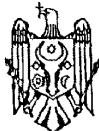




MD 2409 C2 2004.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2409⁽¹³⁾ C2
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/12

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2001 0258 (22) Data depozit: 2001.08.10 (41) Data publicării cererii: 2003.05.31, BOPI nr. 5/2003</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2004.03.31, BOPI nr. 3/2004</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BULIMAGA Valentina, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; RUDIC Valeriu, MD; GULEA Aurelian, 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 particular la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*.

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* include însămânțarea spirulinei pe un mediu nutritiv, ce conține următoarele componente, g/L: NaHCO₃ - 16,80, K₂HPO₄·3H₂O - 0,50, NaNO₃ - 2,50, NaCl - 1,00, K₂SO₄ - 0,50, CaCl₂·6H₂O - 0,04, MgSO₄·7H₂O - 0,20, H₃BO₃ - 0,00286, MnCl₂·4H₂O - 0,00181, CuSO₄·5H₂O - 0,00008, MoO₃ - 0,000015, FeSO₄ - 0,01, EDTA - 0,08 și apă; cultivarea ei la iluminare de 15...24 mii erg/cm² și temperatura de 35±1°C, adăugarea la a

2
5
10
15
treia zi de cultivare în mediul nutritiv a unuia din compușii coordinați: [Zn(CH₃COO)₂·4H₂O], [Zn(CH₂ClCOO)₂·4H₂O], [Zn(CH₂BrCOO)₂·4H₂O], [Zn(CHBr₂COO)₂·4H₂O], [Zn(CCl₃COO)₂·4H₂O], [Zn(CBr₃COO)₂·4H₂O], după ce cultivarea se efectuează încă trei zile.

Rezultatul invenției constă în creșterea productivității spirulinei și în sporirea conținutului de peptide și aminoacizi în biomasă.

Revendicări: 1

MD 2409 C2 2004.03.31

MD 2409 C2 2004.03.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*.

5 Este cunoscut procedeu de cultivare a spirulinei pe mediul nutritiv Zarrouk cu următoarea componență: $\text{NaHCO}_3 - 16,0$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 0,5$, $\text{KNO}_3 - 3,75$, $\text{NaCl} - 1,0$, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 5,0$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,70$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$, $\text{MoO}_3 - 0,000015$, $\text{FeSO}_4 - 0,024$, EDTA - 0,24 în decurs de 10...12 zile [1]. Dezavantajul acestui procedeu este perioada îndelungată de cultivare și prețul ridicat al mediului nutritiv utilizat.

10 Mai este cunoscut procedeu de cultivare a spirulinei pe mediul nutritiv modificat. Acest procedeu include prepararea mediului de cultivare cu următoarea compoziție, g/L: $\text{NaHCO}_3 - 16,8$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 0,5$, $\text{NaNO}_3 - 2,5$, $\text{NaCl} - 1,0$, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 0,5$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$, $\text{MoO}_3 - 0,000015$, $\text{FeSO}_4 - 0,001$, EDTA - 0,08, inocularea spirulinei (0,04 g/L), cultivarea ei la iluminarea de 15...24 mii erg/cm^2 și temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ [2].

15 Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că mediul utilizat și condițiile de cultivare nu asigură o productivitate înaltă (1,4...1,5 g/L) și nu permite obținerea unei biomase cu un conținut mai sporit de aminoacizi (2,5...3,2%) și peptide (3,5...5,5%).

20 Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de cultivare a spirulinei care asigură sporirea productivității ei, precum și a conținutului de aminoacizi și peptide.

25 Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* include însămânțarea spirulinei pe un mediu nutritiv, ce conține următoarele componente, g/L: $\text{NaHCO}_3 - 16,80$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 0,50$, $\text{NaNO}_3 - 2,50$, $\text{NaCl} - 1,00$, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 0,50$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$, $\text{MoO}_3 - 0,000015$, $\text{FeSO}_4 - 0,01$, EDTA - 0,08 și apă; cultivarea ei la iluminare de 15...24 mii erg/cm^2 și temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, adăugarea la a treia zi de cultivare în mediul nutritiv a unuia din compușii coordinați: $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, $[\text{Zn}(\text{CH}_2\text{ClCOO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, $[\text{Zn}(\text{CH}_2\text{BrCOO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, $[\text{Zn}(\text{CHBr}_2\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, $[\text{Zn}(\text{CCl}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, $[\text{Zn}(\text{CBr}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, după ce cultivarea se efectuează încă trei zile.

30 Rezultatul invenției constă în creșterea productivității spirulinei și în sporirea conținutului de peptide și aminoacizi în biomasă.

35 Rezultatul obținut se datorează disocierii compușilor coordinați utilizați și formării ionilor de Zn^{2+} , care influențează activitatea enzimelor zinccomponente, unele dintre care efectuează procesul de hidroliză a proteinelor, iar ligandul reprezentat prin unul din derivații halogenoacetați, care sunt incluși în unele căi metabolice aparte, conduce la sporirea conținutului de aminoacizi și peptide. Majorarea productivității poate fi explicată și prin participarea acetatului sau halogenoacetatului din compusul coordinați la sinteza acetyl CoA, care și intensifică procesul de fotosinteză și alte procese care se desfășoară în celulele spirulinei.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

40 Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență (g/L): $\text{NaHCO}_3 - 16,8$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 0,5$, $\text{NaNO}_3 - 2,5$, $\text{NaCl} - 1,0$, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$, $\text{MoO}_3 - 0,000015$, $\text{FeSO}_4 - 0,001$, EDTA - 0,08.

La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 g/L.

45 Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 250 ml în 100 ml suspensie la temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ și iluminarea de 15...24 mii erg/cm^2 , s.

În a treia zi de cultivare se adaugă $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}] - 0,010$ g/L, cultivarea continuă încă 3 zile cu respectarea parametrilor descriși mai sus, după care la ziua a șasea se determină productivitatea și conținutul de aminoacizi și peptide.

50 Productivitatea culturii de *S. platensis* în ziua a șasea este de 1,93 g/L biomasă absolut uscată. Ea conține 5,0% de aminoacizi și 9,55% de peptide.

Exemplul 2

55 Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență (g/L): $\text{NaHCO}_3 - 16,8$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 0,5$, $\text{NaNO}_3 - 2,5$, $\text{NaCl} - 1,0$, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$, $\text{MoO}_3 - 0,000015$, $\text{FeSO}_4 - 0,001$, EDTA - 0,08.

La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 m/L.

Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 250 ml în 100 ml suspensie la temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ și iluminarea de 15...24 mii erg/cm^2 , s.

MD 2409 C2 2004.03.31

4

În a treia zi de cultivare se adaugă $[\text{Zn}(\text{CH}_2\text{ClCOO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}] - 0,015 \text{ g/L}$, cultivarea continuă încă 3 zile cu respectarea parametrilor descriși mai sus, după care în ziua a șasea se determină productivitatea și conținutul de aminoacizi și peptide.

5 Productivitatea culturii de *S. platensis* în ziua a șasea este de 2,01 g/L biomasă absolut uscată. Ea conține 8,07% de aminoacizi și 9,15% de peptide.

Exemplul 3

Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență (g/L): $\text{NaHCO}_3 - 16,8$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 0,5$, $\text{NaNO}_3 - 2,5$, $\text{NaCl} - 1,0$, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$, $\text{MoO}_3 - 0,000015$, $\text{FeSO}_4 - 0,001$, $\text{EDTA} - 0,08$.

10 La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 g/L.

Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 250 ml în 100 ml suspensie la temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ și iluminarea de 15...24 mii erg/cm^2 , s.

15 În ziua a treia se adaugă $[\text{Zn}(\text{CCl}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}] - 0,015 \text{ g/L}$, cultivarea continuă încă 3 zile cu respectarea parametrilor descriși mai sus, după care în ziua a șasea se determină productivitatea și conținutul de aminoacizi și peptide.

Productivitatea culturii de *S. platensis* în ziua a șasea este de 2,06 g/L biomasă absolut uscată. Ea conține 6,41% de aminoacizi și 9,48% de peptide.

Exemplul 4

20 Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență (g/L): $\text{NaHCO}_3 - 16,8$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 0,5$, $\text{NaNO}_3 - 2,5$, $\text{NaCl} - 1,0$, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$, $\text{MoO}_3 - 0,000015$, $\text{FeSO}_4 - 0,001$, $\text{EDTA} - 0,08$.

La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 g/L.

Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 250 ml în 100 ml suspensie la temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ și iluminarea de 15...24 mii erg/cm^2 , s.

25 În ziua a treia se adaugă $[\text{Zn}(\text{CH}_2\text{BrCOO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}] - 0,015 \text{ g/L}$, cultivarea continuă încă 3 zile cu respectarea parametrilor descriși mai sus, după care în ziua a șasea se determină productivitatea și conținutul de aminoacizi și peptide.

Productivitatea culturii de *S. platensis* în ziua a șasea este de 1,76 g/L biomasă absolut uscată. Ea conține 5,18% de aminoacizi și 10,96% de peptide.

Exemplul 5

30 Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență (g/L): $\text{NaHCO}_3 - 16,8$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 0,5$, $\text{NaNO}_3 - 2,5$, $\text{NaCl} - 1,0$, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$, $\text{MoO}_3 - 0,000015$, $\text{FeSO}_4 - 0,001$, $\text{EDTA} - 0,08$.

La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 g/L.

35 Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 250 ml în 100 ml suspensie la temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ și iluminarea de 15...24 mii erg/cm^2 , s.

În ziua a treia se adaugă $[\text{Zn}(\text{CHBr}_2\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}] - 0,015 \text{ g/L}$, cultivarea continuă încă 3 zile cu respectarea parametrilor descriși mai sus, după care în ziua a șasea se determină productivitatea și conținutul de aminoacizi și peptide.

40 Productivitatea culturii de *S. platensis* în ziua a șasea este de 1,72 g/L biomasă absolut uscată. Ea conține 6,42% de aminoacizi și 9,48% de peptide.

Exemplul 6

45 Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență (g/L): $\text{NaHCO}_3 - 16,8$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 0,5$, $\text{NaNO}_3 - 2,5$, $\text{NaCl} - 1,0$, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$, $\text{MoO}_3 - 0,000015$, $\text{FeSO}_4 - 0,001$, $\text{EDTA} - 0,08$.

La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 g/L.

Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 250 ml în 100 ml suspensie la temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ și iluminarea de 15...24 mii erg/cm^2 , s.

50 În ziua a treia se adaugă $[\text{Zn}(\text{CBr}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}] - 0,015 \text{ g/L}$, cultivarea continuă încă 3 zile cu respectarea parametrilor descriși mai sus, după care în ziua a șasea se determină productivitatea și conținutul de aminoacizi și peptide.

Productivitatea culturii de *S. platensis* în ziua a șasea este de 1,79 g/L biomasă absolut uscată. Ea conține 3,92% de aminoacizi și 10,53% de peptide.

55

MD 2409 C2 2004.03.31

5

Tabel

Productivitatea și conținutul de aminoacizi și peptide în biomasa *Spirulina platensis*

Procedeele utilizat	Compusul	Concentrația, g/L	Productivitatea, g/L B.A.U.	Aminoacizi, % din biomasă	Peptide, % din biomasă
Conform celei mai apropiate soluții	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,00022	1,55±0,05	3,17±0,06	5,50±0,13
Conform invenției	[Zn(CH ₃ COO) ₂ ·4H ₂ O]	0,010	1,93±0,02	5,00±0,02	9,55±0,33
	[Zn(CH ₂ ClCOO) ₂ ·4H ₂ O]	0,015	2,01±0,02	8,07±0,03	9,15±0,15
	[Zn(CCl ₃ COO) ₂ ·4H ₂ O]	0,015	2,06±0,06	6,41±0,09	9,48±0,43
	[Zn(CH ₂ BrCOO) ₂ ·4H ₂ O]	0,015	1,76±0,01	5,18±0,03	10,96±0,13
	[Zn(CHBr ₂ COO) ₂ ·4H ₂ O]	0,015	1,72±0,02	6,42±0,14	9,48±0,44
	[Zn(CBr ₃ COO) ₂ ·4H ₂ O]	0,015	1,79±0,01	3,92±0,13	10,53±0,15

5

Datele din tabel relevă faptul că pentru cianobacteria cultivată conform procedurii propus a crescut productivitatea spirulinei de 1,10...1,33 ori, conținutul de aminoacizi de 1,7...2,0 ori, iar conținutul de peptide de 1,24...2,55 ori în comparație cu rezultatele obținute în cea mai apropiată soluție.

10 Astfel, procedeul propus conform invenției asigură obținerea unei biomase de *Spirulina platensis* de o calitate înaltă și cu un conținut sporit de aminoacizi și peptide.

15 (57) Revendicare:

Procedeele de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include însămânțarea spirulinei pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaHCO₃ - 16,80, K₂HPO₄·3H₂O - 0,50, NaNO₃ - 2,50, NaCl - 1,00, K₂SO₄ - 0,50, CaCl₂·6H₂O - 0,04, MgSO₄·7H₂O - 0,20, H₃BO₃ - 0,00286, MnCl₂·4H₂O - 0,00181, CuSO₄·5H₂O - 0,00008, MoO₃ - 0,000015, FeSO₄ - 0,01, EDTA - 0,08 și apă, cultivarea ei la iluminare de 15...24 mii erg/cm² și temperatura de 35±1°C, caracterizat prin aceea că la a treia zi de cultivare în mediul nutritiv se adaugă unul din compușii coordinați: [Zn(CH₃COO)₂·4H₂O], [Zn(CH₂ClCOO)₂·4H₂O], [Zn(CH₂BrCOO)₂·4H₂O], [Zn(CHBr₂COO)₂·4H₂O], [Zn(CCl₃COO)₂·4H₂O] sau [Zn(CBr₃COO)₂·4H₂O] în concentrație de 0,05...0,20 g/L, după ce cultivarea se efectuează încă trei zile.

25

(56) Referințe bibliografice:

1. Обух П.А., Кокырца П.Н., Нгуен Тхи Хоа, Шаларь В.М. Оптимизация химического состава питательной среды для культивирования *Spirulina platensis* (Gom) Geitl. Рук. деп. в ВИНИТИ, № 4039-79, 1979
2. Rudic Valeriu. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău, Știința, 1993, p. 8...11

Sef Secție: GUȘAN Ala

Examinator: BANTAȘ Valentina

Redactor: LOZOVANU Maria