



MD 1624 Y 2022.05.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1624** (13) **Y**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)  
*C12N 9/20* (2006.01)  
*C12R 1/845* (2006.01)  
*C12Q 1/34* (2006.01)  
*C07F 3/00* (2006.01)  
*C07F 15/06* (2006.01)  
*C07D 213/79* (2006.01)

**(12) BREVET DE INVENȚIE  
DE SCURTĂ DURATĂ**

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

(21) Nr. depozit: s 2021 0053  
(22) Data depozit: 2021.06.23

(45) Data publicării hotărârii de  
acordare a brevetului:  
2022.05.31, BOPI nr. 5/2022

(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE, MEC, MD

(72) Inventatori: CILOCI Alexandra, MD; CLAPCO Steliana, MD; TIURINA Janeta, MD; DVORNINA Elena, MD; LABLIUC Svetlana, MD; BULHAC Ion, MD; URECHE Dumitru, MD

(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE, MEC, MD

(74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor

(54) Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de funghi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, producătoare de lipaze

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare submersă a tulpinii de funghi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, producătoare de lipaze și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru producerea enzimelor lipolitice cu aplicare largă în industria alimentară, de producere și procesare a grăsimilor și uleiurilor vegetale, în medicină ca mijloc terapeutic și diagnostic.

Procedeu, conform invenției prevede obținerea suspensiei de spori a tulpinii crescute timp de 30 zile pe un mediu de malț-agar,

2  
inocularea suspensiei în cantitate de 5% v/v într-un mediu nutritiv apos ce conține, g/L: făină de soia - 35,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 1,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 5,0, cu adăugarea concomitentă a 0,005 g/L de [SrL<sub>3</sub>][Co(NCS)<sub>4</sub>, unde L - dimetilpiridin-2,6-dicarboxilat, și cultivarea la agitare continuă de 180-200 rot/min în decurs de 24 de ore la temperatura de 28-30°C.

Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei enzimelor lipolitice și reducerea duratei de cultivare a tulpinii cu 24 de ore.

Revendicări: 1

MD 1624 Y 2022.05.31

**(54) Process for submerged cultivation of *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 fungus strain, producer of lipases**

**(57) Abstract:**

1  
The invention relates to biotechnology, namely to a process for submerged cultivation of *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 fungus strain, producer of lipases and can be used in the microbiological industry for producing lipolytic enzymes with wide application in the food industry, production and processing of fats and vegetable oils, in medicine in as a therapeutic and diagnostic agent.

The process, according to the invention, provides for the production of a spore suspension of a strain grown for 30 days on a malt-agar medium, inoculation of the

2  
suspension in an amount of 5vol.% into a nutrient aqueous medium containing, g/L: soy flour - 35.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 5.0, with simultaneous introduction of 0.005 g/L of [SrL<sub>3</sub>][Co(NCS)<sub>4</sub>], where L - dimethylpyridine-2,6-dicarboxylate, and cultivation with constant stirring at 180-200 rpm for 24 hours, at a temperature of 28-30°C.

The result of the invention consists in increasing the biosynthesis of lipolytic enzymes and reducing the duration of cultivation of the strain by 24 hours.

Claims: 1

**(54) Способ глубинного культивирования штамма гриба *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, продуцента липаз**

**(57) Реферат:**

1  
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу глубинного культивирования штамма гриба *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, продуцента липаз и может быть использовано в микробиологической промышленности для получения липолитических ферментов с широким применением в пищевой промышленности, производстве и переработке жиров и растительных масел, в медицине в качестве терапевтического и диагностического средства.

Способ, согласно изобретению, предусматривает получение суспензии спор штамма выращенного в течении 30 дней на

2  
среде солод-агар, инокуляцию суспензии в количестве 5 об.% в питательную водную среду, содержащую, г/л: соевую муку - 35,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 1,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 5,0, с одновременным введением 0,005 г/л [SrL<sub>3</sub>][Co(NCS)<sub>4</sub>], где L - диметилпиридин-2,6-дикарбоксилат, и культивирование при постоянном перемешивания при 180-200 об/мин в течении 24 ч, при температуре 28-30°C.

Результат изобретения состоит в увеличении биосинтеза липолитических ферментов и сокращении продолжительности культивирования штамма на 24 часа.

П. формулы: 1

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologie, în particular, la un procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, producătoare de enzime lipolitice și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea lipazelor cu largi aplicări în industria alimentară, de producere și prelucrare a grăsimilor și uleiurilor vegetale, în medicină ca mijloc terapeutic și de diagnostică.

Procedeele moderne de cultivare a tulpinilor fungice producătoare de enzime exocelulare se bazează pe aplicarea rezultatelor cercetărilor clasice îmbinate cu realizările tehnologice și fizico-chimice moderne, precum studiul particularităților de creștere și sinteză a enzimelor în funcție de regimul termic, aeratie, dinamica variației pH-ului mediului, raportul optim al componentelor mediilor nutritive, cantitatea și tipul materialului semincer, cât și screening-ul inductorilor specifici reprezentați de ingrediente naturale (făina de soia, porumb, tărâțe de grâu, etc.). Componentele lipidice prezente în cantități mici în ingredientele din compoziția mediului stimulează efectiv biosinteza lipazelor (Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы. Изд. Наука, Москва, 1977, p. 132-156; Калунянц К.А., Голгер Л.И. Микробные ферментные препараты. Москва. Пищ. Пром., 1979, p. 14-30).

Pentru cultivarea submersă clasică a tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 este cunoscut procedeu, în care se utilizează mediul nutritiv cu compoziția, g: făină de soia – 35,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> -1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -1,0; apă potabilă până la 1L [1].

Dezavantajul constă în faptul că raportul componentelor mediului nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al culturii, biosinteza lipazelor nu atinge nivelul maxim, iar maxima biosintezei lipazelor se manifestă în ziua a 2-a de cultivare.

De asemenea, se cunoaște un procedeu de cultivare a tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 în aceleași condiții, timp de 48 ore, cu utilizarea în calitate de biostimulator a nanoparticulelor de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> care asigură obținerea unei activități lipolitice mult mai superioare față de invenție [2].

Deși aplicarea nanoparticulelor oferă soluții rapide și fiabile în diverse domenii de activitate, inclusiv biotehnologii, impactul acestora asupra mediului și sănătății este imprevizibil, variind semnificativ (benefic sau toxic) în funcție de caracteristicile nanomaterialelor și organismelor țintă și fiind dificil de prognozat și controlat. Totodată, nanoparticulele pot suferi diferite transformări (inclusiv biotransformări), care modifică proprietățile fizico-chimice ale acestora, rezultând un impact asupra mediului diferit de cel pe care îl pot provoca nanoparticulele originale, fiind necesare evaluări individualizate costisitoare (Martínez G., Merinero M., Pérez-Aranda M., Pérez-Soriano E. M., Ortiz T., Begines B., Alcudia A. Environmental Impact of Nanoparticles' Application as an Emerging Technology: A Review. Materials (Basel, Switzerland), 2020, 14(1), p. 166).

Alt dezavantaj constă în faptul că deși activitatea lipolitică este destul de înaltă, maximum de activitate al tulpinii de fungi miceliali *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 se atinge în a doua zi de cultivare.

La unele microorganisme o parte considerabilă de lipaze exocelulare sunt legate de peretele celular, ce poate inhiba secreția lipazelor în mediul de cultură și micșorarea randamentului lipazelor exocelulare. Includerea în mediul nutritiv a substanțelor cu abilități de stimulare a eliberării lipazelor legate de peretele celular, spre exemplu, surplusul de ioni ai unor metale, accelerează secreția lipazelor în mediul de cultură și favorizează procesul de sinteză a lipazelor exocelulare (Fogarty W.M. Микробные ферменты и биотехнология. Москва: Агропромиздат. 1986, p. 189-190).

În acest context un efect de stimulare a biosintezei lipazelor exocelulare poate asigura și includerea în mediul nutritiv a anumitor compuși coordinativi ai unor metale, în special ai metalelor cu rol de microelemente.

În ultimele decenii în scopul sporirii biosintezei enzimelor la micromicete intensiv se studiază compușii coordinativi ai elementelor 3d, din care unii s-au manifestat promițător în calitate de biostimulatori ai biosintezei lipazelor. De exemplu, este cunoscută utilizarea în calitate de biostimulator al sintezei enzimelor lipolitice la tulpina *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 a compusului de cobalt: bis(trietanolamin)-cobalt(II)diizobutirat. Dezavantajul acestui complex constă în faptul că sinteza necesită utilizarea unui compus auxiliar mai puțin accesibil ca 3,6-di-2-piridil-1,3,4,5,-tetrazină și efectul biostimulator se manifestă mai mult în a doua și a treia zi de cultivare [3].

De asemenea se cunoaște că utilizarea în mediul nutritiv a compușilor coordinativi ai cobaltului(III) - [Co(DH)<sub>2</sub>(An)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>[ZnF<sub>6</sub>]·2H<sub>2</sub>O și [Co(DH)<sub>2</sub>(An)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>[TiF<sub>6</sub>] în calitate de biostimulatori asigură creșterea capacității biosintetice a micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 producătoare de lipaze cu efect biostimulator din prima zi de cultivare [4].

Deși biostimulatorul este activ, el nu este stabil la păstrare și coroziv în raport cu sticla datorită prezenței fluorului în anionul de hexafluorzirconat/titanat.

Cea mai apropiată soluție de obiectul revendicat este procedeul de cultivare submersă a tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, în care suspensia de spori, obținută prin spălare cu apă distilată sterilă a culturii crescute timp de 30 de zile pe suprafețe înclinate de maț-agar, se inoculează într-un mediu nutritiv apos cu compoziția, g/L: făină de soia - 35,0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 5,0, compusul

5 coordinativ  $\text{CuGly}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 0,010, utilizat în calitate de biostimulator al biosintezei lipazelor. Cultivarea se realizează în condiții de agitare continuă (200 rot/min), timp de 48 ore, la temperatura de 28°C [5].

Dezavantajul acestei soluții constă în faptul că concentrația maximă admisibilă de aplicare a biostimulatorului  $\text{CuGly}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  nu asigură realizarea maximă a potențialului de biosinteză a lipazelor, totodată maximul de conținut de lipaze în lichidul cultural se atinge în a doua zi de cultivare.

10 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unui procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 cu aplicarea unui compus coordinativ în calitate de biostimulator al biosintezei lipazelor, care asigură sporirea capacității biosintetice a tulpinii și reducerea duratei de cultivare submersă cu 24 de ore.

15 Problema se rezolvă prin procedeul de cultivare submersă a tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, producătoare de lipaze, care prevede obținerea suspensiei de spori a tulpinii crescute timp de 30 de zile pe un mediu de maț-agar înclinat, inocularea suspensiei în cantitate de 5% v/v într-un mediu nutritiv apos ce conține, g/L: făină de soia - 35,0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 5,0, cu adăugarea concomitentă a 0,005 g/L de  $[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ , unde L este dimetilpiridin-2,6-dicarboxilat, și cultivarea la agitare

20 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea biosintezei enzimelor lipolitice față de martor și reducerea duratei de cultivare cu 24 de ore.

25 Rezultatele demonstrează că pe mediul cu biostimulatorul tetra(izotiocianat)cobalt(II) de tris(dimetilpiridin-2,6-dicarboxilat)stronțiu  $[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ , utilizat în concentrație de 0,005, 0,010 și 0,015 g/L, sporirea activității lipolitice constituie 13,1-79,5% față de martor (maximă de biosinteză a lipazelor la cultivare în condiții clasice - 34167 U/mL față de 28413-61321 U/mL în variantele experimentale), concentrația optimă fiind de 0,005 g/L. S-a relevat inclusiv faptul că activitatea variantelor experimentale în prima zi de cultivare prezintă valori ale activității lipolitice superioare nivelului maximal al probei de referință (a 2-a zi). Cea mai favorabilă concentrație a compusului coordinativ este cea de 0,005 g/L, care asigură în prima zi de cultivare un spor al activității lipolitice cu

30 94,6% față de martorul din aceeași zi și 79,5% față de valoarea maximă relevată la proba martor în ziua a 2-a de cultivare, depășind analogul proxim cu 5,6% (61321 U/mL față de 58068 U/mL).

Exemplu de realizare a invenției

Procedeul de sinteză a biostimulatorului  $[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$

35 Clorura de stronțiu cu masa de 0,16 g (0,001 mol), tiocianatul de cobalt trihidrat cu masa de 0,23 g (0,001 mol) și tiocianatul de amoniu cu masa de 0,16 g (0,002 mol) au fost dizolvate în 10 mL metanol (soluția 1). 2,6-piridindicarbonildiclorură cu masa de 0,61 g (0,003 moli) s-a dizolvat în 12 mL metanol (soluția 2). Soluția 1, la o agitare permanentă, se adaugă la soluția 2, după care, soluția obținută de culoare albastră-violetă a fost refluxată timp de 3 ore. După refluxare, soluția obținută a fost filtrată și lăsată la temperatura camerei pentru cristalizare. Peste 24 de ore s-au format cristale de culoare albastră. S-au obținut 0,11 g de produs. Randamentul constituie 44%.

Găsit, %: C 38,68; H 2,89; Sr 9,13; Co 6,19; N 10,23.

Pentru  $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{SrCoN}_7\text{O}_{12}\text{S}_4$

calculat, %: C 38,60; H 2,82; Sr 9,08; Co 6,11; N 10,17.

Procedeul de cultivare submersă a tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03

45 În prealabil se obține suspensia de spori a tulpinii de fungi prin spălare cu apă distilată sterilă a culturii de 30 zile, crescute pe suprafețe înclinate de maț-agar. Mediul nutritiv se prepară prin dizolvare într-un volum nu prea mare de apă potabilă a cantităților precântărite de săruri, urmată de dispersarea minuțioasă a făinii de soia, în raportul masic, g/L: făină de soia - 35,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 5,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1,0. După care volumul de apă potabilă se aduce până la 1,0 L, pH-ul inițial al mediului - 8,0. Tulpina de fungi miceliali *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 se cultivă în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 L, care conțin 0,2 L de mediu nutritiv. Mediul nutritiv se inoculează cu suspensie de spori și miceliu în

50 cantitate de 5% v/v. Soluția apoasă de biostimulator  $[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$  cu o concentrație bine determinată, reieșind din intervalul 0,0025-0,015 g/L, nemijlocit înainte de utilizare, se agită discret timp de 2-5 minute pe baie de apă cu ultrasunet de tip DA-968 DADI, după care se adaugă la mediul nutritiv

55 concomitent cu materialul semincer. Cultivarea se realizează în condiții de agitare continuă (200 rot/min), timp de 24 ore, la temperatura de 28°C.

Activitatea lipolitică, determinată după gradul de hidroliză în alcool polivinilic a suspensiei de ulei de măsline până la acid oleic după metoda titrimetrică Otto-Iamad (Graceva I.M., și al., 1982), în variantele experimentale cu aplicarea compusului coordinativ  $[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$  a constituit 39233 U/mL

# MD 1624 Y 2022.05.31

5

la concentrația de 0,0025 g/L, 61321 U/mL la concentrația de 0,005 g/L, 38634 U/mL la concentrația de 0,010 g/L, și 28413 U/mL la concentrația de 0,015 g/L. Maxima biosintezei se manifestă în varianta cu concentrația metalocomplexului de 0,005 g/L și constituie 61321 U/mL (Tabel).

Tabel

5 Influența diferitor concentrații de stimulator ( $[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ ) asupra activității lipolitice a tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 la cultivarea submersă

Procedeul de cultivare	Conc. de stimulator, g/L	1-a zi		a 2-a zi	
		Activitatea, U/mL	%, de referință*	Activitatea, U/mL	%, față de martor
Revendicat	0,0025	39233	124,5/114,8/	40678	119,1
	0,005	61321	194,6/179,5/105,6	35397	103,6
	0,010	38634	122,6/113,1/	33723	98,7
	0,015	28413	90,2	27334	80,0
Martor (control)	-	31500	100,0	34167	100,0
Analogul proxim				58068	100,0

10 \*194,6/179,5/105,6 - față de martorul zilei/față de valoarea maximă a martorului (ziua a 2-a) /față de analogul proxim.

Cercetările au fost efectuate în cadrul Programei de Stat 2020-2023 a Rep. Moldova prin proiectele 20.80009.5007.28 și 20.80009.5007.15 cu finanțarea de către ANCD.

## (56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 2458 F1 2004.05.31
2. MD 4532 B1 2017.11.30
3. MD a2020 0002 A2 2020.08.31
4. Десятник А., Тюрина Ж., Клапко С., Стратан М., Лаблюк С., Болога О., Коропчану Э., Рижа А., Булхак И. Некоторые аспекты биосинтеза внеклеточных гидролаз микромицетов из родов *Rhizopus* и *Aspergillus* в присутствии комплексных соединений кобальта(III) с фторсодержащими анионами. Бюлетин Академии де Științe а Moldovei. Științele vieții, 2010, nr. 1(310), p. 121-128
5. MD 2709 F1 2005.02.28

## (57) Revendicări:

Procedeul de cultivare submersă a tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, producătoare de lipaze, care prevede obținerea suspensiei de spori a tulpinii crescute timp de 30 de zile pe un mediu de maț-agar înclinat, inocularea suspensiei în cantitate de 5% v/v într-un mediu nutritiv apos ce conține, g/L: făină de soia - 35,0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 5,0, cu adăugarea concomitentă a 0,005 g/L de  $[\text{SrL}_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ , unde L este dimetilpiridin-2,6-dicarboxilat, și cultivarea la agitare continuă de 180-200 rot/min în decurs de 24 de ore la temperatura de 28-30°C.