



MD 4616 C1 2019.08.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4616** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/20* (2006.01)  
*C12P 19/00* (2006.01)

### (12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2018 0013 (22) Data depozit: 2018.03.02	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.01.31, BOPI nr. 1/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: DOBROJAN Sergiu, MD; ȘALARU Victor, MD; STRATULAT Irina, MD; DOBROJAN Galina, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Tulpină de microalgă cianofită *Calothrix gracilis* F. E. Fritsch - sursă de  
glucide

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, și  
anume la o tulpină de microalgă cianofită,  
care poate fi utilizată în industria  
microbiologică pentru obținerea glucidelor,  
utilizate în industria farmaceutică și  
alimentară, zootehnie, fitotehnie.

2  
Tulpina de microalgă cianofită *Calothrix  
gracilis* F. E. Fritsch este depozitată în  
Colecția Națională de Microorganisme  
Nepatogene cu numărul CNMN-CB-19 și  
poate fi utilizată în calitate de sursă de glucide.  
Revendicări: 1

MD 4616 C1 2019.08.31

**(54) Strain of blue-green microalga *Calothrix gracilis* F. E. Fritsch - source of carbohydrates**

**(57) Abstract:**

1  
The invention relates to biotechnology, in particular to a new strain of blue-green microalga, which can be used in the microbiological industry for the production of carbohydrates used in the pharmaceutical and food industry, zootechny, phytotechny.

2  
The strain of blue-green microalga *Calothrix gracilis* F. E. Fritsch is deposited in the National Collection of Nonpathogenic Microorganisms under the number CNMN-CB-19 and can be used as a source of carbohydrates.

Claims: 1

**(54) Штамм сине-зелёной микроводоросли *Calothrix gracilis* F. E. Fritsch - источник углеводов**

**(57) Реферат:**

1  
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к новому штамму сине-зелёной микроводоросли, которая может быть использована в микробиологической промышленности для получения углеводов, используемых в фармацевтической и пищевой промышленности, зоотехнии, фитотехнии.

2  
Штамм сине-зелёной микроводоросли *Calothrix gracilis* F. E. Fritsch депонирован в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов под номером CNMN-CB-19 и может быть использован в качестве источника углеводов.

П. формулы: 1

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

5 Invenția se referă la biotehnologie, în particular la o tulpină de microalgă cianofită, care poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea glucidelor, cu aplicare în industria farmaceutică (sursă pentru obținerea preparatelor farmaceutice cu conținut major de glucide), alimentară (ca supliment la brânzeturi, iaurturi, creme alimentare), zootehnie (ca sursă nutritivă pentru animale), fitotehnie (ca sursă pentru obținerea preparatelor stimulative de creștere a plantelor) etc.

10 Glucidele din biomasa algală sunt importante pentru organismele animale, în special pentru organismul uman, precum și pentru cele vegetale servind ca sursă de energie și de structură în celulele lor. Administrarea glucidelor din biomasa algală organismelor animale contribuie la menținerea temperaturii corpului și la întreținerea funcțiilor vitale, și anume funcționarea eficientă a sistemului nervos, creierului, inimii, plămânilor, rinichilor, intestinului și celulelor sangvine.

15 Glucidele algale pot fi utilizate și ca sursă pentru menținerea funcțiilor membranei celulare, a țesutului conjunctiv, a țesutului nervos, influențând pozitiv și asupra hormonilor, enzimelor și anticorpilor.

Este cunoscută o tulpină de algă specia *Calothrix fusca* care poate fi utilizată în calitate de sursă de glucide [1].

20 Dezavantajul principal al tulpinii cunoscute este faptul că aceasta posedă o cantitate redusă de glucide, doar 19,5%, și are o toleranță redusă față de condițiile de cultivare.

Cea mai apropiată după esența tehnică și rezultatul obținut este tulpina algei specia *Calothrix elenkinii* Kossinsk. CNMN-CB-14, care conține în biomasa ei 52,90...66,00% glucide [2].

25 Dezavantajul acestei tulpini este faptul că aceasta se dezvoltă într-un interval mic al condițiilor de cultivare (temperatura în soluția proximală 24...29°C, iar în invenție 15...30°C; iluminarea la soluția proximală 1000...2000 lx, iar în invenție 500...5000 lx) și are o durată redusă a reînsămânțării pe mediu nutritiv (la soluția proximală 10...5 zile, iar în invenție 25 zile ...6 luni).

30 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului tulpinilor de microalge ca surse de glucide.

Invenția soluționează problema prin aceea că se propune o tulpină nouă de microalgă cianofită *Calothrix gracilis* F.E.Fritsch, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei cu numărul CNMN-CB-19, ca sursă de glucide.

35 Rezultatul tehnic al invenției constă în faptul că biomasa tulpinii propuse are un conținut înalt de glucide (58,10...60,00%), posedă o toleranță majoră față de condițiile de cultivare (la temperatură și iluminare) și se menține în cultură o perioadă mai îndelungată (se reînsămânțează peste o perioadă mai mare).

40 Rezultatul tehnic obținut se datorează particularităților biochimice specifice tulpinii, în special sinteza majoră a glucidelor din contul intensificării procesului de fotosinteză în celulele tulpinii.

Exemplu de realizare a invenției

45 Tulpina propusă – *Calothrix gracilis* F.E.Fritsch, a fost izolată din mostre de sol colectate din serele întreprinderii SRL "Fruct Agro Com" situate în s. Bardar, rml Ialoveni, Republica Moldova, la aplicarea metodei de obținere a monoculturilor din culturi brute dense pe medii nutritive lichide și solide.

50 Pentru cultivarea tulpinii *Calothrix gracilis* F.E.Fritsch CNMN-CB-19 este necesar de a respecta următoarele condiții: temperatura minimă de +15°C, maximă de + 30°C, iluminarea la inocularea tulpinii de minim 500 lx, în faza exponențială de creștere 5000 lx. Tulpina poate fi cultivată fără a fi agitată pe perioada de cultivare. Mediul nutritiv lichid utilizat pentru cultivarea tulpinii este mediul Z-8 care se prepară prin adăugarea a 10 ml soluție 1 + 10 ml soluție 2 + 10 ml soluție 3 + 1 ml soluție IV, se aduce până la un litru cu apă distilată, se autoclavează, PH între 6...7.

55

# MD 4616 C1 2019.08.31

4

Soluția 1 mediul Z 8

Ingredientul	Cantitatea, g/l
NaNO <sub>3</sub>	46,7
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5,9
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,5

Soluția 2 mediul Z 8

5

Ingredientul	Cantitatea, g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,1

Soluția 3 mediul Z 8

10 Soluția 3 mediul Z 8 se prepară prin adăugarea a 10 ml sol. A + 9,5 ml sol. B, se aduce până la un litru cu apa distilată. Soluția A se prepară astfel: 2,8 g FeCl<sub>3</sub> se dizolvă în 100 ml 0,1N HCl. Soluția B se prepară astfel: 2,9 g EDTANa<sub>2</sub> se dizolvă în 100 ml 0,1 N NaOH.

Soluția 4 mediul Z-8

Pentru obținerea soluției 4 se adaugă într-un vas cu volumul de un litru câte 1 ml din soluțiile nr. 1-10 și 12 + 10 ml sol. nr. 11 + 100 ml sol. nr.13, aducem cu apă distilată până la un litru.

Nr.	Ingredientul	Cantitatea, g/100 ml
1	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,033
2	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,880
3	KBr	1,2
4	KI	0,83
5	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,87
6	Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,55
7	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,46
8	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,25
9	NiSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,98
10	Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0,41
11	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,089
12	KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	4,74
13	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	31 1,6 g/l

15

Pentru prepararea mediului nutritiv solid in mediul nutritiv lichid Z-8 se adaugă agar în doză de 15 g/l, după care mediul se încălzește până la fierbere pentru dizolvarea agarului și se lasă să fiarbă timp de 5 min.

20

Tulpina se caracterizează prin capacitatea de sinteză sporită a glucidelor, cantitatea cărora este de 58,10...60,00%.

25

Caracterele morfologo-culturale ale tulpinii: tulpina are talul microscopic, este grupată în colonii, este filamentoasă, are o culoare verde închis. Filamentele sunt singulare sau mai multe împreună, în mare parte neramificate, drepte sau puțin curbate, cele bătrâne ating până la 400 μ lungime, la bază 5 μ lățime (mai rar lărgite până la 8...10 μ). Filamentele tinere sunt formate de obicei din cate 2...6 celule și în funcție de condițiile de cultivare, mediul nutritiv și faza de dezvoltare pot avea la capăt heterociști. În procesul de îmbătrânire a culturii se atestă majorarea lungimii filamentelor. În condiții neprielnice tulpinii filamentele ei își pierd culoarea. Filamentele posedă teaca mucilaginoasă incoloră, subțire. Trihomii practic nu sunt strangulați, cu excepția regiunii pereților celulari, unde în partea de jos sunt strangulați, nu formează perișori și se termină cu o celulă terminală conică. Trihomii au lățimea la bază de 5 μ (mai rar de 8...9 μ), la mijloc de 2,5...3 μ lățime. Procesul de creștere a trihomilor este simetric. Celulele din partea superioară a filamentului sunt întotdeauna alungite. Celulele vegetative la bază sunt scurtate, mai departe se alungesc. Celulele vegetative în general au lungimea cuprinsă între 2,5...15 μ, iar lățimea se situează în intervalul 2,5...8,75 μ. În faza de îmbătrânire a celulelor sau în condiții neprielnice se manifestă modificări morfologice caracterizate prin majorarea lățimii și diferențierea slabă a

35

peretelui celular despărțitor al celulelor vegetative, precum și modificarea culorii din verde închis în verde deschis sau chiar devin transparente. Reproducerea celulelor tulpinii are loc prin intermediul hormogonilor care reprezintă fragmente prin care se rup trihomii. La inițierea procesului de reproducere se atestă evidențierea slabă a diferențierii celulelor prin distrugerea peretelui celular despărțitor. Hormogonii la unele filamente se formează la capătul filamentului (lângă heterociști) și pe la jumătatea filamentului. Hormogonii sunt formați din 2...3 sau mai multe celule vegetative. Din hormogoni cresc filamente noi ale tulpinii care inițial sunt puțin curbate, după care capătă o formă mai dreaptă.

Heterociștii sunt bazali (în cazul unor filamente mai lungi uneori sunt și intercalare), mai des sunt singurari, au dimensiuni cuprinse între 5...8,7  $\mu$  lățime și 3,6...7,5  $\mu$  lungime. Tulpina formează exosporii. Sporii se formează din celulele vegetative ale tulpinii și sunt mai mari decât acestea, după formă la fel se deosebesc de celulele vegetative câte 2 la rând. Sporii au formă cilindrică cu dimensiunile de 7,5...9  $\mu$  lungime, și 3,6...7,5  $\mu$  lățime, posedă o membrană exterioră netedă (forma). Sporii se formează intens, îndeosebi în procesul de îmbătrânire a culturii sau în condiții neprielnice pentru creștere.

Caracterele fiziologo-biochimice ale tulpinii: substanțele biologic active ce intră în componența tulpinii date sunt: proteine 19,70...20,40%; lipide 2,00...5,00%; glucide 58,10...60,00%.

Produsul sintetizat de tulpină: proteine în cantitate de 19,70...20,40%; lipide 2,00...5,00%; glucide 58,10...60,00%.

Parametrii productivi ai tulpinii: se inoculează 0,4 g/l biomasă vie sau biomasă absolut uscată. La cultivarea tulpinii în condiții optime de temperatură și iluminare biomasa algală se majorează de 5...8 ori până la sfârșitul fazei exponențiale de creștere.

Metoda de determinare a activității tulpinii: microscopierea directă a tulpinii.

Condițiile și componența mediilor pentru păstrarea îndelungată a tulpinii: condițiile de păstrare a tulpinii sunt: temperatura camerei, iluminarea de 300...500 lx, însămânțarea fiind efectuată odată în 6 luni.

Mediul nutritiv pentru păstrarea tulpinii: mediul solid Drew cu următoarea componență chimică:  $K_2HPO_4$  0,2g/l;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g/l;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  – urme;  $FeCl_3$  – urme. Tulpina *Calothrix gracilis* F.E.Fritsch se păstrează în eprubete înclinate ce conțin mediul nutritiv menționat cu respectarea condițiilor de păstrare, însămânțarea fiind efectuată odată la 6 luni. Tulpina poate fi menținută pe mediul nutritiv menționat și în cești Petri, în aceleași condiții de păstrare, însămânțarea fiind efectuată odată la 25 zile. Tulpina *Calothrix gracilis* F.E.Fritsch CNMN-CB-19 poate fi păstrată și pe mediul nutritiv Drew lichid la temperatura camerei cu inocularea repetată peste o perioadă de 4 luni.

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

1. Rajeshwari Karath Rama, Rajashekhar Madaiah. Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from different aquatic habitats of western ghats, southern India. Brazilian Archives of Biology and Technology. vol. 54, n.5, 2011, p. 849-857
2. MD 4351 B1 2015.06.30

#### (57) Revendicări:

Tulpină de microalgă cianofită *Calothrix gracilis* F. E. Fritsch CNMN-CB-19 în calitate de sursă de glucide.