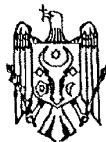




MD 2386 C2 2004.02.29

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2386⁽¹³⁾ C2
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/20, 1/12;
A 01 G 33/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2001 0148 (22) Data depozit: 2001.05.15 (41) Data publicării cererii: 2003.02.28, BOPI nr. 2/2003</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2004.02.29, BOPI 2/2004</p>
<p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; TURTĂ Constantin, MD; BULIMAGA Valentina, MD; DENCICOV Lidia, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; LĂZĂRESCU Ana, MD (73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII 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*, care reprezintă o sursă de ficobiliproteine și carotenoizi, folosiți în industria farmaceutică și alimentară, precum și în cosmetologie.

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* include inocularea acesteia pe un mediu nutritiv cu următorul raport al ingredientelor (g/L): NaHCO₃ - 16,8; K₂HPO₄·3H₂O - 1,0; NaNO₃ - 2,5; NaCl - 1,0; K₂SO₄ - 1,0; CaCl₂·6H₂O - 0,04; MgSO₄·7H₂O - 0,20; H₃BO₃ - 0,00286; MnCl₂·4H₂O - 0,00181; ZnSO₄·7H₂O - 0,00022; CuSO₄·5H₂O - 0,00008; MoO₃ - 0,000015. În a treia zi de cultivare în acest mediu se adaugă unul dintre următorii compuși coordinați: azotat de hexa-μ-glicinato(O,O')-μ₃-oxotriacvotri-

2
fier(III)trihidrat- [Fe₃O(Gly)₆(H₂O)₃]NO₃·3H₂O, de hexa-μ-treoninato(O,O')-μ₃-oxotriacvotri fier(III) -
5 [Fe₃O(Tre)₆(H₂O)₃]NO₃ sau de hexa-μ-alaninato(O,O')-μ₃-oxotriacvotri fier(III)tetrahidrat -
[Fe₃O(Ala)₆(H₂O)₃]NO₃·4H₂O în cantitate de 5...10 mg/L, totodată cultivarea se efectuează timp de 6 zile. Procedeu se efectuează la temperatura de 30...35°C și iluminarea de 3000...4000 lx.

10 Rezultatul invenției constă în intensificarea procesului de fotosinteză, ceea ce contribuie la sporirea productivității spirulinei, precum și a conținutului de carotenoizi și ficobiliproteine în biomasă.

15 Revendicări: 1

MD 2386 C2 2004.02.29

MD 2386 C2 2004.02.29

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care reprezintă o sursă de ficobiliproteine și carotenoizi, folosiți în industria farmaceutică și alimentară, precum și în cosmetologie.

5 Este cunoscut un procedeu de cultivare a spirulinei, care prevede utilizarea mediului de cultivare cu următoarea compoziție (g/L): $\text{Na}_2\text{CO}_3 - 9,00 \dots 12,00$; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 - 0,16 \dots 0,24$; $\text{NaNO}_3 - 0,48 \dots 0,72$; $\text{KCl} - 0,08 \dots 0,12$; $(\text{NH}_2)_2\text{CO} - 0,22 \dots 0,32$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,064 \dots 0,096$; $\text{NaCl} - 1,44 \dots 2,20$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,0028$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$; $\text{MoO}_3 - 0,000015$; $\text{NH}_4\text{VO}_3 - 0,000023$; $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4) \cdot 24\text{H}_2\text{O} - 0,000096$; $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,0000479$;
10 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,000044$; în calitate de sursă de fier - citratul amoniacal de fier - $0,008 \dots 0,012$; apă de robinet - până la 1 L; cultivarea în regim de acumulare timp de 10 zile, pH-ul mediului $8 \dots 9$, temperatura $35 \pm 1^\circ\text{C}$, iluminarea de 80 W/m^2 [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în durata îndelungată a procesului de cultivare (10 zile) pentru o productivitate a spirulinei de $1,4 \pm 1,6 \text{ g/L}$.

15 Mai este cunoscut un procedeu de cultivare a spirulinei, în care se utilizează mediul nutritiv modificat Zarrouk cu următoarea compoziție, g/L: $\text{NaHCO}_3 - 16,8$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,1$; $\text{KNO}_3 - 3,75$; $\text{NaCl} - 1,0$; $\text{K}_2\text{SO}_4 - 3,75$; $\text{CaCl}_2 - 0,04$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,7$; $\text{Fe}(\text{Lis})_2 - 0,001 \dots 0,01$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$; $\text{MoO}_3 - 0,000015$, apă de robinet - până la 1 L; cultivarea în regim de acumulare, iluminarea $15 \dots 24$ mii erg/cm^2 , temperatura $35 \pm 1^\circ\text{C}$, pH-ul optim al
20 mediului $9,5 \dots 10,0$ [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că mediul utilizat nu asigură o productivitate înaltă și nu permite obținerea unei biomase cu un conținut mai sporit de carotenoizi și ficobiliproteine.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de cultivare a spirulinei care asigură sporirea productivității ei, contribuind și la ameliorarea calității ei prin sporirea
25 conținutului de carotenoizi și de ficobiliproteine.

Esența invenției constă în aceea că se propune un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include inocularea și cultivarea acesteia pe un mediu nutritiv cu următorul raport al ingredientelor, g/L de apă: $\text{NaHCO}_3 - 16,8$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 1,0$; $\text{NaNO}_3 - 2,5$; $\text{NaCl} - 1,0$; $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$;
30 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$; $\text{MoO}_3 - 0,000015$. La a treia zi de cultivare în acest mediu se adaugă unul dintre compușii coordinativi: azotat de hexa- μ -glicinato(O,O')- μ_3 -oxotriacvotri-
frier(III)trihidrat - $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; de hexa- μ -treoninato(O,O')- μ_3 -oxotriacvotri-
frier(III)- $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Tre})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3$ sau de hexa- μ -alaninato(O,O')- μ_3 -oxotriacvotri-
frier(III)tetrahidrat - $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Ala})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ în cantitate de $5 \dots 10 \text{ mg/L}$, totodată cultivarea se efectuează timp de 6
35 zile la temperatura de $30 \dots 35^\circ\text{C}$, la iluminarea de $3000 \dots 4000 \text{ lx}$.

Noutatea invenției constă în aceea că se propune un procedeu de cultivare a spirulinei, conform căruia în mediu la a treia zi de cultivare se adaugă unul din compușii coordinativi: $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Tre})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3$ sau $[\text{FeO}(\text{Ala})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Rezultatul invenției constă în:

- 40 - asigurarea unei majorări a productivității spirulinei de $1,2 \dots 1,25$ ori;
- sporirea conținutului de ficobiliproteine de $1,84 \dots 2,1$ ori;
- sporirea conținutului de carotenoizi de $1,14 \dots 1,52$ ori

în comparație cu cea mai apropiată soluție.

Rezultatul obținut se datorează faptului că compușii coordinativi utilizați:
45 $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Tre})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3$, $[\text{FeO}(\text{Ala})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, fiind compuși trinucleari ce conțin 3 atomi de fier și 6 molecule de aminoacid, influențează asupra activității enzimelor care intensifică procesul de fotosinteză și respectiv crește productivitatea. Carbonul organic care intră în componența aminoacidului inclus în compusul utilizat sporește sinteza acetyl CoA, care și intensifică procesul de ficobilinogeneză și de carotenogeneză.

50 Aminoacizii pot servi și la sinteza aminoacizilor de novo, care sunt incluși în moleculele de ficobiliproteine.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

55 Se prepară mediul nutritiv cu următoarea compoziție (g/L): $\text{NaHCO}_3 - 16,8$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 1,0$; $\text{NaNO}_3 - 2,5$; $\text{NaCl} - 1,0$; $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$; $\text{MoO}_3 - 0,000015$; apă de robinet până la 1 L. Se introduce suspensia de spirulină în cantitate de $0,4 \dots 0,45 \text{ g/L}$. Cultura de spirulină se transferă cantitativ (câte 500 mL) în retorte Erlenmayer cu volumul de 1 L. Cultivarea se desfășoară timp de 6 zile, respectând temperatura de 30°C și iluminarea de 3000 lx în primele 2 zile ale
60 cultivării. În ziua a 3-a la cultura de spirulină se suplimentează $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ în

MD 2386 C2 2004.02.29

4

cantitate de 0,005 g/L. Pentru următoarele zile ale cultivării se menține temperatura de 35°C și iluminarea de 4000 lx. În ziua a 6-ea se determină productivitatea, după care cultura de spirulină se separă de lichidul cultural prin filtrare, iar în biomasa obținută se determină conținutul de ficobiliproteine și carotenoizi.

- 5 Productivitatea spirulinei la ziua a cincea este de 1,86 g/L biomasă absolut uscată. Biomasa de spirulină conține 21,68% ficobiliproteine și 1,24% carotenoizi.

Exemplul 2

Se prepară mediul nutritiv cu următoarea compoziție (g/L): NaHCO₃ – 16,8; K₂HPO₄•3H₂O – 1,0; NaNO₃ – 2,5; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; CaCl₂•6H₂O – 0,04; MgSO₄•7H₂O – 0,20; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂•4H₂O – 0,00181; ZnSO₄•7H₂O – 0,00022; CuSO₄•5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015; apă de robinet până la 1 L. Se introduce suspensia de spirulină în cantitate de 0,4...0,45 g/L. Cultura de spirulină se transferă cantitativ (câte 500 mL) în retorte Erlenmayer cu volumul de 1 L. Cultivarea se desfășoară timp de 6 zile, respectând temperatura de 30°C și iluminarea de 3000 lx în primele 2 zile ale cultivării. În ziua a 3-a la cultura de spirulină se suplimentează 0,01 g/L [Fe₃O(Tre)₆(H₂O)₃]NO₃. Pentru următoarele zile ale cultivării se stabilește temperatura de 35°C și iluminarea de 4000 lx. În ziua a 6-ea se determină productivitatea, după care cultura de spirulină se separă de lichidul cultural prin filtrare, iar în biomasa obținută se determină conținutul de ficobiliproteine și carotenoizi.

- 15 Productivitatea culturii în ziua a șasea este de 1,87 g/L biomasă absolut uscată. Biomasa de spirulină conține 19,01% ficobiliproteine și 1,20% carotenoizi.

Exemplul 3

Se prepară mediul nutritiv cu următoarea compoziție (g/L): NaHCO₃ – 16,8; K₂HPO₄•3H₂O – 1,0; NaNO₃ – 2,5; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; CaCl₂•6H₂O – 0,04; MgSO₄•7H₂O – 0,20; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂•4H₂O – 0,00181; ZnSO₄•7H₂O – 0,00022; CuSO₄•5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015; apă de robinet până la 1 L. Se introduce suspensia de spirulină în cantitate de 0,4...0,45 g/L. Cultura de spirulină se transferă cantitativ (câte 500 mL) în retorte Erlenmayer cu volumul de 1 L. Cultivarea se desfășoară timp de 6 zile, respectând temperatura de 30°C și iluminarea de 3000 lx în primele 2 zile ale cultivării. În ziua a 3-a la cultura de spirulină se suplimentează 0,01 g/L [Fe₃O(Ala)₆(H₂O)₃]NO₃•4H₂O. Pentru următoarele zile ale cultivării se stabilește temperatura de 35°C și iluminarea de 3000 lx. La ziua a 6-ea se determină productivitatea, după care cultura de spirulină se separă de lichidul cultural prin filtrare, iar în biomasa obținută se determină conținutul de ficobiliproteine și carotenoizi.

- 20 Productivitatea culturii în ziua a șasea este de 1,92 g/L biomasă absolut uscată. Biomasa de spirulină conține 21,06% ficobiliproteine și 1,60% carotenoizi.

Tabel

Unele caracteristici ale biomasei obținute la cultivarea *Spirulina platensis*

35

Procedul utilizat	Compusul coordonativ	Concentrația, g/L	Productivitatea, g/L	Ficobiliproteine, % din biomasă	Carotenoizi, % din biomasă
Conform celei mai apropiate soluții	Fe(Lis) ₂	0,001	1,454±0,06*	10,32	1,05±0,05*
		0,010	1,237±0,05	1,21	0,50±0,01
Conform soluției propuse în invenție	[Fe ₃ O(Gly) ₆ (H ₂ O) ₃]NO ₃ •3H ₂ O	0,005	1,86±0,07	21,68±0,58	1,24±0,032
	[Fe ₃ O(Tre) ₆ (H ₂ O) ₃]NO ₃	0,010	1,87±0,04	19,01±0,20	1,20±0,018
	[FeO(Ala) ₆ (H ₂ O) ₃]NO ₃ •4H ₂ O	0,010	1,92±0,04	21,06±0,09	1,60±0,052

Notă: *Productivitatea și conținutul de carotenoizi au fost determinate în condiții experimentale conform celei mai apropiate soluții.

- 40 Datele tabelului atestă creșterea productivității de 1,2...1,25 ori, sporirea conținutului de ficobiliproteine de 1,84...2,1 ori și a conținutului de carotenoizi de 1,14...1,52 ori în procedul propus în invenție față de procedul din cea mai apropiată soluție.

MD 2386 C2 2004.02.29

5

(57) Revendicare:

5 Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include inocularea și cultivarea acesteia pe un mediu nutritiv, conținând (în g/L de apă): NaHCO₃ – 16,8; K₂HPO₄·3H₂O – 1,0; NaNO₃ – 2,5; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; CaCl₂·6H₂O – 0,04; MgSO₄·7H₂O – 0,20; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015 și unul din compușii coordinațivi: azotat de hexa-μ-glicinato(O,O')- μ₃-oxotriacvotri-
10 fier(III)trihidrat - [Fe₃O(Gly)₆(H₂O)₃]NO₃·3H₂O, de hexa-μ-treoninato(O,O')-μ₃-oxotriacvotri-
fier(III) - [Fe₃O(Tre)₆(H₂O)₃]NO₃ sau de hexa-μ-alaninato(O,O')-μ₃-oxotriacvotri-
10 fier(III)tetrahidrat - [Fe₃O(Ala)₆(H₂O)₃]NO₃·4H₂O, care se adaugă în mediu în a treia zi de cultivare în cantitate de 5...10 mg/L, totodată cultivarea se efectuează timp de 6 zile, la iluminarea de 3000 ... 4000 lx și temperatura de 30 ... 35°C.

15

(56) Referințe bibliografice:

1. SU 1480353 A1 1987.04.23
2. Rudic Valeriu, Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău, „Știința”, 1993, p. 74-76

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria