



MD 4108 C1 2011.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4108** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/12* (2006.01)
C07F 15/06 (2006.01)
C07C 215/12 (2006.01)
C07C 215/14 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2010 0105 (22) Data depozit: 2010.09.27</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.04.30, BOPI nr. 4/2011</p>
<p>(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</p>	

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

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, în parti-
cular la un procedeu de cultivare a ciano-
bacteriei *Spirulina platensis* pentru obținerea
biomasei cu un conținut sporit de ficobili-
proteine.

Procedeu de cultivare a cianobacteriei
Spirulina platensis include cultivarea timp de
6 zile pe un mediu nutritiv, conținând, g/L:
NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0;
K₂SO₄ – 1,0; K₂HPO₄·3H₂O – 1,0;
MgSO₄·7H₂O – 0,20; CaCl₂·6H₂O – 0,04;
H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181;

2
ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O –
0,00008; MoO₃ – 0,000015, 1mL/L de soluție
5 FeHEDTA de 0,09 M și apă distilată până la 1
L. In prima zi de cultivare in mediul nutritiv se
adaugă tiosemicarbaziddiacetatetilendiamina
10 Co(III) trihidrat cu formula[Co(L-H)En]·3H₂O,
unde:

15
L – H₂N-CS-NH-N(CH₂COOH) și En –
H₂N-C₂H₄-NH₂, in cantitate de 10...20 mg/L,
totodată cultivarea se efectuează la iluminarea
de 3000...4500 lx și temperatura de 25...30°C.

Revendicări: 1

MD 4108 C1 2011.11.30

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

(57) Abstract:

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: NaNO₃ – 2.5; NaHCO₃ – 16.8; NaCl – 1.0; K₂SO₄ – 1.0; K₂HPO₄·3H₂O – 1.0; MgSO₄·7H₂O – 0.20; CaCl₂·6H₂O – 0.04; H₃BO₃ – 0.00286; MnCl₂·4H₂O – 0.00181; ZnSO₄·7H₂O – 0.00022; CuSO₄·5H₂O –

0.00008; MoO₃ – 0.000015, 1 ml/L of FeHEDTA solution of 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]·3H₂O, where:

L – H₂N-CS-NH-N(CH₂COOH) and En – H₂N-C₂H₄-NH₂, 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.

Claims: 1

(54) Способ культивирования цианобактерии *Spirulina platensis*

(57) Реферат:

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: NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; K₂HPO₄·3H₂O – 1,0; MgSO₄·7H₂O – 0,20; CaCl₂·6H₂O – 0,04; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ –

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 тиосемикарбазиддиацетатэтилендиамин Со(III) тригидрат с формулой [Со(L-Н)En]·3Н₂О, где L – Н₂Н-СS-НН-Н(СН₂СООН) и En – Н₂Н-С₂Н₄-НН₂, при этом культивирование осуществляют при освещении 3000...4500 люкс и температуре 25...30°C.

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 anti-inflamatoare, 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 utilizarea ficobiliproteinelor este eficientă în tratarea afecțiunilor patologice ale organismului uman și contribuie la diminuarea riscului dezvoltării diferitor boli, inclusiv oncologice.

10 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 următorul conținut al ingredientelor (g/L): NaHCO₃ – 16,8; K₂HPO₄·3H₂O – 1,0; NaNO₃ – 2,5; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; CaCl₂·6H₂O – 0,04; MgSO₄·7H₂O – 0,20; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015. În a treia zi de cultivare în acest mediu se adaugă unul dintre compușii coordinațivi: azotat de hexa-μ-glicinato(O,O')-μ₃-oxotriacvotrifier(III)trihidrat - [Fe₃O(Gly)₆(H₂O)₃]NO₃·3H₂O, hexa-μ-treoninato(O,O')-μ₃-oxotriacvotrifier(III)-[Fe₃O(Tre)₆(H₂O)₃]NO₃ sau de hexa-μ-alaninato(O,O')-μ₃-oxotriacvotrifier(III)trihidrat-[Fe₃O(Ala)₆(H₂O)₃]NO₃·4H₂O 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 doar 21,68% de ficobiliproteine.

25 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): NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0; K₂HPO₄·3H₂O – 1,0; MgSO₄·7H₂O – 0,20; CaCl₂·6H₂O – 0,04; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015; 1 ml soluție FeHEDTA de 0,09M, apă distilată până la 1L și compusul coordinațiv al Cu(II) hidrat al nitrului de 5-nitrosalicilidentiosemicarbazido(1-)aquacupru 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 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 biomasă [2].

35 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 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 rentabilității la utilizarea acestui procedeu.

45 Procedul de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, conform invenției, include cultivarea pe un mediu nutritiv, conținând, g/L: NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; K₂HPO₄·3H₂O – 1,0; MgSO₄·7H₂O – 0,20; CaCl₂·6H₂O – 0,04; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015, 1ml/L de soluție FeHEDTA de 0,09 M, apă distilată până la 1 L și un compus coordinațiv, timp de 6 zile. În calitate de compus coordinațiv se utilizează tiosemicarbazid-diacetatetilendiamina Co(III) trihidrat cu formula[Co(L-H)En]·3H₂O, unde: L – H₂N-CS-NH-N(CH₂COOH) și En – H₂N-C₂H₄-NH₂, 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. Informația privind compusul coordinațiv și sinteza acestuia este descrisă în (Болога О., Кравцов В., Лозан В., Гэрбэлэу Н., Симонов

Ю., Малиновский Т. Синтез и строение комплекса кобальта (III) с тиосемикарбазид-диуксусной 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(III) 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): NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; K₂HPO₄·3H₂O – 1,0; MgSO₄·7H₂O – 0,20; CaCl₂·6H₂O – 0,04; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 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 nutritiv cu următoarea componență (g/l): NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; K₂HPO₄·3H₂O – 1,0; MgSO₄·7H₂O – 0,20; CaCl₂·6H₂O – 0,04; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 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

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-nitrosalicilid-entio- semicarbazido(1-) aquacupru(II)	4	0,90	30,33±0,130	0,27
Conform invenției	Tiosemicarbaziddiacetatetilendiamina Co(III) trihidrat	10	1,59	32,64±0,092	0,51
		20	1,60	38,66±0,078	0,62

- 5 Datele din tabel demonstrează că productivitatea spirulinei obținute la administrarea compusului tiosemicarbaziddiacetatetilendiamina 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 și 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: NaNO_3 – 2,5; NaHCO_3 – 16,8; NaCl – 1,0; K_2SO_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; H_3BO_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; 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 tiosemicarbaziddiacetatetilendiamina 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.

Șef Secție:	COLESNIC Inesa
Examinator:	GORDIENCO Maria
Redactor:	LOZOVANU Maria