substances with antioxidant properties at *Spirulina platensis*. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, 2011, v. XVIII, 1, p. 59-65
3. Efremova N., Beșliu A., Usatîi A. The impact of zinc oxide nanoparticles on protein content and activity of some antioxidant enzymes at pigmented yeasts. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, 2019, v. XXVI, 1, p. 34-37

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*, care constă în obținerea suspensiei de levuri a tulpinii *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 Ag cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 10,0...15,0 mg/L și cultivarea la temperatura de 25...28°C cu agitare continuă la 180...200 rot/min în decurs de 72 ore.