



MD 4796 B1 2022.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4796** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C01G 5/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(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 2021 0009 (22) Data depozit: 2021.02.26	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2022.02.28, BOPI nr. 2/2022
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: RUDI Liudmila, MD; CEPOI Liliana, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; RUDIC Valeriu, MD; DJUR Svetlana, MD; ZINICOVSCAIA Inga, MD; VALUȚA Ana, MD; DUMBRĂVEANU Veronica, MD; MISCU Vera, MD; CEPOI Anastasia, MD; ROTARI Ion, MD; TAȘCĂ Ion, 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, și anume la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* și poate fi aplicată în scopul obținerii de materie primă pentru elaborarea și fabricarea remediilor cu acțiune antimalignă și imunomodulatoare.

Conform invenției, procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* include cultivarea cianobacteriei pe mediul nutritiv ce conține, în g/L: NaNO_3 -2,5, NaHCO_3 -8,0, NaCl -1,0, K_2SO_4 -1,0, Na_2HPO_4 -0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2, H_3BO_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;

2
 MoO_3 -0,000015, FeEDTA 1,0 ml/L și apă distilată restul, la temperatura de 30-32°C, pH 8,0-10,0 și iluminarea de 37-55 μM fotoni/ $\text{m}^2 \cdot \text{s}$ în regim continuu, timp de 6 zile, totodată în a cincea zi de cultivare în mediul nutritiv se adaugă nanoparticule de Ag în înveliș de polietilenglicol cu dimensiunea de până la 5 nm în concentrația de 0,10-0,12 $\mu\text{M/L}$.

Rezultatul invenției constă în reducerea conținutului dialdehidei malonice în biomasa de spirulină.

Revendicări: 1

MD 4796 B1 2022.02.28

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

1
The invention relates to biotechnology, namely to a process for cultivating *Spirulina platensis* cyanobacterium and can be used for producing raw materials for the development and manufacture of drugs with anticancer and immunomodulatory action.

According to the invention, the process for cultivating *Spirulina platensis* cyanobacterium comprises cultivation of cyanobacterium on a nutrient medium, containing, g/L: NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -8,0; NaCl -1,0; K_2SO_4 -1,0; Na_2HPO_4 -0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2, H_3BO_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; MoO_3 -0,

2
000015, FeEDTA 1.0 ml/L and distilled water the rest, at a temperature of 30-32°C, pH 8,0-10,0 and illumination of 37-55 μM photons/m²/s in continuous regime, for 6 days, at the same time silver nanoparticles in a polyethylene glycol shell of a size of up to 5 nm, in a concentration of 0,10-0,12 $\mu\text{M}/\text{L}$ are added into the nutrient medium on the fifth day of cultivation.

The technical result consists in reducing the content of malondialdehyde in the spirulina biomass.

Claims: 1

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

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу культивирования цианобактерии *Spirulina platensis* и может быть применено с целью получения сырья для разработки и производства средств с противораковым и иммуномодулирующим действием.

Согласно изобретению, способ культивирования цианобактерии *Spirulina platensis* включает культивирование цианобактерии на питательной среде, содержащей, г/л: NaNO_3 -2,5, NaHCO_3 -8,0, NaCl -1,0, K_2SO_4 -1,0, Na_2HPO_4 -0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2, H_3BO_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;

2
 MoO_3 -0,000015, FeEDTA 1,0 мл/л и воду дистиллированную остальное, при температуре 30-32°C, pH 8,0-10,0, при постоянном освещении в 37-55 μM фотонов/м²/сек, в течение 6 дней, при этом на пятый день культивирования в питательную среду добавляют наночастицы серебра в полиэтиленгликолевой оболочке размером до 5 нм, в концентрации 0,10-0,12 $\mu\text{M}/\text{л}$.

Технический результат заключается в снижении содержания малонового диальдегида в биомассе спирулины.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* și poate fi aplicată în scopul obținerii de materie primă pentru elaborarea și fabricarea remediilor cu acțiune antimalignă și imunomodulatoare.

Bionanotehnologia, fiind rezultatul sinergiei dintre biologie și nanotehnologie, are cea mai bogată arie de studii interdisciplinare cu aplicații în diferite domenii. Nanotehnologiile, care au fost remarcate prin rezultate în biosinteza nanoparticulelor, studiul toxicității și aplicării lor în calitate de stimulatori s-au poziționat stabil în domeniul biologiei. A fost demonstrat efectul pozitiv al nanoparticulelor asupra creșterii și metabolismului celular. Tipul, dimensiunea și învelișul nanoparticulelor determină acțiunea lor asupra proceselor metabolice celulare.

În același timp, există probabilitatea ca utilizarea nanoparticulelor în calitate de stimulatori ai activității biosintetice a microalgelor și cianobacteriilor, precum și în scopul biofuncționalizării lor, să afecteze valoarea materiei prime și să prejudece calitatea produsului obținut. În aceste condiții, la elaborarea nanoprocedeelor de cultivare a cianobacteriilor, în special a spirulinei, este necesar de a atrage o atenție deosebită siguranței produselor obținute.

Este cunoscut procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* pe mediul mineral nutritiv ce conține, în g/L: NaNO_3 -2,5, NaHCO_3 -8,0, NaCl -1,0, K_2SO_4 -1,0, Na_2HPO_4 -0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2 și microelemente în mg/l: H_3BO_3 -2,86, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08, MoO_3 -0,015 și 1,0 ml/L FeEDTA. Spirulina a fost cultivată în baloane Erlenmeyer de 500 ml cu un volum de cultură de 250 ml timp de șase zile, în condiții optime pentru creșterea spirulinei: temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 8-10 și iluminarea de $37\text{-}55 \mu\text{M}$ fotoni/ $\text{m}^2 \cdot \text{s}$. Suplimentar, la mediul nutritiv se adaugă nanoparticule de Ag de 12 nm cu înveliș din polietilenglicol (PEG) în concentrația de 0,025-0,5 $\mu\text{M/L}$. Adăugarea nanoparticulelor se realizează în prima zi a ciclului de cultivare [1].

Neajunsul acestui procedeu constă în acumularea în exces a produselor degradării oxidative a lipidelor, confirmată prin valori crescute ale dialdehidei malonice în biomasă.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unui procedeu eficient și reproductibil de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* în prezența nanoparticulelor de Ag(PEG), prin care se evită acumularea în exces a produselor degradării oxidative a lipidelor.

Conform invenției, procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* include cultivarea cianobacteriei pe mediul nutritiv ce conține, în g/L: NaNO_3 -2,5, NaHCO_3 -8,0, NaCl -1,0, K_2SO_4 -1,0, Na_2HPO_4 -0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2, H_3BO_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; MoO_3 -0,000015, FeEDTA 1,0 ml/L și apă distilată restul, la temperatura de $30\text{-}32^\circ\text{C}$, pH 8,0-10,0 și iluminarea de $37\text{-}55 \mu\text{M}$ fotoni/ $\text{m}^2 \cdot \text{s}$ în regim continuu, timp de 6 zile, totodată în a cincea zi de cultivare în mediul nutritiv se adaugă nanoparticule de Ag în înveliș de polietilenglicol cu dimensiunea de până la 5 nm în concentrația de 0,10-0,12 $\mu\text{M/L}$.

Rezultatul invenției constă în reducerea conținutului dialdehidei malonice în biomasă, care nu depășește substanțial valorile de control (față de creșterea cu 26,2% a dialdehidei malonice în varianta celei mai apropiate soluții).

Astfel, procedeul propus se include în noua direcție de utilizare a nanoparticulelor în domeniul biotehnologiei în scopul obținerii unui produs calitativ și inofensiv.

Rezultatul obținut este condiționat de faptul că adăugarea nanoparticulelor se produce la sfârșitul fazei de creștere exponențială, ceea ce asigură reducerea timpului de contact al celulelor de spirulină cu nanoparticule.

Contactul nanoparticulelor cu celula spirulinei și acumularea lor cu fixarea în structurile celulare a modificat activitatea proceselor biosintetice. Totodată, vârsta culturii și reducerea timpului de contact cu nanoparticule au atenuat procesul de formare a radicalilor și acumularea în exces a produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasă spirulinei.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență, în g/L: NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -8,0; NaCl -1,0; K_2SO_4 -1,0; Na_2HPO_4 -0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2 și microelemente, în mg/L: H_3BO_3 -2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08; MoO_3 -0,015 și FeEDTA 1,0 ml/L și apă distilată restul. Cultura start este suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,3 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer cu volumul de 500 ml și volumul de lucru de 250 ml la temperatura de 30°C , pH 8,0-10,0 și iluminarea de $37\text{-}55 \mu\text{M}$ fotoni/ $\text{m}^2 \cdot \text{s}$ în regim continuu.

La ziua a 5-a a ciclului de cultivare, la cultura de spirulină se adaugă 0,12 $\mu\text{M/L}$ de nanoparticule de Ag(PEG) cu dimensiunea de până la 5 nm. Se mențin condițiile inițiale de cultivare. La sfârșitul ciclului de cultivare se colectează biomasa de spirulină și se determină componența biochimică. A fost obținut 1,23 g/L de biomasă, care conține 6,11% de lipide.

5 Conținutul dialdehidei malonice determinat în biomasă este de 3,86%, ceea ce este la nivelul probei martor (spirulina cultivată în lipsa nanoparticulelor).

Exemplul 2

Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență, în g/L: NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -8,0; NaCl -1,0; K_2SO_4 -1,0; Na_2HPO_4 -0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2 și microelemente, în mg/L: H_3BO_3 -2,86; 10 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08; MoO_3 -0,015 și FeEDTA 1,0 ml/L și apă distilată restul. Cultura start este suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,3 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer cu volumul de 500 ml și volumul de lucru de 250 ml la temperatura de 30°C, pH 8,0-10,0 și iluminarea de 37-55 μM fotoni/ $\text{m}^2 \cdot \text{s}$ în regim continuu.

15 La ziua a 5-a la cultura de spirulină se adaugă 0,10 $\mu\text{M/L}$ nanoparticule de Ag(PEG) cu dimensiunea de până la 5 nm. Se mențin condițiile de cultivare. La sfârșitul ciclului de cultivare se colectează biomasa de spirulină și se determină componența biochimică. A fost obținut 1,22 g/L de biomasă, care conține 6,02% de lipide. Conținutul dialdehidei malonice (DAM) determinat în biomasă este de 3,78%, ceea ce este la nivelul probei martor.

Tabel

20

Efectul cultivării în prezența AgNP(PEG) asupra compoziției biomasei de *Spirulina platensis*

Procedeeul utilizat	Compusul AgNP(PEG), $\mu\text{M/L}$	Timpul administrării AgNP (ziua de cultivare)	Conținutul de biomasă, g/L (spor % față de martor)	Conținutul de lipide, % biomasă, (spor % față de martor)	Conținutul de DAM acumulat, % biomasă, (spor % față de martor)
Conform celei mai apropiate soluții	0,1	1 zi	1,25 (31,6)	6,2 (28,6)	4,83 (26,2)
Conform soluției revendicate	0,12	a 5-a zi	1,23 \pm 0,004 (29,0-30,0)	6,11 \pm 0,06% (25,5-28,0%)	3,86 \pm 0,1% (-)
	0,10	a 5-a zi	1,22 \pm 0,01 (27,4-29,5)	6,02 \pm 0,08% (23,0-26,5%)	3,78 \pm 0,13 (-)
Martor (Control)	-	-	0,95 \pm 0,02	4,82 \pm 0,04%	3,83 \pm 0,04

25

Astfel, conform datelor prezentate în tabel, prin aplicarea procedeeului propus se obține o reducere semnificativă a valorilor dialdehidei malonice, care sunt la nivelul probei martor (*Spirulina* cultivată în lipsa nanoparticulelor) și cu 26% mai mici față de soluția proximă. Efectul de stimulare a activității biosintetice al AgNP(PEG) se păstrează.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Cepoi L., Zinicovscaia I., Rudi L., Chiriac T., Rotari I., Turchenko V., Djur S. Effects of PEG-Coated Silver and Gold Nanoparticles on *Spirulina platensis* Biomass during Its Growth in a Closed System. *Coatings*, 2020, 10(8), 717, regăsit în Internet la 22.11.2021, URL: <https://www.mdpi.com/2079-6412/10/8/717>

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea cianobacteriei pe mediul nutritiv ce conține, în g/L: NaNO₃-2,5, NaHCO₃-8,0, NaCl-1,0, K₂SO₄-1,0, Na₂HPO₄-0,2, MgSO₄·7H₂O-0,2, H₃BO₃-0,00286, MnCl₂·4H₂O-0,00181, CuSO₄·5H₂O-0,00008, MoO₃-0,000015, FeEDTA 1,0 ml/L și apă distilată restul, la temperatura de 30-32°C, pH 8,0-10,0 și iluminarea de 37-55 μM fotoni/m²·s în regim continuu, timp de 6 zile, totodată în a cincea zi de cultivare în mediul nutritiv se adaugă nanoparticule de Ag în înveliș de polietilenglicol cu dimensiunea de până la 5 nm în concentrație de 0,10-0,12 μM/L.