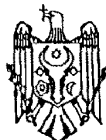




MD 4492 C1 2018.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4492** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/12* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)
C01G 3/10 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2016 0091 (22) Data depozit: 2016.07.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.06.30, BOPI nr. 6/2017
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BULIMAGA Valentina, MD; PISOV Maria, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

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

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la ficobiotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, pentru utilizare în medicină și industria alimentară.

Procedeu, conform invenției, include inocularea cianobacteriei pe mediul nutritiv Zarrouk, cultivarea în decurs de 7 zile la iluminarea de 3500 lx și temperatura de 35 °C, apoi la a 8-a zi mediul se suplimentează cu

2
2...4 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ și cultivarea se efectuează încă 3 zile la iluminarea de 3500...5500 lx.

Rezultatul constă în majorarea productivității cianobacteriei și a conținutului de exopolizaharide acide.

Revendicări: 1

MD 4492 C1 2018.01.31

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

1
The invention relates to phycobiotechnology, in particular to a process for cultivation of *Spirulina platensis* cyanobacterium, for use in medicine and food industry.

The process, according to the invention, comprises the inoculation of cyanobacterium on a Zarrouk nutrient medium, cultivation for 7 days at the light of 3500 lx and the temperature

2
of 35°C, then on the 8th day 2...4 mg/l of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ is added to the medium and the cultivation is carried out for further 3 days at a light of 3.500...5.500 lx.

The result consists in increasing the productivity of cyanobacteria and the content of acid exopolysaccharides.

Claims: 1

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

1
Изобретение относится к фикобиотехнологии, а именно к способу культивирования цианобактерии *Spirulina platensis*, для использования в медицине и пищевой промышленности.

Способ, согласно изобретению, включает посев цианобактерии на питательную среду Заррука, культивирование в течение 7 дней при освещенности 3500 люкс и температуре

2
35°C, затем на 8 день к среде добавляется 2...4 мг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и культивирование осуществляется в течение еще 3-х дней при освещенности 3500...5500 люкс.

Результат состоит в повышении производительности цианобактерии и содержания кислых экзополисахаридов.

П. формулы: 1

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

5 Invenția se referă la ficobiotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* pentru utilizare în medicină și industria alimentară.

În ultimele decenii, o atenție deosebită din partea cercetătorilor este orientată asupra proprietăților biologice și chimice ale polizaharidelor, în special a polizaharidelor sulfatate. Polizaharidele sulfatate posedă o gamă largă de bioactivități importante: antioxidante, antivirale, anticoagulante și trombocitare, precum și de inhibare a unor tumori. Este deja bine cunoscută polizaharida sulfată Ca-spirulina, obținută din biomasa de spirulină, care posedă acțiuni anticanceroasă. În acest context prezintă interes elaborarea procedeeleor de inducere a sintezei polizaharidelor acide și sulfatate la cianobacteria *Spirulina platensis*.

10 Este cunoscut un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina subsalsa* care utilizează stresul pentru sporirea producerii de exopolizaharide prin crearea deficienței de fosfat sau nitrat, prin adaos de un surplus de NaCl (0,9M), precum și nitrat de (10 mM) la mediul de cultivare [1].

Cu toate că a fost stabilit efectul pozitiv al factorilor menționați asupra acumulării exopolizaharidelor la cianobacteria *Spirulina subsalsa*, dezavantajul acestui procedeu constă în diminuarea productivității și a conținutului de proteină în biomasă, cantitatea de exopolizaharide nu este considerabil de înaltă, fiind influențată de durata cultivării, care în prezența excesului de 0,9 M NaCl atinge valoarea maximă în a 28-a zi de cultivare, ceea ce nu este rentabil din punct de vedere economic.

Mai este cunoscut un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu conținut bogat de polizaharide sulfatate, care prevede cultivarea în baloane Erlenmeyer de 4 litri, conținând 3 litri de mediul Zarrouk autoclavat. Mediul a fost îmbogățit cu azot (sub formă de nitrat de sodiu) în concentrații de 45, 128, 293, 412 și 622 ppm. pH-ul mediului a fost ajustat la 10,5 și mediul a fost autoclavat. Algele au fost supuse barbotării cu 0,3% CO₂ în aer și au fost cultivate la 25 ± 3°C, la o iluminare continuă cu lămpi fluorescente. În biomasa de spirulină a fost determinat conținutul de polizaharide sulfatate, care a constituit 5,02% și 4,13% la cultivare pe mediu cu 412 ppm de azot (nivel optim) și 45 ppm de azot (nivel limitat) [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că la cultivarea spirulinei pe medii ce conțin 412 ppm (nivel optim de N₂) și 45 ppm (nivel limitat de N₂) se atinge un conținut de doar 5,02% și 4,13% polizaharide sulfatate sau 50,2 și 41,3 g/kg de biomasă, respectiv.

35 Mai este cunoscut un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* care include etapele: cultivarea spirulinei la intensitatea luminii de 96 μmol photons m⁻² s⁻¹ sau 7104 lx temperatura de 28°C și acumularea biomasei, după care se majorează intensitatea luminii până la 192 μmol photons m⁻² s⁻¹ sau 14208 lx și temperatura de 38°C sau, ca factor stresant se utilizează 0,75 M NaCl și cultivarea este continuată încă 2...3 zile în condiții de stres [3].

Dezavantajul acestui procedeu constă în consumul sporit de energie electrică în cazul cultivării spirulinei în regim de iluminare continuă cu utilizarea lămpilor fluorescente (7104 și 14208 lx), precum și diminuarea productivității cianobacteriei *Spirulina platensis* și a conținutului de exopolizaharide acide la cultivare în prezența 0,50...0,75 M NaCl.

45 Problema pe care a rezolvă invenția constă în asigurarea unei productivități mai înalte, stabile a spirulinei și majorarea conținutului de exopolizaharide acide produse de cianobacteria *Spirulina platensis*.

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* include inocularea cianobacteriei pe mediul nutritiv Zarrouk, cultivarea în decurs de 7 zile la iluminarea de 3500 lx și temperatura de 35 °C, apoi la a 8-a zi mediul se suplimentează cu 2...4 mg/l CuSO₄ •5H₂O și cultivarea se efectuează încă 3 zile la iluminarea de 3500...5500 lx.

Rezultatul constă în majorarea productivității cianobacteriei și a conținutului de exopolizaharide acide, și anume majorarea randamentului de exopolizaharide acide de 2...4 ori și a productivității spirulinei de 1,27 ori.

55 Rezultatul tehnic obținut se datorează utilizării în ziua a 8-a de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* a 2 factori de stres: suplimentarea cu CuSO₄•5H₂O și majorarea intensității de iluminare, care induc producerea de exopolizaharide acide (inclusiv și

polizaharide sulfatate) pe suprafața pereților celulari și eliminarea lor în lichidul de cultură, pentru anihilarea ionilor toxici de Cu^{2+} , precum și protejarea celulelor de efectul iluminării excesive la majorarea intensității de iluminare.

Exemple de realizare a invenției

5 Exemplul 1

150 ml suspensie de spirulină (0,4 mg/ml) se cultivă în mediul Zarrouk în decurs de 7 zile la iluminarea de 3500 lx, iar la a 8-a zi se suplimentează cu 2mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ și cultivarea este continuată încă 3 zile la 3500 lx. La a 11-a zi spirulina se separă de lichidul de cultură prin filtrare, lichidul cultural (fracția 1 de exopolizaharide) se recoltează, iar biomasa se suspendă în 40 ml de apă distilată pentru extragerea exopolizaharidelor atașate pe suprafața peretelui celular, se agită timp de 4...5 min, se filtrează cu pompa de vid, iar biomasa se spală cu 10 ml de apă bidistilată, extractele se colectează împreună (fracția 2 de exopolizaharide). Fracția 1 de exopolizaharide este concentrată de 10 ori la evaporatorul cu vacuum și supusă dializei. Din fracțiile obținute sunt luate probe pentru determinarea concentrației polizaharidelor acide cu reactivul alcian blue.

Exemplul 2

150 ml suspensie de spirulină (0,4mg/ml) se cultivă în mediul Zarrouk în decurs de 7 zile la iluminarea de 3500 lx, iar la a 8-a zi se suplimentează cu 2 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ și cultivarea este continuată încă 3 zile la temperatura de 35 °C la 5500 lx. La a 10-a zi spirulina se separă de lichidul de cultură prin filtrare, lichidul de cultură (fracția 1 de exopolizaharide) se recoltează, iar biomasa se suspendă în 40 ml de apă distilată pentru extragerea exopolizaharidelor atașate pe suprafața peretelui celular, se agită timp de 4...5 min, se filtrează, iar biomasa se spală cu 10 ml de apă bidistilată, extractele se colectează împreună (fracția 2 de exopolizaharide). Fracția 1 de exopolizaharide este concentrată de 10 ori la evaporatorul cu vacuum și supusă dializei. Din fracțiile obținute sunt luate probe pentru determinarea concentrației polizaharidelor acide cu reactivul alcian blue.

Analogic s-a procedat și la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis*, mediul fiind suplimentat cu 4 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, la ambele intensități de iluminare. Rezultatele conform soluției propuse în invenție sunt prezentate în tabel. Ele confirmă că utilizarea în ziua a 8-a de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* a 2 factori de stres: suplimentarea cu $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ și majorarea intensității de iluminare, induc o sporire de 2...4 ori a producției de exopolizaharide acide (inclusiv și polizaharide sulfatate), față de soluția de referință și obținerea unei cantități maxime de exopolizaharide acide de 238,3 g/kg la suplimentarea cu 2 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ la 5500 lx.

35

Tabel

N	Spirulina cultivată cu adaos de săruri în a 8-a zi	Productivitatea la a 11-a zi, g/l	Biomasa totală, mg	Fracția 1 de exopolizaharide în lichidul cultural după concentrare (96,15 ml)		Fracția 2 de exopolizaharide extract (50 ml)		Exopolizaharide acide totale, mg/g sau g/kg
				$\Delta\text{E}600$	mg/g biomasă	$\Delta\text{E}600$	mg/g biomasă	
Conform soluției de referință								
1	3500 lx 0	1,03	309,60	0,059	45,98	0,031	12,62	58,60
2	0,25 M/l NaCl	0,96	286,50	0,032	26,95	0,039	17,20	44,15
3	0,50 M/l NaCl	0,87	260,40	0,013	12,05	0,031	15,00	27,05
4	0,75 M/l NaCl	0,77	230,47	0,010	9,61	0,025	12,10	21,71
Conform soluției propuse în invenție								
	3500 lx 0	1,03	309,60	0,059	45,98	0,031	12,62	58,60
	1 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,01	309,00	0,148	115,57	0,044	18,30	133,87

MD 4492 C1 2018.01.31

5

2 mg/l CuSO ₄ *5H ₂ O	1,01	302,70	0,167	133,13	0,054	22,50	155,63
4 mg/l CuSO ₄ *5H ₂ O	1,03	303,00	0,171	136,18	0,045	18,40	154,58
5500 lx 0	1,15	345,30	0,144	100,63	0,066	24,10	124,73
1mg/l CuSO ₄ *5H ₂ O	1,10	330,90	0,128	93,34	0,097	36,90	130,24
2 mg/l CuSO ₄ *5H ₂ O	1,27	382,20	0,331	208,98	0,089	29,30	238,30
4 mg/l CuSO ₄ *5H ₂ O	1,12	334,50	0,245	176,74	0,064	24,1	200,84

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Chakraborty Tania, A. K. Sen and R. Pal. Stress induced extra cellular polysaccharide of *Spirulina subsalsa* and its chemical characterization. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 2015, 6(3), p. 24-38
2. Abd El Baky H, Hanaa El Baz KF and El-Latife S A. Induction of Sulfated Polysaccharides in *Spirulina platensis* as Response to Nitrogen Concentration and its Biological Evaluation. *Journal Aquaculture Research Development* 2013, vol. 5 no 1, p. 1-8
3. Meng-Chou LEE. Yean-Chang CHEN. Tzu-Chien PENG. Two-stage culture method for optimized polysaccharide production in *Spirulina platensis*. *Jurnal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 92, 2012, p.1562-1569.

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include inocularea acesteia pe mediul nutritiv Zarrouk, cultivarea în decurs de 7 zile la iluminarea de 3500 lx și temperatura de 35 °C, apoi la a 8-a zi mediul se suplimentează cu 2...4 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ și cultivarea se efectuează încă 3 zile la iluminarea de 3500...5500 lx.