



MD 167 Y 2010.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **167** ⁽¹³⁾ **Y**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2009 0211 (22) Data depozit: 2009.11.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.03.31, BOPI nr. 3/2010
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BATIR Liudmila, MD; RUDIC Valeriu, MD; BULIMAGA Valentina, MD; ZOSIM Liliana, MD; ELENCIUC Daniela, MD; GULEA Aurelian, MD; BEJENARI Natalia, MD; ȚAPCOV Victor, 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, în particular la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de ficobili-proteine, care pot fi utilizate în industria farmaceutică și medicină.

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* include cultivarea pe un mediu nutritiv, conținând, 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 –

2
0,000015; 1mL de soluție FeHEDTA de 0,09 M, apă distilată până la 1 L. La a 2-a zi de cultivare în mediu se adaugă 3...4 mg/L de hidrat al nitrului de 5-nitrosalicilidentiosemicarbazido(1-)aquacupru(II). Cultivarea se efectuează timp de 6 zile, la temperatura de 30...35°C, la iluminarea de 2000...3000 lx în primele 2 zile și de 3000...4000 lx în următoarele zile.

Revendicări:1

Descriere:

Invenția se referă la ficobiotehnologie, în particular la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de ficobiliproteine, care pot fi utilizate în industria farmaceutică și medicină.

5 Ficobiliproteinele sunt utilizate pe scară largă în industria cosmetică și farmaceutică, au proprietăți antiinflamatoare, neuro- și hepatoprotectoare, dar și antioxidante.

Este cunoscut un procedeu de cultivare a algelor și cianobacteriilor, unde dintre 18 tulpini studiate, cianobacteria *Spirulina platensis* NCCU-S5 are un conținut de ficobiliproteine de 62,5 mg/g din masa celulară uscată. Acest procedeu constă în creșterea culturii la pH 8,0, la temperatura de 30±1°C, intensitatea luminii 25 μmol fotoni/m²/s, în regim de noapte/zi timp de 27 zile [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în durata îndelungată de cultivare, care are loc 27 zile și nu duce la un conținut sporit de ficobiliproteine.

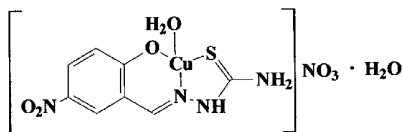
Mai este cunoscut un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de ficobiliproteine, care include inocularea și cultivarea spirulinei pe un mediu nutritiv cu următorul conținut al ingredientelor (g/L): NaHCO₃ – 16,8; K₂HPO₄·3H₂O – 1,0; NaNO₃ – 2,5; NaCl – 1,0; 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 compușii coordinativi: azotat de hexa-μ-glicinato(O,O')-μ₃-oxotriacvotriier(III)trihidrat-[Fe₃O(Gly)₆(H₂O)₃]NO₃·3H₂O, de hexa-μ-treoninato(O,O')-μ₃-oxotriacvotriier(III)-[Fe₃O(Tre)₆(H₂O)₃]NO₃ sau de hexa-μ-alaninato(O,O')-μ₃-oxotriacvotriier(III)trihidrat-[Fe₃O(Ala)₆(H₂O)₃]NO₃·3H₂O în cantitate de 5...10 mg/L, cultivarea se efectuează timp de 6 zile, la o temperatură de 30...35°C și iluminarea de 3000...4000 lx [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că cultivarea spirulinei conform procedeeului asigură obținerea unei biomase cu un conținut doar de 21,68% de ficobiliproteine ca parte componentă a biomasei.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de ficobiliproteine - sursă de substanțe bioactive utilizate în industria farmaceutică, medicina clinică și experimentală.

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* include cultivarea pe un mediu nutritiv, conținând, 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; 1 mL de soluție FeHEDTA de 0,09 M, apă distilată până la 1L. La a 2-a zi de cultivare în mediu se adaugă 3...4 mg/L de hidrat al nitrului de 5-nitrosalicilidentiosemicarbazido(1-)aqua-cupru(II). Cultivarea se efectuează timp de 6 zile, la temperatura de 30...35°C, la iluminarea de 2000...3000 lx în primele 2 zile și de 3000...4000 lx în următoarele zile.

Compusul coordinativ al Cu(II), hidratul nitrului de 5-nitrosalicilidentiosemicarbazido(1-)aqua-cupru(II) este descris în MD 3890 G2 2009.04.30 și are următoarea formulă de structură:



Rezultatul invenției constă în asigurarea unei majorări a conținutului de ficobiliproteine în biomasa de spirulină de 1,27...1,40 ori sau 27,50...30,33 % din biomasa absolut uscată (BAU).

Rezultatul obținut se datorează faptului că compușii coordinativi ai Cu(II) cauzează stresul oxidativ în celulele spirulinei și ca rezultat are loc sinteza sporită a ficobiliproteinelor, pigmenti ce fac parte din fotosistemul II.

Exemplu de realizare a invenției

Exemplul 1

Se prepară mediul nutritiv mineral SP-1 cu următoarea componență (g/L): NaNO₃ 2,5; NaHCO₃ 16,8; NaCl 1,0; K₂SO₄ 1,0; K₂HPO₄·3H₂O 1,0; MgSO₄·7H₂O 0,20; CaCl₂·6H₂O 0,04; H₃BO₃ 0,00286; MnCl₂·4H₂O 0,00181; ZnSO₄·7H₂O 0,00022; CuSO₄·5H₂O 0,00008; MoO₃ 0,000015; 1 mL soluție FeHEDTA de 0,09M și apă distilată până la 1L.

La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40 g/L. În a doua zi de cultivare suspensia de spirulină se suplimentează cu 3 mg/L de hidrat al nitrului de 5-nitrosalicilidentiosemicarbazido(1-)aqua-cupru(II).

Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 250 mL cu 100 mL suspensie în următoarele condiții: iluminarea de 2000 ... 3000 lx în primele 2 zile și de 3000 ... 4000 lx în următoarele zile ale cultivării, la pH 9,5 ... 10,0 și la o temperatură de 30° C.

MD 167 Y 2010.03.31

4

La ziua a șaptea biomasa se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se determină conținutul de ficobiliproteine.

Biomasa obținută conține 27,50% de ficobiliproteine din BAU față de 21,68% în cazul soluției celei mai apropiate.

5 Exemplul 2

Se prepară mediul nutritiv mineral SP-1 cu următoarea componență (g/L): NaNO₃ 2,5; NaHCO₃ 16,8; NaCl 1,0; K₂SO₄ 1,0; K₂HPO₄·3H₂O 1,0; MgSO₄·7H₂O 0,20; CaCl₂·6H₂O 0,04; H₃BO₃ 0,00286; MnCl₂·4H₂O 0,00181; ZnSO₄·7H₂O 0,00022; CuSO₄·5H₂O 0,00008; MoO₃ 0,000015; 1 mL soluție FeHEDTA de 0,09M și apă distilată până la 1L.

10 La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40 g/L. În a doua zi de cultivare suspensia de spirulină se suplimentează cu 4 mg/L de hidrat al nitrului de 5-nitrosalicilidentiosemicarbazido(1-)aquacupru(II).

15 Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 250 mL cu 100 mL suspensie în următoarele condiții: iluminarea de 2000...3000 lx în primele 2 zile și de 3000...4000 lx în următoarele zile ale cultivării, la pH 9,5...10,0 și la o temperatură de 32° C.

La ziua a șaptea biomasa se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se determină conținutul de ficobiliproteine.

Biomasa obținută conține 30,33% ficobiliproteine din BAU față de 21,68% în cazul soluției celei mai apropiate.

20

Conținutul ficobiliproteinelor în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*
la cultivare conform procedurii propus în invenție
și soluției celei mai apropiate

Procedul utilizat	Compusul	Concentrația compusului, mg/L	Conținutul ficobiliproteinelor, % din BAU
Conform soluției celei mai apropiate	[Fe ₃ O(Gly) ₆ (H ₂ O) ₃]NO ₃ ·3H ₂ O	5	21,68±0,580
Conform invenției	Hidratul nitrului de 5-nitrosalicilidentiosemicarbazido (1-)aquacupru(II)	3	27,50±0,110
		4	30,33±0,130

25

Datele tabelului demonstrează majorarea de 1,27 ... 1,4 ori a conținutului de ficobiliproteine în biomasa de spirulină în procedeul propus în invenție față de procedeul cel mai apropiat.

MD 167 Y 2010.03.31

5

(57) Revendicări:

- 5 Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea timp de 6 zile pe un mediu nutritiv, conținând, g/L: NaHCO_3 – 16,8; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; NaNO_3 – 2,5; NaCl – 1,0; K_2SO_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; H_3BO_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; MoO_3 – 0,000015 și apă distilată până la 1 L, la care se adaugă un compus coordinativ, totodată cultivarea se efectuează la iluminarea de 3000...4000 lx și temperatura de 30...35°C, **caracterizat prin aceea că** mediul nutritiv conține suplimentar 1mL/L de soluție FeHEDTA de 0,09 M, iar în calitate de compus coordinativ se utilizează
- 10 hidratul nitrului de 5-nitrosalicilidentiosemicarbazido(1-)-aquacupru(II), care se adaugă în mediu la a 2-a zi de cultivare în cantitate de 3...4 mg/L, totodată în primele 2 zile cultivarea se efectuează la iluminarea de 2000...3000 lx.

15

(56) Referințe bibliografice:

1. Hemlata Tasneem Fatma. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2009, Vol. 83, № 4, 509-515
2. MD 2386 C2 2003.02.28

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

UNGUREANU Mihail

RAPORT DE DOCUMENTARE

pentru cerere de brevet de invenție de scurtă durată conform art.52(2) a Legii nr. 50/2008

(21) Nr. depozit: s 2009 0211		
(22) Data depozit: 2009.11.13		
(51) IPC: Int. Cl.: C12N 1/12 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01) C07C 215/12 (2006.01) Titlul: Procedeu de cultivare a cianobacteriei <i>Spirulina platensis</i> (71) Solicitantul: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD		
I. Condiția de unitate a invenției ☐ satisface		
II. Minimul de documente consultate: MD 1993-2009; EA 1996-2001		
III. Domeniul de documentare: biotehnologie Indicii IPC (ultima redacție): Int. Cl.: C12N 1/12 (2006.01); C12N 1/20 (2006.01) C07C 215/12 (2006.01) Termeni caracteristici, cuvinte-cheie, sinonime: <i>Spirulina platenses</i> , cultivarea, FeHEDTA, hidratul nitratului de 5-nitrosalicilidentiosemicarbazido(1-)aqua cupru(II)		
IV. Documente considerate a fi relevante		
Categoria	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Relevant față de revendicarea nr.
A	MD 163 C2 1995.02.28	1
A	MD 614 G2 1996 04.30	1
A	MD 240 C2 2003.05.31	1
A	MD 3101 G2 2006.07.31	1
A	MD 3128 G2 2006.08.31	1
A	MD 3129 G2 2006.08.31	1
A	MD 3171 G2 2006.10.31	1
A	MD 3417 G2 2007.10.31	1
A	MD 2386 C2 2003.02.28	1
A	Hemlata Tasneem Fatma. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 2009, Vol. 83, № 4, 509-515	1
Categorii de documente citate		
A - document care definește stadiul anterior în general		O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere etc.
X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care fundamentează invenția
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după această dată		D - Document menționat în descrierea cererii de brevet
Data finalizării documentării		2010.01.11
Examinatorul		Bazarenco Tatiana