



MD 4714 B1 2020.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4714** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C01G 3/00 (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 2019 0041 (22) Data depozit: 2019.05.22	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.09.30, BOPI nr. 9/2020
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: RUDI Liudmila, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDIC Valeriu, MD; DJUR Svetlana, MD; ROTARI Ion, MD; MISCU Vera, MD; VALUȚA Ana, MD; IAȚCO Iulia, MD; CODREANU Liviu, MD; ZINICOVSCAIA Inga, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD	

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

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, bionanotehnologie, biofarmaceutică, și anume la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* în scopul obținerii materiei prime pentru elaborarea și fabricarea preparatelor cu aplicare în medicină, farmaceutică și cosmetologie.

2
Procedeu, conform invenției, prevede cultivarea culturii pe un mediu nutritiv mineral cu adaos de nanoparticule hidrosolubile de cupru cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 3,15-3,18 μg/L.

Revendicări: 1

MD 4714 B1 2020.09.30

(54) Process for cultivation of *Spirulina platensis* cyanobacterium**(57) Abstract:**

1

The invention relates to biotechnology, bionanotechnology and biopharmaceutics, namely to a process for cultivation of *Spirulina platensis* cyanobacterium for the purpose of obtaining raw material for the development and manufacture of drugs with application in medicine, pharmaceutics and cosmetology.

2

The process, according to the invention, provides for the cultivation of the culture on a mineral nutrient medium with the addition of water-soluble copper nanoparticles of a size of 5 nm in a concentration of 3.15-3.18 µg/L.

Claims: 1

(54) Способ культивирования цианобактерии *Spirulina platensis***(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к биотехнологии, бionанотехнологии, биофармацевтике, а именно к способу культивирования цианобактерии *Spirulina platensis* с целью получения сырья для разработки и изготовления препаратов для применения в медицине, фармацевтике и косметологии.

2

Способ, согласно изобретению, предусматривает культивирование культуры на минеральной питательной среде с добавлением водорастворимых наночастиц меди размером 5 нм в концентрации 3,15-3,18 мкг/л.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, bionanotehnologie, în particular la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* în scopul obținerii materiei prime pentru elaborarea și fabricarea preparatelor cu aplicare în medicină, farmaceutică și cosmetologie.

Bionanotehnologia, în calitate de domeniu științifico-practic, propune aplicarea nanoparticulelor metalice în calitate de stimulatori pentru ficobiotehnologie. A fost demonstrat efectul stimulator al unor nanoparticule metalice asupra creșterii și metabolismului celular. Dimensiunile mici ale nanoparticulelor favorizează implicarea lor în activitatea biosintetică a celulei în calitate de oligoelemente. Procedeu propus se include în noua direcție de utilizare a nanoparticulelor în domeniul biotehnologiei.

Este cunoscut procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-11, care include cultivarea culturii în prezența sulfatului de cupru pe mediul nutritiv mineral ce conține, g/L: NaNO₃ -2,5; NaHCO₃ -2,0; NaCl-1,0; K₂SO₄ -0,6; Na₂HPO₄ -0,2; MgSO₄·7H₂O -0,2; CaCl₂ - 0,024; 1,0 ml/L soluție de microelemente ce conține (mg/L): H₃BO₃ -2,86; MnCl₂·4H₂O-1,81; MoO₃ -0,015; FeEDTA 0,8% -1ml/L. Se respectă următorii parametri: temperatura de 32-35°C, pH-ul mediului 8-9, intensitatea iluminării de 55 μmol fotoni/m²/s. Conform procedurii, CuSO₄·5H₂O se suplimentează la mediul de cultivare în concentrația de 5,0 mg/L la prepararea acestuia (varianta 1) sau peste 72 de ore după inocularea culturii (varianta 2). Durata cultivării este de 7 zile. Conform procedurii, conținutul lipidelor în biomasa spirulinei în ambele variante crește cu 30%. Producerea de biomasă este mai mică cu 19,1% în varianta 2 și este de peste 3 ori mai mică în varianta 1 [1].

Neajunsul acestui procedeu constă în reducerea cantității de biomasă, iar sporul cu 30% a conținutului de lipide nu asigură un randament lipidic mai mare față de biomasa spirulinei cultivată în lipsa sulfatului de cupru.

Mai este cunoscut procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea culturii pe mediul nutritiv mineral ce conține, g/L: NaNO₃ - 2,25; NaHCO₃ - 8,0; NaCl - 1,0; K₂SO₄ - 0,3; Na₂HPO₄ -0,2; MgSO₄·7H₂O - 0,2; CaCl₂ - 0,024; FeSO₄ - 0,01; EDTA - 0,08; H₃BO₃ - 0,00286; MnCl₂·4H₂O - 0,00181; ZnSO₄·7H₂O - 0,00022; CuSO₄·5H₂O - 0,00008; MoO₃ - 0,000015 și apă distilată până la 1L în condiții de temperatură constantă de 25-28°C, la un pH de 8,0-10,0 și iluminarea în regim continuu cu intensitatea de 3000-4000 lx. Conform procedurii, mediul de cultivare se suplimentează cu 0,0035 -0,0038 g/L nanoparticule de Ag, hidrosolubile, cu dimensiunea de 5 nm. Durata ciclului de cultivare este de 5 zile. Conform acestui procedeu, producerea de biomasă crește cu 30-35%, iar conținutul de lipide cu 25-28% [2].

Neajunsul procedurii constă în aceea că efectul stimulator nu este suficient de înalt, conținutul de lipide crește doar până la 6,12-6,27% în biomasă, randamentul lipidelor fiind de 0,076 - 0,081 g/L.

Se mai cunoaște procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea culturii pe mediul nutritiv mineral ce conține, g/L: NaNO₃ - 2,25; NaHCO₃ - 8,0; NaCl - 1,0; K₂SO₄ - 0,3; Na₂HPO₄ - 0,2; MgSO₄·7H₂O - 0,2; CaCl₂ - 0,024; FeSO₄ - 0,01; EDTA - 0,08; H₃BO₃ - 0,00286; MnCl₂·4H₂O - 0,00181; ZnSO₄·7H₂O - 0,00022; CuSO₄·5H₂O - 0,00008; MoO₃ - 0,000015 și apă distilată până la 1L. Procedeu este realizat în condiții de temperatură constantă de 25-28°C, la un pH de 8,0-10,0 și iluminarea continuă cu intensitatea de 3000-4000 lx. În calitate de stimulator, la mediul de cultivare se adaugă nanoparticule de Au, hidrosolubile, cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0,0087-0,0091 g/L. Durata ciclului de cultivare este de 5 zile. Conform procedurii, producerea de biomasă crește cu 40-44%, conținutul de lipide cu 28-33% [3].

Neajunsul procedurii constă în aceea că efectul stimulator nu este suficient de înalt, mărind conținutul de lipide doar până la 6,27-6,52% în biomasă, randamentul lipidelor fiind de 0,081-0,09 g/L.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu eficient și reproductibil de sporire a conținutului de lipide în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*, precum și de sporire a randamentului de lipide.

Esența invenției constă în aceea că se propune un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea culturii într-un mediu nutritiv cu următoarea compoziție, g/L: NaNO₃ - 2,25; NaHCO₃ - 8,0; NaCl - 1,0; K₂SO₄ - 0,3; Na₂HPO₄ - 0,2; MgSO₄·7H₂O - 0,2; FeSO₄ - 0,01; EDTA - 0,08; H₃BO₃ - 0,00286; MnCl₂·4H₂O - 0,00181;

ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015. În calitate de stimulator al sintezei de lipide se utilizează nanoparticule de cupru, hidrosolubile, cu dimensiunea de 5 nm, care se adaugă la mediul de cultivare în concentrația de 3,15-3,18 μg/L. Cultivarea se efectuează timp de 5 zile la temperatura de 25-28°C, pH-ul 8,0-10,0 și iluminarea cu intensitatea de 37-55 μM foton/m²/s în regim continuu. Nanoparticulele de Cu sunt produse industrial, dimensiunea fiind de 5 nm.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea conținutului de lipide în biomasă, precum și a randamentului de lipide.

Rezultatul obținut este condiționat de efectul stimulator al nanoparticulelor de Cu asupra sintezei lipidelor.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Se prepară mediul mineral nutritiv cu următoarea componență (g/L): NaNO₃ – 2,25; NaHCO₃ – 8,0; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 0,3; Na₂HPO₄ – 0,2; MgSO₄·7H₂O – 0,2; CaCl₂ – 0,024; FeSO₄ – 0,01; EDTA – 0,08; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015 și apă distilată până la 1L. La mediul preparat se adaugă 3,15 μg/L nanoparticule de Cu. Cultura start este suspensia de *Spirulina platensis* CNMN-CB-01 în cantitate de 0,3 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer cu volumul de 500 ml și volumul de lucru de 250 ml la temperatura de 25°C, pH-ul de 8,0-10,0 și iluminarea cu intensitatea de 37-55 μM foton/m²/s în regim continuu.

La ziua a 5-a se colectează biomasa de spirulină și se determină conținutul de lipide. A fost obținut 1,26 g/L biomasă. Conținutul lipidelor în biomasă este de 8,04%.

Exemplul 2

Se prepară mediul mineral nutritiv cu următoarea componență (g/L): NaNO₃ – 2,25; NaHCO₃ – 8,0; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 0,3; Na₂HPO₄ – 0,2; MgSO₄·7H₂O – 0,2; CaCl₂ – 0,024; FeSO₄ – 0,01; EDTA – 0,08; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015 și apă distilată până la 1L. La mediul preparat se adaugă 3,18 μg/L nanoparticule de Cu. Cultura start este suspensia de *Spirulina platensis* CNMN-CB-01 în cantitate de 0,3 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer cu volumul de 500 ml și volumul de lucru de 250 ml la temperatura de 28°C, la pH-ul de 8,0-10,0 și iluminarea cu intensitatea de 37-55 μM foton/m²/s în regim continuu.

La ziua a 5-a se colectează biomasa de spirulină și se determină conținutul de lipide. A fost obținut 1,30 g/L biomasă. Conținutul lipidelor în biomasă este de 8,23%.

Tabel

Cantitatea de biomasă de *Spirulina platensis* și conținutul lipidelor în biomasă la cultivare conform procedurii propus în invenție și celei mai apropiate soluții

Procedul utilizat	Concentrația nanoparticulelor	Durata ciclului de cultivare, zile	Biomasa, g/L	Conținutul de lipide în biomasă, % (sporul de lipide)
Conform celei mai apropiate soluții	AuNP, 0,0087 g/L	5	1,30±0,06	6,27±0,10
	AuNP, 0,0091 g/L	5	1,38±0,03	6,52±0,07
Conform soluției revendicate	CuNP, 3,15 μg/L	5	1,26±0,05	8,04±0,11 (23-31%)
	CuNP, 3,18 μg/L	5	1,30±0,08	8,23±0,06 (26-28%)

Astfel, datele tabelului demonstrează majorarea cu 23-31% a conținutului de lipide în biomasa spirulinei și cu 18-36% a randamentului lipidelor în procedul propus în invenție față de procedul proxim.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Cepoi I. Particularitățile manifestării stresului oxidativ indus de Cu (II) la *Spirulina Platentis*. Akademos, 2017, p. 39-44
2. MD 4542 B1 2017.12.31
3. MD 4543 B1 2017.12.31

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea culturii pe un mediu nutritiv mineral ce conține, g/L: NaNO₃ – 2,25; NaHCO₃ – 8,0; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 0,3; Na₂HPO₄ – 0,2; MgSO₄·7H₂O – 0,2; CaCl₂ – 0,024; FeSO₄ – 0,01; EDTA – 0,08; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015, nanoparticule hidrosolubile de cupru cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 3,15-3,18 μg/L și apă distilată până la 1L, la temperatura de 25-28°C, pH-ul de 8,0-10,0, iluminarea de 37-55 μM fotoni/m²/s în regim continuu, în decurs de 5 zile.