

# REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3780** <sup>(13)</sup> **G2**  
(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)  
*A01G 33/00* (2006.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2007 0291 (22) Data depozit: 2007.10.29	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2008.12.31, BOPI nr. 12/2008
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; BULIMAGA Valentina, MD; BIVOL Cezara, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) **Procedeu de cultivare a microalgei verzi *Dunaliella salina***

(57) **Rezumat:**

1  
Invenția se referă la ficobiotehnologie, în particular la un procedeu de cultivare a microalgei verzi *Dunaliella salina* – sursă de substanțe biologice active valoroase și poate fi utilizată în industriile alimentară și farmaceutică, cosmetologie.

Procedeul propus include cultivarea *Dunaliella salina* pe un mediu nutritiv ce conține lichidul cultural rezultat de la cultivarea *Spirulina platensis*, ce conține ionii, mg/L:  $\text{HCO}_3^-$  3050,0,  $\text{NO}_3^-$  281,0,  $\text{Cl}^-$  596,2,  $\text{SO}_4^{2-}$  97,53,  $\text{K}^+$  400,0,  $\text{Ca}^{2+}$  8,0,  $\text{Mg}^{2+}$

2  
24,32,  $\text{Na}^+$  3800,0, la care se adaugă o sare de magneziu în concentrație de 20...50 mg/L  $\text{Mg}^{2+}$  și o soluție de HCl 1N până la pH-ul 8,5...9,0, iar apoi NaCl în concentrație de 60...125 g/L.

Revendicări: 1

**Descriere:**

Invenția se referă la ficobiotehnologie, în particular la un procedeu de cultivare a microalgei verzi *Dunaliella salina* – sursă de substanțe biologice active valoroase și poate fi utilizată în industriile alimentară și farmaceutică, cosmetologie.

5 Datorită componenței biochimice a microalgei, și în special  $\beta$ -carotenului, care este precursorul vitaminei A și al glicerolului, care intră în componența fosfolipidelor necesare membranelor biologice, biomasa de *Dunaliella salina* tot mai frecvent este utilizată ca sursă de antioxidanți naturali în cosmetologia contemporană. Este vorba despre metodele de bronzare artificială cu ajutorul pre-  
10 paratelor bogate în pigmenți carotenoidici produși din dunalielă sau metodele unicele de tratament, utilizând sare de baie îmbogățită cu substanțe biologice din aceeași algă, care are efecte curative ce pot concura cu renumita sare din Marea Moartă sau diverse argile minerale.

Este cunoscut un procedeu de cultivare a microalgei verzi *Dunaliella salina* pe mediul care conține ape de scurgere de la complexe zootehnice. Conținutul de substanță organică, conform consumării chimice a oxigenului, urmează a fi nu mai mare de 1000 mg O<sub>2</sub>/L, adăugând 6...12% NaCl și  
15 0,2% Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> la o temperatură de 27...29°C și iluminare de 20...24 mii erg/cm<sup>2</sup>/s [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că apele de scurgere de la complexele de animale, utilizate la prepararea mediului de cultivare a *Dunaliella salina*, au un conținut înalt de amoniac și  
20 nitrați, metale grele, calciu și magneziu. Acești factori influențează asupra calității biomasei și productivității *Dunaliella salina*. Nitratul de amoniu inhibă formarea beta-carotenului, iar prezența metalelor grele duce la acumularea lor în biomasă. La pH 8,0 are loc precipitarea hidroxizilor de calciu și magneziu, care duce la tulburarea mediului, ceea ce împiedică procesul de fotosinteză.

Mai este cunoscut procedeul de cultivare a microalgei verzi *Dunaliella salina* care include următoarele etape: prepararea mediului de cultivare din lichidul cultural rezultat la creșterea primară a  
25 dunalielii cu o concentrație de NaCl în limitele 174...254 g/dm<sup>3</sup> și o concentrație totală de materie organică de 1540 mg/dm<sup>3</sup>, dintre care 41% a fost glicerol, tratarea biologică folosind bacteriile halofile proprii din lichidul cultural și adăugarea combinată a ionilor (NaCl în concentrație de 214 g/dm<sup>3</sup>, Mg<sup>2+</sup> - 114 mg/dm<sup>3</sup>, K<sup>+</sup> - 131 mg/dm<sup>3</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - 40 mg/dm<sup>3</sup>) pentru înlăturarea glicerolului, astfel încât după 2 zile de incubație în lichid cultural nu se identifică reziduuri de glicerol. Această  
30 combinație de ioni stimulează înlăturarea eficientă a glicerolului, deci și a substanței organice din apa reziduală de către bacteriile halofile. Acest reziduu lichid tratat în modul respectiv se reutilizează ca mediu stimulator al carotenogenezei la *D. salina* [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în prezența în lichidul cultural a unor cantități sporite de glicerol, pentru înlăturarea căruia din lichidul cultural este necesar un consum suplimentar de săruri și  
35 o durată mare de timp (2 zile). El trebuie înlăturat, deoarece majorează presiunea osmotică externă asupra celulelor algale, influențând astfel negativ creșterea și dezvoltarea algei.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu nou de cultivare a microalgei verzi *Dunaliella salina* cu reutilizarea lichidului cultural (apelor reziduale) de la producerea biotehnică a cianobacteriei *Spirulina platensis*.

40 Procedeul de cultivare a microalgei verzi *Dunaliella salina* include cultivarea *Dunaliella salina* pe un mediu nutritiv ce conține lichidul cultural rezultat de la cultivarea unei alge, la care se adaugă NaCl și sare de magneziu. Totodată se utilizează lichidul cultural rezultat de la cultivarea *Spirulina platensis*, ce conține ionii, mg/L: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 3050,0, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 281,0, Cl<sup>-</sup> 596,2, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 97,53, K<sup>+</sup> 400,0, Ca<sup>2+</sup> 8,0, Mg<sup>2+</sup> 24,32, Na<sup>+</sup> 3800,0, la care se adaugă o sare de magneziu în concentrație de 20...50 mg/L Mg<sup>2+</sup> și o soluție de HCl 1N până la pH-ul 8,5...9,0, iar apoi NaCl în concentrație de 60...125 g/L.

45 Rezultatul constă în sporirea productivității microalgei *D. salina* cu 12...15% și economisirea resurselor materiale (apă, săruri minerale) la reutilizarea lichidului cultural (apelor reziduale) rezultat de la cultivarea *Spirulina platensis*.

Rezultatul se datorează reutilizării apelor reziduale de la cultivarea *Spirulina platensis* pe un mediu, ce conține nu doar substanțe minerale, dar și substanțe organice cu adaos de NaCl și ioni de  
50 Mg<sup>2+</sup>.

Rezultatele analizei componenței biochimice a lichidului cultural al cianobacteriei *Spirulina platensis* sunt prezentate în tab. 1.

55

60

# MD 3780 G2 2008.12.31

4

Tabelul 1

Componența biochimică a lichidului cultural al cianobacteriei  
*Spirulina platensis*

5

Nr. d/o	Substanța organică	Componența biochimică, %
1	proteine	2,24
2	peptide	0,12
3	lipide	0,21
4	glicerol	-
5	hidrați de carbon	1,14

Exemple de realizare a invenției

*Exemplul 1*

10 La 1 L de lichid cultural obținut de la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* se adaugă 2 mL sol. 0,5M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O și 1N sol. HCl până la valoarea pH-ului 8,5...9,0 și se filtrează, după care la supernatantul obținut se adaugă NaCl în concentrație de 60 g/L. Se inoculează suspensia de *Dunaliella salina* în cantitate de 0,25 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer în decurs de 10 zile cu agitare periodică la intensitatea luminii de 4000 lucși și temperatura de 27°C, pH-ul mediului poate varia între 8,5...9,0. La a 10-a zi de cultivare suspensia a fost centrifugată și a fost  
15 determinată productivitatea algală și componența biochimică. Rezultatele sunt expuse în tab. 2.

Tabelul 2

Productivitatea și componența biochimică a *Dunaliella salina*

Nr. d/o	Indicii cercetați	Componența biochimică	
		Mediul propus	Mediul conform celei mai apropiate soluții
1	productivitatea, g/L	1,67	1,45
2	peptide, %	10,90	10,78
3	pigmenți carotenoidici, %	4,65	4,50

20

*Exemplul 2*

25 La 1 L de lichid cultural obținut de la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* se adaugă 5 ml sol. 0,5M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O și 1N sol. HCl până la valoarea pH-ului 8,5...9,0 și se filtrează, după care la supernatantul obținut se adaugă NaCl în concentrație de 125 g/L. Se inoculează suspensia de *Dunaliella salina* în cantitate de 0,25 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer în decurs de 10 zile cu agitare periodică la intensitatea luminii de 4000 lucși și temperatura de 29°C, pH-ul mediului poate varia între 8,5...9,0. La a 10-a zi de cultivare suspensia a fost centrifugată și a fost  
30 determinată productivitatea algală și componența biochimică. Rezultatele sunt expuse în tab. 3.

Tabelul 3

Productivitatea și componența biochimică a *Dunaliella salina*

Nr. d/o	Indicii cercetați	Componența biochimică	
		Mediul propus	Mediul conform celei mai apropiate soluții
1	productivitatea, g/L	1,62	1,45
2	peptide, %	11,07	10,78
3	pigmenți carotenoidici, %	4,92	4,50

35

Astfel, procedeul propus asigură sporirea productivității cu 12...15% și economisirea reagenților necesari pentru prepararea mediului nutritiv.

## MD 3780 G2 2008.12.31

5

### (57) Revendicări:

- 5       Procedeu de cultivare a microalgei verzi *Dunaliella salina*, care include cultivarea *Dunaliella salina* pe un mediu nutritiv ce conține lichidul cultural rezultat de la cultivarea unei alge, la care se adaugă NaCl și sare de magneziu, **caracterizat prin aceea că se utilizează lichidul cultural rezultat de la cultivarea *Spirulina platensis***, ce conține ionii, mg/L: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 3050,0, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 281,0, Cl<sup>-</sup> 596,2, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 97,53, K<sup>+</sup> 400,0, Ca<sup>2+</sup> 8,0, Mg<sup>2+</sup> 24,32, Na<sup>+</sup> 3800,0, la care se adaugă o sare de magneziu în
- 10       concentrație de 20...50 mg/L Mg<sup>2+</sup> și o soluție de HCl 1N până la pH-ul 8,5...9,0, iar apoi NaCl în concentrație de 60...125 g/L.

15

### (56) Referințe bibliografice:

1. Rudic Valeriu. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău, Știința, 1993, p. 13
2. Santos C.A., Vieira A.M., Fernandes H.L., Empis J.A., Novais J.M. Optimisation of the biological treatment of hypersaline wastewater from *Dunaliella salina* carotenogenesis. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 76, number 11, november 2001, p. 1147-1153