



MD 4108 B1 2011.04.30

## REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4108 (13) B1

(51) Int. Cl.: C12N 1/12 (2006.01)  
C07F 15/06 (2006.01)  
C07C 215/12 (2006.01)  
C07C 215/14 (2006.01)

MD 4108 B1 2011.04.30

## (12) BREVET DE INVENȚIE

<b>Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării</b>	
(21) Nr. depozit: a 2010 0105 (22) Data depozit: 2010.09.27	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.04.30, BOPI nr. 4/2011
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BULIMAGA Valentina, MD; RUDIC Valeriu, MD; EFREMOVA Nadejda, MD; DJUR Svetlana, MD; ELENCIUC Daniela, MD; BIVOL Cezara, MD; LOZAN Vasile, MD; BOLOGA Olga, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*

## (57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* pentru obținerea biomasei cu un conținut sporit de ficobiliproteine.

Procedeul de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* include cultivarea timp de 6 zile pe un mediu nutritiv, conținând, g/L:  
NaNO<sub>3</sub> – 2,5; NaHCO<sub>3</sub> – 16,8; NaCl – 1,0;  
K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O – 1,0;  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,20; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,04;  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,00286; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0,00181;

2  
ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,00022; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,00008; MoO<sub>3</sub> – 0,000015, 1mL/L de soluție FeHEDTA de 0,09 M și apă distilată până la 1 L. In prima zi de cultivare in mediul nutritiv se adaugă tiosemicarbaziddiacetatetilendiamina Co(III) trihidrat cu formula[Co(L-H)En]·3H<sub>2</sub>O, unde:

5  
L – H<sub>2</sub>N-CS-NH-N(CH<sub>2</sub>COOH) și En – H<sub>2</sub>N-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, in cantitate de 10...20 mg/L, totodată cultivarea se efectuează la iluminarea de 3000...4500 lx și temperatura de 25...30°C.

10  
15  
Revendicări: 1

#### (54) Process for cultivation of cyanobacterium *Spirulina platensis*

##### (57) Abstract:

1 The invention relates to biotechnology, in particular to a process for cultivation of cyanobacterium *Spirulina platensis* for the obtaining of biomass with high content of phycobiliproteins.

The process for cultivation of cyanobacterium *Spirulina platensis* includes cultivation during 6 days on a nutrient medium, containing, g/L: NaNO<sub>3</sub> – 2.5, NaHCO<sub>3</sub> – 16.8; NaCl – 1.0; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O – 1.0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.20; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0.04; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0.00286; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0.00181; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.00022; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0.00008; MoO<sub>3</sub> – 0.000015, 1 ml/L of FeHEDTA solution of

2 0.09 M and distilled water up to 1 L. On the first day of cultivation in the nutrient medium is added thiosemicarbazidediacetateethylenediamine Co(III) trihydrate with the formula [Co(L-H)En]·3H<sub>2</sub>O, where:

5 L – H<sub>2</sub>N-CS-NH-N(CH<sub>2</sub>COOH) and En – H<sub>2</sub>N-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, in the quantity of 10...20 mg/L, at the same time the cultivation is carried out at the light of 3000...4500 lx and the temperature of 25...30°C.

15 Claims: 1

#### (54) Способ культивирования цианобактерии *Spirulina platensis*

##### (57) Реферат:

1 Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу культивирования цианобактерии *Spirulina platensis* для получения биомассы с высоким содержанием фикобилипротеинов.

Способ культивирования цианобактерии *Spirulina platensis* включает культивирование в течение 6 дней на питательной среде, содержащей, г/л: NaNO<sub>3</sub> – 2,5; NaHCO<sub>3</sub> – 16,8; NaCl – 1,0; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O – 1,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,20; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,04; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,00286; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0,00181; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,00022; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,00008; MoO<sub>3</sub> –

2 0,000015, 1мл/л раствора FeHEDTA 0,09 М и дистиллированную воду до 1 л. В первый день культивирования в питательную среду добавляют 10...20 мг/л тиосемикарбазид-диацетатэтилендиамин Со(III) тригидрат с формулой [Со(L-Н)En]·3Н<sub>2</sub>О, где L – Н<sub>2</sub>Н-СS-НН-Н(СН<sub>2</sub>СООН) и En – Н<sub>2</sub>Н-С<sub>2</sub>Н<sub>4</sub>-НН<sub>2</sub>, при этом культивирование осуществляют при освещении 3000...4500 люкс и температуре 25...30°С.

15 П. формулы: 1

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* pentru obținerea biomasei cu un conținut sporit de ficobiliproteine.

5 Ficobiliproteinele – pigmenți cu o colorație intensă și capacități fluorescente, sunt pe larg utilizate în industria cosmetică, medicină, imunodiagnostică, manifestând proprietăți antiinflamatoare, neuro- și hepatoprotectoare, antioxidante, etc. Conform datelor din literatură, ficocianina neutralizează peroxinitritul, radicalii hidroxil și peroxil, totodată inhibă procesele de oxidare peroxidică a lipidelor. Aplicarea terapiei antioxidante cu  
10 utilizarea ficobiliproteinelor este eficientă în tratarea afecțiunilor patologice ale organismului uman și contribuie la diminuarea riscului dezvoltării diferitor boli, inclusiv oncologice.

Este cunoscut un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de ficobiliproteine, care include: cultivarea ei pe un mediu nutritiv cu  
15 următorul conținut al ingredientelor (g/L): NaHCO<sub>3</sub> – 16,8; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O – 1,0; NaNO<sub>3</sub> – 2,5; NaCl – 1,0; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1,0; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,04; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,20; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,00286; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0,00181; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,00022; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,00008; MoO<sub>3</sub> – 0,000015. În a treia zi de cultivare în acest mediu se adaugă unul dintre compușii coordinativi: azotat de hexa-μ-glicinato(O,O')-μ<sub>3</sub>-oxotriacvotrițier(III)trihidrat -  
20 [Fe<sub>3</sub>O(Gly)<sub>6</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O, hexa-μ-treoninato(O,O')-μ<sub>3</sub>-oxotriacvotrițier(III)-[Fe<sub>3</sub>O(Tre)<sub>6</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub> sau de hexa-μ-alaninato(O,O')-μ<sub>3</sub>-oxotriacvotrițier(III)trihidrat-[Fe<sub>3</sub>O(Ala)<sub>6</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub>·4H<sub>2</sub>O în cantitate de 5...10 mg/L, cultivarea se realizează timp de 6 zile, la temperatura de 30...35°C și iluminarea de 3000...4000 lx [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că biomasa obținută de spirulină conține  
25 doar 21,68% de ficobiliproteine.

Mai este cunoscut un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea spirulinei pe un mediu nutritiv cu următorul conținut al ingredientelor (g/L): NaNO<sub>3</sub> – 2,5; NaHCO<sub>3</sub> – 16,8; NaCl – 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O – 1,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,20; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,04; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,00286; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0,00181; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,00022; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,00008; MoO<sub>3</sub> – 0,000015; 1 ml soluție FeHEDTA de 0,09M, apă distilată până la 1L și compusul coordinativ al Cu(II)hidrat nitrului de 5-nitrosalicilidentiosemicarbazido(1-)aquadupru(II) în calitate de regulator al conținutului de ficobiliproteine suplimentat la mediu în a 2-a zi de cultivare în concentrație de 3...4 mg/L; cultivarea se efectuează la o temperatură de 30...35°C și iluminare continuă de 2000...3000  
30 lx în primele 2 zile și de 3000...4000 lx în următoarele zile, la pH 9,5...10,0. Procedul asigură un conținut de ficobiliproteine ce constituie 27,50...30,33% din biomasa [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că se obține un conținut de ficobiliproteine de cel mult 30,33% și o productivitate joasă a spirulinei din cauza acțiunii toxice a cuprului. De aceea rentabilitatea procedului la 1L de mediu este relativ joasă. De  
40 asemenea, biomasa obținută prin aplicarea acestui procedeu poate fi caracterizată prin acțiunea toxică datorită prezenței ionilor de cupru.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care să asigure o productivitate semnificativ mai înaltă și un conținut mai sporit de ficobiliproteine, demonstrând o sporire evidentă a  
45 rentabilității la utilizarea acestui procedeu.

Procedul de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, conform invenției, include cultivarea pe un mediu nutritiv, conținând, g/L: NaNO<sub>3</sub> – 2,5; NaHCO<sub>3</sub> – 16,8; NaCl – 1,0; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O – 1,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,20; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,04; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,00286; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0,00181; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,00022; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,00008; MoO<sub>3</sub> – 0,000015, 1mL/L de soluție FeHEDTA de 0,09 M, apă distilată până la 1 L și un compus coordinativ, timp de 6 zile. În calitate de compus coordinativ se utilizează tiosemicarbaziddiacetatetilendiamina Co(III) trihidrat cu formula[Co(L-H)En]·3H<sub>2</sub>O, unde: L – H<sub>2</sub>N-CS-NH-N(CH<sub>2</sub>COOH) și En – H<sub>2</sub>N-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, care se adaugă în mediul nutritiv în prima zi de cultivare în cantitate de 10...20 mg/L, totodată cultivarea se efectuează la  
55 iluminarea de 3000...4500 lx și temperatura de 25...30°C (Болога О., Кравцов В., Лозан В., Гэрбэлэу Н., Симонов Ю., Малиновский Т. Синтез и строение комплекса кобальта

(III) с тиосемикарбазиддиуксусной кислотой и этилендиамином. Коорд.химия.1992, т. 18, № 2, с.144-149).

Rezultatul tehnic obținut în comparație cu cea mai apropiată soluție constă în asigurarea unei majorări a conținutului de ficobiliproteine în biomasa de spirulină până la 32,64...38,66% din biomasa absolut uscată (BAU). Conținutul de ficobiliproteine obținut la 1L de mediu sporește de 1,88...2,30 ori, datorită faptului că productivitatea spirulinei la adăugarea compusului tiosemicarbaziddiacetatetilendiamina Co(III) trihidrat în cantitate de 10...20 mg/L, este de 1,76...1,80 ori mai mare în comparație cu soluția cea mai apropiată.

Rezultatul tehnic se datorează faptului că compusul coordinativ al Co(II) provoacă stimularea transportului de electroni în aparatul fotosintetic al celulelor de spirulină, ca urmare celulele posedă o fluiditate mai mare a membranei tilacoizilor, precum și stimularea inducerii sintezei hem oxigenazei, ceea ce cauzează sporirea nivelului de ficocianină.

*Exemple de realizare a invenției*

*Exemplul 1*

Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență (g/L):  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{NaHCO}_3$  – 16,8;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,20;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,04;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,00286;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,00181;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,00022;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,00008;  $\text{MoO}_3$  – 0,000015, 1ml/L de soluție FeHEDTA de 0,09 M, apă distilată până la 1 L.

La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40 g/L. În prima zi de cultivare, suspensia de spirulină se suplimentează cu 10 mg/L de tiosemicarbaziddiacetatetilendiamina Co(III) trihidrat. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 250 ml cu 100 ml suspensie la o iluminare continuă de 3000...4500 lx și o temperatură de 25°C. La a șasea zi biomasa se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se determină conținutul de ficobiliproteine. Biomasa obținută conține 32,64% ficobiliproteine din BAU.

*Exemplul 2*

Se prepară mediul mineral nutritiv SP-1 cu următoarea componență (g/l):  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{NaHCO}_3$  – 16,8;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,20;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,04;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,00286;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,00181;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,00022;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,00008;  $\text{MoO}_3$  – 0,000015, 1 ml soluție FeHEDTA de 0,09 M și apă distilată până la 1L.

La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40 g/L. În prima zi de cultivare, suspensia de spirulină se suplimentează cu 20 mg/L de tiosemicarbaziddiacetatetilendiamina Co(III) trihidrat. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 250 ml cu 100 ml suspensie la o iluminare continuă de 3000...4500 lx și o temperatură de 25°C. La a șasea zi biomasa se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se determină conținutul de ficobiliproteine. Biomasa obținută conține 38,66% ficobiliproteine din BAU.

Rezultatele referitoare la conținutul ficobiliproteinelor în biomasa spirulinei cultivate conform procedurii propus în invenție și celei mai apropiate soluții sunt prezentate în tabel.

Conținutul ficobiliproteinelor în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* cultivate conform procedurii propus în invenție și celei mai apropiate soluții

45

Procedeu aplicat	Compusul	Concentrația compusului, mg/L	Productivitatea în a 6 zi, g/L	Conținutul ficobiliproteinelor, % din BAU	Conținutul Ficobiliproteinelor, g/L
Conform celei mai apropiate soluții	Hidratul nitrului de 5-nitrosalicilidentio-semicarbazido(1-) aquacupru(II)	4	0,90	30,33±0,130	0,27
Conform invenției	Tiosemicarbaziddiacetatetilendiamina Co(III) trihidrat	10 20	1,59 1,60	32,64±0,092 38,66±0,078	0,51 0,62

5 Datele din tabel demonstrează că productivitatea spirulinei obținute la administrarea compusului tiosemicarbazid diacetatetilendiamina Co(III) trihidrat în concentrație de 10...20 mg/l este de 1,76...1,80 ori mai mare în comparație cu cea mai apropiată soluție. Ca urmare, conținutul de ficobiliproteine în biomasa de spirulină obținută din 1L de mediu conform procedurii propus în invenție față de soluția cea mai apropiată sporește de 1,88...2,30 ori ce constituie 32,64...38,66% din BAU.

10

**(56) Referințe bibliografice citate în descriere:**

1. MD 2386 C2 2003.02.28
2. MD 167 Y 2011.03.31

**(57) Revendicări:**

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea pe un mediu nutritiv, conținând, g/L:  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{NaHCO}_3$  – 16,8;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,20;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,04;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,00286;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,00181;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,00022;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,00008;  $\text{MoO}_3$  – 0,000015, 1mL/L de soluție FeHEDTA de 0,09 M, apă distilată până la 1 L și un compus coordinativ, timp de 6 zile, **caracterizat prin aceea că** în calitate de compus coordinativ se utilizează tiosemicarbazid diacetatetilendiamina Co(III) trihidrat cu formula  $[\text{Co}(\text{L}-\text{H})\text{En}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , unde: L –  $\text{H}_2\text{N}-\text{CS}-\text{NH}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})$  și En –  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{NH}_2$ , care se adaugă în mediul nutritiv în prima zi de cultivare în cantitate de 10...20 mg/L, totodată cultivarea se efectuează la iluminarea de 3000...4500 lx și temperatura de 25...30°C.

<b>Șef Secție:</b>	COLESNIC Inesa
<b>Examinator:</b>	GORDIENCO Maria
<b>Redactor:</b>	LOZOVANU Maria