



MD 4669 B1 2019.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4669** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/20* (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2018 0091 (22) Data depozit: 2018.10.25	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.12.31, BOPI nr. 12/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: ȘALARU Victor, MD; DOBROJAN Sergiu, MD; COSTICA Mihai, RO; SEMENIUC Evgheni, MD; CIOBANU Eugeniu, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Tulpină de microalgă cianofită *Nostoc punctiforme* (Kützing) Hariot - sursă de proteine

(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 proteinelor, utilizate în industria farmaceutică și alimentară, zootehnie, fitotehnie.

2
Tulpina de microalgă cianofită *Nostoc punctiforme* (Kützing) Hariot este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene cu numărul CNMN-CB-21 și poate fi utilizată în calitate de sursă de proteine.

Revendicări: 1

MD 4669 B1 2019.12.31

(54) Strain of blue-green microalga *Nostoc punctiforme* (Kutzing) Hariot - source of proteins

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, namely to a strain of blue-green microalga, which can be used in microbiological industry to produce proteins used in the pharmaceutical and food industries, zootechny, phytotechny.

2
The strain of blue-green microalga *Nostoc punctiforme* (Kutzing) Hariot is deposited in the National Collection of Nonpathogenic Microorganisms under the number CNMN-CB-21 and can be used as a source of proteins.

Claims: 1

(54) Штамм сине-зеленой микроводоросли *Nostoc punctiforme* (Kutzing) Hariot - источник белков

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к штамму сине-зелёной микроводоросли, который может быть использован в микробиологической промышленности для получения белков, используемых в фармацевтической и пищевой промышленности, зоотехнии, фитотехнии.

2
Штамм сине-зелёной микроводоросли *Nostoc punctiforme* (Kutzing) Hariot депонирован в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов под номером CNMN-CB-21 и может быть использован в качестве источника белков.

П. формулы: 1

Descriere:
(Descrierea se publică în redacția solicitantului)

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

10 Proteinele din biomasa algală sunt importante pentru organismele animale, în special pentru cel al omului și cele vegetale servind ca sursă pentru menținerea în stare funcționabilă bună a structurii membranelor celulare, pentru exercitarea catalizei fermentative, pentru asigurarea capacității contractile și locomotoare (dinamice) a celulelor, asigurarea transportului și depozitarea unor compuși chimici, pentru protejarea celulelor de corpii străini, pentru reglarea creșterii și diferențierii celulelor, ele asigură transmiterea impulsului nervos în sinapse, au rol energetic.

15 Este cunoscută o tulpină de algă specia *Oscillatoria foreaui* care poate fi utilizată în calitate de sursă de proteine [1].

20 Dezavantajul principal al tulpinii cunoscute este faptul că aceasta posedă o cantitate redusă de proteine, doar 6,9 %.

Este cunoscută tulpina algei specia *Spirogyra varians*, care conține în biomasa ei 16,70% proteine [2].

Dezavantajul acestei tulpini este faptul că aceasta posedă, la fel, o cantitate mică de proteine în biomasa.

25 Cea mai apropiată după esența tehnică și rezultatul obținut este tulpina algei specia *Nostoc flagelliforme*, care conține în biomasa ei 21,75-37,85% proteine [3].

Dezavantajul acestei tulpini este faptul că cultivarea ei este mai dificilă deoarece preferă condiții de iluminare majoră de minim 2000 lux, temperaturi ridicate, minim 25°C și necesită agitare periodică.

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

35 Esența invenției constă în faptul că se propune o tulpină nouă de microalgă cianofită *Nostoc punctiforme* (Kützing) Hariot, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie cu numărul CNMN-CB-21 (data depozitării 11.05.2017) – sursă de proteine.

40 Rezultatul tehnic al invenției constă în faptul că biomasa tulpinii propuse de *Nostoc punctiforme* (Kützing) Hariot are un conținut sporit de proteine (18,50-24,00%) și poate fi cultivată în condiții de iluminare și temperatură redusă, fără agitare; tulpina propusă se cultivă la iluminare minimă de 500 lux, temperatură minimă de 15°C și nu necesită agitare.

45 Rezultatul tehnic obținut se datorează particularităților morfologice, fiziologice și biochimice specifice tulpinii, în special cultivarea în condiții de temperatură și iluminare redusă se datorează rezistenței tulpinii, iar sinteza majoră a proteinelor este rezultată din intensificarea procesului de consum a azotului din mediu nutritiv și/sau fixarea azotului din atmosferă în mediul nutritiv realizat de celulele tulpinii.

Exemplu de realizare a invenției

50 Tulpina propusă *Nostoc punctiforme* (Kützing) Hariot CNMN-CB-21a fost izolată din mostrele de sol colectate din serele întreprinderii SRL "Fruct Agro Com" situate în s. Bardar, r-nul Ialoveni, Republica Moldova, la aplicarea metodei de obținere a monoculturilor din culturi brute dense pe medii nutritive lichide și solide.

Condițiile de cultivare a tulpinii *Nostoc punctiforme* (Kützing) Hariot - este necesar de a respecta următoarele condiții: temperatura minimă de +15°C, maximă de + 30°C, iluminarea la inocularea tulpinii de minimum 500 lux, în faza exponențială de creștere - 5000 lux. Tulpina poate fi cultivată fără a fi agitată pe perioada de cultivare.

55 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 4, se aduce până la un litru cu apă distilată, se autoclavează, pH – ul fiind între 6-7.

MD 4669 B1 2019.12.31

Soluția 1 mediul Z-8

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

Soluția 2 mediul Z-8

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

5

Soluția 3 mediul Z-8

Soluția 3 mediul Z-8 se prepară prin adăugarea a 10 ml sol A + 9,5 ml soluție B se aduce la 1litru cu apa distilată. Soluția A se prepară astfel: 2,8g FeCl₃ se dizolvă în 100 ml 0,1N HCl. Soluția B se prepară astfel: 2,9 g EDTANa₂ se dizolvă în 100 ml 0,1 N NaOH.

10

Soluția 4 mediu Z-8

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

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

15

Pentru prepararea mediului nutritiv solid în mediul nutritiv lichid Z-8 se adaugă agar în doza de 12 g/l după ce mediul se încălzește până la fierbere pentru dizolvarea agarului și se lasă să fiarbă timp de 5 min.

Tulpina se caracterizează prin capacitatea de sinteză sporită de proteine, cantitatea căroră este de 18,50-24,00%.

20

Tulpina formează colonii microscopice mici, neregulat sferice, care se fixează bine de substrat, cu lungimea de aproximativ 200 μ sau uneori mai lungi. Teaca mucilaginoasă este îngustă, incoloră.

Trihomii au culoarea albastră-verde, sunt strâns legați, foarte abili, deseori cu greu se diferențiază din biomasă, cu lățimea de 2,25-4,45μ (mai rar pot atinge 6,75 μ).

25

Celulele vegetative au forma de butoiș până la elipsoidală cu lungimea de 2,25-6,75 μ și lățimea de 2,25-4,45μ (mai rar pot atinge 6,75 μ).

Heterociștii sunt bazali, au forma mai mult sau mai puțin rotunjită cu lungimea de 4-6,75 μ (foarte rar au lungimea de 2,25 μ) iar lățimea de 4,45-6,75 μ.

30

Sporii au forma aproape rotundă sau alungită cu membrana incoloră, netedă cu lungimea de 4,5-11,25 μ și 4,5-9 μ lățime. Sporii se formează intens, în deosebi, 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 – 18,50%-24,00%; lipide – 5,00%-10,00%; glucide – 10,00%-13,00%.

35

Produsul sintetizat de tulpină: proteine în cantitate 18,50%-24,00%; lipide – 5,00%-10,00%; glucide – 10,00%-13,00%.

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 4-7 ori până la sfârșitul fazei exponențiale de creștere.

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

- 5 Condițiile și componența mediilor pentru păstrarea îndelungată a tulpinii: temperatura camerei, iluminarea de 300-500 lux, însămânțarea fiind efectuată odată la 6 luni.

Mediu 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.

- 10 Tulpina *Nostoc punctiforme* (Kutzing) Hariot se păstrează în eprubete înclinate ce conțin mediu nutritiv menționat cu respectarea condițiilor de păstrare, însămânțarea fiind efectuată odată la 6 luni.

Tulpina mai poate fi menținută pe mediul nutritiv menționat și în vasele Petri, în aceleași condiții de păstrare, însămânțarea fiind efectuată odată la 25 zile.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Rajeashwari K.R., Rajashekhar M. Biochemical composition of seven species of Cyanobacteria isolated from different aquatic habitats of Western Ghats, Southern India. Brazilian Archives Of Biology And Technology. september-octomber, 2011, vol. 5, nr.5, p. 849-855
2. Tipnee S., Ramaraj R., Unpaprom Y. Nutritional evaluation of edible freshwater green macroalga *Spirogyra varians*. J. Emer Life Sci Res, 2015, nr.1(2), p. 1-7
3. Stratulat I., Șalaru V., Dobrojan S., Zosim L., Șalaru V., Bulimaga V., Trofim A., Donțu N. Biologically active substance content from the *Nostoc flagelliforme* biomass. 2nd International conference on microbial biotechnology. 2014, p. 179, regăsit la 2019.06.06. Găsit în: http://www.imb.asm.md/uploads/File/IMB_conf_2014_public.pdf

(57) Revendicări:

Tulpină de microalgă cianofită *Nostoc punctiforme* (Kutzing) Hariot CNMN-CB-21 în calitate de sursă de proteine.