



MD 4543 B1 2017.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4543** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/12* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)
C01G 7/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>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</p>	
<p>(21) Nr. depozit: a 2017 0018 (22) Data depozit: 2017.02.15</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.12.31, BOPI nr. 12/2017</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p> <p>(72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; RUDI Liudmila, MD; ZINICOVSCAIA Inga, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; CEPOI Liliana, MD; DJUR Svetlana, MD; IUSHIN Nikita, RU</p> <p>(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(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*.

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* prevede cultivarea culturii pe un mediu nutritiv mineral ce conține, g/L: NaNO₃ – 2,25, NaHCO₃ – 8,0, NaCl – 1,0, K₂SO₄ – 0,3, Na₂HPO₄ – 0,2, MgSO₄·7H₂O – 0,2, CaCl₂ – 0,024, FeSO₄ – 0,01, EDTA – 0,08, H₃BO₃ – 0,00286, MnCl₂·4H₂O – 0,00181, ZnSO₄·7H₂O – 0,00022, CuSO₄·5H₂O – 0,00008, MoO₃ – 0,000015, nanoparticule hidrosolubile de aur cu

2
dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0,0088...0,0091 g/L și apă distilată până la 1L, la temperatura de 25...28°C, pH 8,0...10,0, iluminarea de 3000...4000 lx în regim continuu în decurs de 5 zile.

Rezultatul invenției constă în stimularea producerii de biomasă de spirulină și a conținutului de lipide în biomasă cu scopul obținerii materiei prime pentru elaborarea și fabricarea remediilor cu acțiune anticanceroasă, imunostimulatoare și antioxidantă.

Revendicări: 1

MD 4543 B1 2017.12.31

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

1

The invention refers to biotechnology, in particular to a process for cultivation of *Spirulina platensis* cyanobacterium.

The process for cultivation of *Spirulina platensis* cyanobacterium provides for the cultivation on a mineral nutrient medium containing, g/L: NaNO₃ – 2.25; NaHCO₃ – 8.0; NaCl – 1.0; K₂SO₄ – 0.3; Na₂HPO₄ – 0.2; MgSO₄·7H₂O – 0.2; CaCl₂ – 0.024; FeSO₄ – 0.01; EDTA – 0.08; H₃BO₃ – 0.00286; MnCl₂·4H₂O – 0.00181; ZnSO₄·7H₂O – 0.00022; CuSO₄·5H₂O – 0.00008; MoO₃ – 0.000015, water-soluble gold nanoparticles

2

with a size of 5 nm in a concentration of 0.0088...0.0091 g/L and distilled water up to 1 L, at a temperature of 25...28°C, pH 8.0...10.0, with continuous illumination of 3000...4000 lx for 5 days.

The result of the invention consists in increasing the production of spirulina biomass and the content of lipids in biomass in order to obtain raw material for the development and production of anticancer, immunostimulating and antioxidant agents.

Claims: 1

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

1

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу культивирования цианобактерии *Spirulina platensis*.

Способ культивирования цианобактерии *Spirulina platensis* включает культивирование на минеральной питательной среде, содержащей, г/л: NaNO₃ – 2,25, NaHCO₃ – 8,0, NaCl – 1,0, K₂SO₄ – 0,3, Na₂HPO₄ – 0,2, MgSO₄·7H₂O – 0,2, CaCl₂ – 0,024, FeSO₄ – 0,01, EDTA – 0,08, H₃BO₃ – 0,00286, MnCl₂·4H₂O – 0,00181, ZnSO₄·7H₂O – 0,00022, CuSO₄·5H₂O – 0,00008, MoO₃ – 0,000015,

2

водорастворимые наночастицы золота размером в 5 нм в концентрации 0,0088...0,0091 г/л и дистиллированную воду до 1 л, при температуре 25...28°C, pH - 8,0...10,0, при постоянном освещении в 3000...4000 люкс в течение 5 дней.

Результат состоит в увеличении выхода биомассы спирулины и содержания липидов в биомассе с целью получения сырья для разработки и производства средств противоракового, иммуностимулирующего и антиоксидантного действия.

П. формулы: 1

Descriere:
(Descrierea se publică în redacția solicitantului)

- 5 Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*.
- 10 Nanotehnologiile au imigrat rapid din domeniul tehnic în medicină, dar și biotehnologie, creând un nou domeniu științifico-practic - bionanotehnologia. A fost extinsă aria aplicării nanoparticulelor. A fost demonstrat efectul pozitiv al nanoparticulelor asupra creșterii și a metabolismului celular. Dimensiunile mici ale nanoparticulelor favorizează interacțiunea lor cu suprafața celulară și pătrunderea în citosol. Nanoparticulele pot fi o sursă alternativă favorabilă oligoelementelor care au funcția de stimulatori ai activității biosintetice. Procedeu propus se include în noua direcție de utilizare a nanoparticulelor în domeniul biotehnologiei.
- 15 Este cunoscut procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* pe mediul mineral nutritiv ce conține, g/L: $\text{NaHCO}_3 - 4,5$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,5$, $\text{NaNO}_3 - 1,5$, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$, $\text{NaCl} - 1,0$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 1,2$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,04$, $\text{FeSO}_4 - 0,01$ și pH 9,0. Durata cultivării este de 10 zile. În compoziția mediului de cultivare fosfatul de potasiu a fost înlocuit cu 0,09 g/L $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$ sub forma de nanoparticule cu dimensiunea de 200 nm. Conform acestui procedeu producerea de biomasă crește cu 21% [1].
- 20 Dezavantajul acestui procedeu constă lipsa unui efect vizibil de stimulare a activității biosintetice și în durata ciclului de cultivare.
- Cea mai apropiată soluție este procedeu de cultivare a cianobacteriei *Arthrospira (Spirulina) maxima* pe mediul mineral Zehnder varianta Z8 cu componența în g/l: $\text{NaNO}_3 - 0,467$, $\text{Na}_2\text{CO}_3 - 0,02$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,059$, $\text{NH}_4\text{Cl} - 0,031$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,0031$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00223$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,000088$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,000146$, $\text{VOSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,000054$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,000474$, $\text{NiSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,000198$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,000154$, $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,000037$, $\text{Na}_2\text{W}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,000033$, $\text{KBr} - 0,000119$, $\text{KI} - 0,000083$. Mediul de cultivare este suplimentat cu 2% CO_2 . Fierul din mediul nutritiv a fost înlocuit cu Fe nanoparticule în concentrația 0,0051 g/L. Durata cultivării a fost de 9 zile. Cultivarea a fost efectuată în godeuri în condiții axenice. Conform procedurii, producerea de biomasă crește cu 16%, iar conținutul lipidelor crește cu 21% [2].
- 30 Dezavantajul acestui procedeu constă în durata ciclului de cultivare și lipsa unui spor de biomasă de spirulină.
- 35 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu eficient și reproductibil de sporire a producerii de biomasă și a conținutului de lipide în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*.
- 40 Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că prevede cultivarea culturii pe un mediu nutritiv mineral ce conține, g/L: $\text{NaNO}_3 - 2,25$, $\text{NaHCO}_3 - 8,0$, $\text{NaCl} - 1,0$, $\text{K}_2\text{SO}_4 - 0,3$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 0,2$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,2$, $\text{CaCl}_2 - 0,024$, $\text{FeSO}_4 - 0,01$, $\text{EDTA} - 0,08$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$, $\text{MoO}_3 - 0,000015$, nanoparticule hidrosolubile de aur cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0,0088...0,0091 g/L și apă distilată până la 1L, la temperatura de 25...28°C, pH 8,0...10,0, iluminarea de 3000...4000 lx în regim continuu în decurs de 5 zile.
- 45 Rezultatul invenției constă în asigurarea unei majorări de producere de biomasă cu 40-44% și a conținutului de lipide în biomasă cu 28-33%.
- 50 Rezultatul obținut este condiționat de efectul nanoparticulelor de Au care, datorită dimensiunilor mici (5 nm) pătrund rapid în celule și stimulează reproducerea celulară, drept urmare durata ciclului de cultivare se reduce până la 5 zile. Contactul nanoparticulelor cu membrana celulară induce stimularea producerii lipidelor. Totodată, în biomasa cianobacteriană nu se diminuează conținutul de proteine, glucide și pigmenți.
- 55

Exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

Se prepară mediul mineral nutritiv cu următoarea componență (g/L): NaNO₃ – 2,25, NaHCO₃ – 8,0, NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 0,3, Na₂HPO₄ - 0,2; MgSO₄·7H₂O – 0,2, CaCl₂ – 0,024, FeSO₄ – 0,01, EDTA – 0,08, H₃BO₃ – 0,00286, MnCl₂·4H₂O – 0,00181, ZnSO₄·7H₂O – 0,00022, CuSO₄·5H₂O – 0,00008, MoO₃ – 0,000015 și apă distilată până la 1L. La mediul preparat se adaugă 0,0088 g/L nanoparticule de Au. Cultura start este suspensia de *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 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 25°C, pH-ul 8,0-10,0 și iluminarea de 3000-4000 lx în regim continuu.

La a 5-a zi se colectează biomasa de spirulină și se determină conținutul de lipide. A fost obținut 1,30 g/L biomasă. Conținutul lipidelor în biomasă este de 6,27%.

Exemplul 2

Se prepară mediul mineral nutritiv cu următoarea componență (g/L): NaNO₃ – 2,25, NaHCO₃ – 8,0, NaCl – 1,0, K₂SO₄ – 0,3, Na₂HPO₄ - 0,2, MgSO₄·7H₂O – 0,2, CaCl₂ – 0,024, FeSO₄ – 0,01, EDTA – 0,08, H₃BO₃ – 0,00286, MnCl₂·4H₂O – 0,00181, ZnSO₄·7H₂O – 0,00022, CuSO₄·5H₂O – 0,00008, MoO₃ – 0,000015 și apă distilată până la 1L. La mediul preparat se adaugă 0,0091 g/L nanoparticule de Au. Cultura start este suspensia de *Spirulina platensis* CNMN-CB-01 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 28°C, la pH-ul 8,0-10,0 și iluminarea de 3000-4000 lx în regim continuu.

La a 5-a zi se colectează biomasa de spirulină și se determină conținutul de lipide. A fost obținut 1,38 g/L biomasă. Conținutul lipidelor în biomasă este de 6,52%.

Tabel

Cantitatea de biomasă de *Spirulina platensis* și conținutul lipidelor în biomasă la cultivare conform procedurii propus în invenție și soluției celei mai apropiate

Procedeeul utilizat	Compusul (nanoparticule), concentrația g/L	Durata ciclului de cultivare, zile	Sporul de biomasă de spirulină, % (biomasa, g/L)	Sporul conținutului de lipide în biomasă, % (conținutul, % biomasă)
Conform soluției [1]	Ca ₅ [OH](PO ₄) ₃ , 0,09 g/L	10	21%	-
Conform celei mai apropiate soluții [2]	FeNP, 0,0051 g/L	9	16%	21%
Conform soluției revendicate	AuNP, 0,0088 g/L	5	40% (1,30±0,06)	28% (6,27±0,10)
	AuNP, 0,0091 g/L	5	44% (1,38±0,03)	33% (6,52±0,07)

Astfel, datele din tabel demonstrează majorarea de 1,9-2,0 ori a producerii de biomasă și de 1,3-1,57 ori a conținutului de lipide în biomasa spirulinei în procedeeul propus în invenție față de procedeele cele mai apropiate.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. J. A. Lone, A. Kumar, S. Kundu, F. A. Lone, M. R. Suseela. Characterization of Tolerance Limit in *Spirulina platensis* in Relation to Nanoparticles. *Water Air Soil Pollut*, 2013, 224:1670.
2. Karolína Pádřová, Jaromír Lukavský, Linda Nedbalová, Alena Čejková, Tomáš Cajthaml, Karel Sigler, Milada Vítová, Tomáš Řezanka. Trace concentrations of iron nanoparticles cause overproduction of biomass and lipids during cultivation of cyanobacteria and microalgae. *Journal of Applied Phycology* <<http://link.springer.com/journal/10811>>, 2015, 27(4), p. 1443-1451

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care prevede cultivarea culturii pe un mediu nutritiv mineral ce conține, g/L: NaNO₃ – 2,25, NaHCO₃ – 8,0, NaCl – 1,0, K₂SO₄ – 0,3, Na₂HPO₄ – 0,2, MgSO₄·7H₂O – 0,2, CaCl₂ – 0,024, FeSO₄ – 0,01, EDTA – 0,08, H₃BO₃ – 0,00286, MnCl₂·4H₂O – 0,00181, ZnSO₄·7H₂O – 0,00022, CuSO₄·5H₂O – 0,00008, MoO₃ – 0,000015, nanoparticule hidrosolubile de aur cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0,0088...0,0091 g/L și apă distilată până la 1L, la temperatura de 25...28°C, pH 8,0...10,0, iluminarea de 3000...4000 lx în regim continuu în decurs de 5 zile.