



MD 4828 C1 2023.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4828** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)
C12R 1/845 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)
C07F 3/04 (2006.01)
C07F 15/06 (2006.01)
C07D 213/79 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2021 0070 (22) Data depozit: 2021.10.11	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2022.10.31, BOPI nr. 10/2022
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE, MD	
(72) Inventatori: CILOCI Alexandra, MD; BULHAC Ion, MD; CLAPCO Steliana, MD; DANILESCU Olga, MD; DVORNINA Elena, MD; LABLIUC Svetlana, MD; MATROI Alexandra, MD; URECHE Dumitru, MD	
(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE, MD	

(54) Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *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 fungi *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 de zile pe un mediu de malț-agar, inocularea suspensiei în cantitate de 5% v/v

2
într-un mediu nutritiv apos ce conține, g/L: făină de soia - 35,0, (NH₄)₂SO₄ - 1,0, KH₂PO₄ - 5,0, cu adăugarea concomitentă a 0,010 g/L de [Ca(L)₃][Co(NCS)₄], unde L - dimetilpiridin-2,6-dicarboxilat, și cultivarea la agitare continuă de 180-200 rot/min la temperatura de 28-30°C în decurs de 24 de ore.

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

Revendicări: 1

MD 4828 C1 2023.05.31

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

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, and in particular 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 obtaining lipolytic enzymes with wide application in the food industry, production and processing of fats and vegetable oils, in medicine as a therapeutic and diagnostic agent.

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

2
suspension in an amount of 5 vol.% in a nutrient aqueous medium containing, g/L: soy flour - 35.0, (NH₄)₂SO₄ - 1.0, KH₂PO₄ - 5.0, with the simultaneous addition of 0.010 g/L of [Ca(L)₃][Co(NCS)₄], where L - dimethylpyridine-2,6-dicarboxylate, and cultivation with continuous stirring at 180-200 rpm at the temperature of 28-30°C for 24 hours.

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, (NH₄)₂SO₄ - 1,0, KH₂PO₄ - 5,0, с одновременным введением 0,010 г/л [Ca(L)₃][Co(NCS)₄], где L - диметилпиридин-2,6-дикарбоксилат, и культивирование при постоянном перемешивании при 180-200 об/мин при температуре 28-30°C, в течение 24 ч.

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 lipaze, 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 diagnostic.

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, făina de porumb, tărațe 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. 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 un mediu nutritiv cu compoziția, g: făină de soia - 35,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -1,0; KH_2PO_4 -1,0; apă potabilă până la 1L [1].

Dezavantajul constă în faptul că raportul componentelor mediului nu asigură biosinteza lipazelor la un nivel înalt, iar maxima biosintezei lipazelor se manifestă în ziua a 2-a de cultivare.

Se cunoaște de asemenea 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_3O_4 , care asigură obținerea unei activități lipolitice de 70190-125250 U/mL [2].

Deși aplicarea nanoparticulelor oferă soluții rapide și fabuloase în diverse domenii de activitate, inclusiv biotehнологii, impactul acestora asupra mediului și sănătății este imprevizibil, variind semnificativ (benefic sau toxic) de la caz la caz în funcție de caracteristicile nanomaterialelor și organismelor țintă, 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, maxima de activitate a 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. Incluziunea 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 coordinați 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 coordinați ai elementelor 3d, din care unii s-au manifestat promițător în calitate de biostimulatori ai biosintezei enzimelor lipolitice.

De exemplu, se cunoaște că utilizarea glioximaților de Co(III) cu anioni de fluor $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{An})_2]_2[\text{ZnF}_6] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{An})_2]_2[\text{TiF}_6]$ în mediul nutritiv de cultivare a micromicetei *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 în calitate de biostimulatori, asigură efect stimulator din prima zi de cultivare, valorile activității lipolitice constituind 5071-57500 U/mL în prima zi [3].

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

Cea mai apropiată soluție este procedeu de cultivare submersă tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, în care suspensia de spori a culturii crescute pe suprafețe înclinate de malț-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,

KH_2PO_4 - 5,0, compusul 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 [4].

Dezavantajul constă în faptul că concentrația maximă admisibilă de aplicare a biostimulatorului $\text{CuGly}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ nu asigură biosinteză maximă a lipazelor, totodată maxima conținutului de lipaze în lichidul cultural de 58068 U/mL se atinge în a doua zi de cultivare.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unui procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 care asigură sporirea capacității biosintetice a producătorului față de analogul proxim și reducerea duratei de cultivare.

Problema se rezolvă prin procedeul de cultivare submersă a tulpinii de fungi *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, KH_2PO_4 - 5,0, cu adăugarea concomitentă a 0,010 g/L de $[\text{Ca}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$, unde L este dimetilpiridin-2,6-dicarboxilat, și cultivarea la agitare continuă de 180-200 rot/min la temperatura de 28-30°C în decurs de 24 de ore.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea biosintezei enzimelor lipolitice în prima zi de cultivare și reducerea duratei de cultivare cu 24 de ore.

Rezultatele demonstrează că pe mediul cu biostimulatorul $[\text{Ca}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ utilizat în concentrații de 0,005, 0,010 și 0,015 g/L, sporirea activității lipolitice constituie 34,0-78,4% față de martor. Maxima de biosinteză a lipazelor la cultivare în condiții clasice constituie 34167 U/mL față de 34708-60958 U/mL în variantele experimentale, concentrația optimă fiind de 0,010 g/L. S-a relevat inclusiv faptul că activitatea variantelor experimentale deja în prima zi de cultivare prezintă valori ale activității lipolitice superioare nivelului maxim al probei martor în ziua a 2-a de cultivare. În varianta cu concentrația optimă a compusului coordinativ de 0,010 g/L în prima zi de cultivare sporul activității lipolitice este superior martorului zilei cu 93,5% și cu 78,4% față de valoarea maximă relevată la proba martor (34167 U/mL) în ziua a 2-a de cultivare, depășind totodată și mediul proxim cu 5% (60958 U/mL față de 58068 U/mL).

Creșterea activității lipolitice în variantele experimentale poate fi condiționată de prezența cationilor cobaltului (Co^{2+}) în compoziția complexului, care este cunoscut ca unul dintre microelemente cu rol biologic semnificativ pentru dezvoltarea organismelor. Sporirea randamentului lipazelor exocelulare, parțial, poate fi atribuită compoziției heterometalice a complexului utilizat, ce poate contribui la crearea unui surplus de ioni metalici cu efect de accelerare a secreției lipazelor în mediul de cultură ce favorizează procesul de sinteză a lipazelor exocelulare.

Avantajele invenției constau în obținerea de cantități sporite de enzime lipolitice în termen redus.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

În prealabil se obține suspensia de spori a tulpinii de fungi prin spălare cu apă distilată sterilă a culturii de 30 de zile, crescută pe suprafețe înclinate de maț-agar. Mediul nutritiv se prepară prin dizolvare într-un volum nu prea mare de apă potabilă a cantităților recântărite de săruri, urmată de dispersarea minuțioasă a făinii de soia, reieșind din raportul, g/L: făină de soia - 35,0; KH_2PO_4 - 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,0. Apoi 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 Erlenmeyer 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 cantitate de 5% v/v. Soluția apoasă de $[\text{Ca}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ cu o concentrație bine determinată, care să asigure valori reieșind din intervalul 0,005-0,015 g/L, se agită discret timp de 2-5 minute pe baie de apă cu ultrasunet de tip DA-968 DADI nemijlocit înainte de utilizare, după care se adaugă la mediul nutritiv concomitent cu materialul semincer. Cultivarea se realizează în condiții de agitare continuă (200 rot/min) la temperatura de 28°C timp de 24 ore.

Activitatea lipolitică maximală, determinată după gradul de hidroliză a suspensiei de ulei de măsline în alcool polivinilic până la acid oleic după metoda titrimetrică Otto-Iamada (Грачева И.М. ș.a. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. Москва, Легкая и пищевая промышленности, 1982, p.75-76), în variantele experimentale cu aplicarea compusului coordinativ $[\text{Ca}(\text{L})_3][\text{Co}(\text{NCS})_4]$ s-a marcat în prima zi de cultivare la concentrația de 0,010 g/L și constituie 60958 U/mL, față de 34167 U/mL maxima variantei control în ziua a doua de cultivare și față de 58068 U/mL în varianta proximă, depășind cu 78,4% proba control și cu 5%

nivelul analogului proxim. Diferit de martor și analogul proxim, aplicarea compusului coordinativ reduce ciclul de cultivare a producătorului cu 24 de ore (vezi Tabelul).

Tabel

Influența compusului coordinativ de Ca asupra activității lipolitice a tulpinii *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03

5

Compuși coordinativi	Conc., g/L	1-a zi		a 2-a zi	
		Activitatea, U/mL	%, față de martor	Activitatea, U/mL	%, față de martor
[Ca(L) ₃ Co(SCN) ₄]	0,005	34708	110,2/101,6	43333	126,8
	0,010	60958	193,5/178,4/105,0*	51667	151,2
	0,015	45792	145,4/134,0	59167	173,2
Martor	-	31500	100,0	34167	100,0
Procedeul conform analogului proxim				58068±162	100,0

*193,5/178,4/105,0- față de martorul zilei/față de maxima martorului (ziua a 2-a)/față de analogul proxim

Sinteza tetra(izotiocianato)cobaltat(II) de tris(dimetilpiridin-2,6-dicarboxilat)calciu

10 Amestecul mecanic din 0,05 g (0,025 mmol) de tiocianat de calciu tetrahidrat, 0,06 g (0,025 mmol) tiocianat de cobalt trihidrat și 0,15 g (0,075 mmol) de 2,6-piridindicarbonildiclorură într-un raport molar de 1:1:3 a fost suspendat în 15 mL de metanol și refluxat timp de 3 ore. Toate componentele sunt solubile în alcool. Soluția formată are o culoare albastră-violetă. Amestecul s-a filtrat și s-a lăsat la temperatura camerei pentru cristalizare. Peste 24 de ore în soluție se formează cristale albastre de forma unor prisme, potrivite pentru analiza roentghenostructurală.

15 Randamentul constituie 47% (0,11 g).

Găsit, %: C 40,57; H 2,88; Ca 4,45; Co 6,45; N 10,74.

Pentru: C₃₁H₂₇CaCoN₇O₁₂S₄

calculat, %: C 40,61; H 2,97; Ca 4,37; Co 6,43; N 10,70.

20 Spectru IR (ν, cm⁻¹): 3089sl., 3010sl., 2957sl., 2901f.sl. 2095m., 2058f.p., 1709f.p., 1588p., 1463m., 1436p., 1424umăr, 1326f.p., 1271f.p., 1205m., 1179m., 1155m., 1083m., 1013m., 994p., 951m., 871m., 845m., 826m., 796f.sl., 756p., 731p., 693p., 658m., 540sl., 499umăr, 485umăr, 478m., 434m., 429m., 404m. (intensitatea relativă a benzilor de absorbție: f.p. - foarte puternică; p. - puternică; m. - medie; sl. - slabă).

Exemplul 2

25 În restul condițiilor echivalente exemplului 1, determinarea activității lipolitice în lichidul cultural, obținut la cultivarea tulpinii la temperatura de 30°, maxima biosintezei în variantele experimentale cu aplicarea compusului coordinativ [Ca(L)₃][Co(NCS)₄] similar exemplului 1 s-a marcat în prima zi de cultivare în varianta cu concentrația de 0,010 g/L, constituind 58333 U/mL, față de 33333 U/mL maxima variantei control în ziua a doua de cultivare și față de 58068±162 U/ml în varianta analogului proxim, depășind cu 75,0% proba control și cu 0,5% nivelul analogului proxim.

35 Cercetările au fost efectuate în cadrul Proiectului Program de Stat 2020-2023 al Rep. Moldova cu cifrul 20.80009.5007.28 „Elaborarea noilor materiale multifuncționale și tehnologii eficiente pentru agricultură, medicină, tehnică și sistemul educațional în baza complexelor metalelor “s” și „d” cu liganzi polidentati” 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. Чилочи А., Тюрина Ж., Клапко С., Stratan-Binzari M., Лаблюк С., Болога О., Коропчану Э., Rija A., Булхак И. Некоторые аспекты биосинтеза внеклеточных гидролаз микромицетов из родов *Rhizopus* и *Aspergillus* в присутствии комплексных соединений кобальта(III) с фторсодержащими анионами. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții, 2010, nr. 1(310), p. 121-128, regăsit în Internet la 20.06.2022, URL: <https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/238>
4. MD 2709 F1 2005.02.28

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *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, (NH₄)₂SO₄ - 1,0, KH₂PO₄ - 5,0, cu adăugarea concomitentă a 0,010 g/L de [Ca(L)₃][Co(NCS)₄], unde L este dimetilpiridin-2,6-dicarboxilat, și cultivarea la agitare continuă de 180-200 rot/min la temperatura de 28-30°C în decurs de 24 de ore.