



MD 1352 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1352 <sup>(13)</sup> G2  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 12 N 1/12;  
C 12 P 23/00

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: 99-0091

(22) Data depozit: 1999.03.16

(43) Data publicării hotărârii de  
acordare a brevetului pe  
răspunderea solicitantului:  
1999.11.30, BOPI nr. 11/99

(71) Solicitanți: Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD;  
Universitatea de Stat din Moldova, MD

(72) Inventatori: Rudic Valeriu, MD; Cepoi Liliana, MD; Dudnicenco Tatiana, MD

(73) Titulari: Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD;  
Universitatea de Stat din Moldova, MD

(54) Tulpină a algei verzi *Haematococcus pluvialis* Flotow utilizată ca sursă de  
astaxantin

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie și poate fi  
utilizată în industria microbiologică pentru obți-  
nerea astaxantinului.

Esența invenției constă în aceea că a fost  
obținută o tulpină nouă *Haematococcus pluvialis*  
Flotow, care poate fi utilizată ca sursă de  
astaxantin. Tulpina se păstrează în Colecția

2  
Națională de Microorganisme a Institutului de  
Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii  
Moldova sub numărul CNM-AV-05.

5  
Rezultatul invenției constă în sporirea conțin-  
tului de astaxantin în biomasa algei.

Revendicări: 1

MD 1352 G2

## MD 1352 G2

3

### Descriere:

Invenția se referă la tulpinile de microorganisme producătoare de substanțe bioactive, în special la tulpina algei verzi *Haematococcus pluvialis* Flotow, care poate fi întrebuințată în biotehnologie pentru obținerea astaxantinului.

5 Astaxantinul se utilizează ca supliment nutritiv în piscicultură la creșterea păstrăvilor, somonilor și crevetelor, ca colorant natural în industria alimentară și ca remediu bioactiv în industria farmaceutică și cosmetică, datorită proprietăților sale antioxidante, anticancerigene și imunostimulatoare.

10 La etapa actuală, astaxantinul se obține din drojdia *Phaffia rhodozyma* în cantități foarte mici constituind 0,02...0,03% din biomasa absolut uscată [1, 2, 3].

Dezavantajele acestei tulpini sunt cantitatea mică de astaxantin și cheltuielile mari pentru cultivare.

Este cunoscută tulpina *Haematococcus pluvialis* cultivată de S. Boussiba și A. Vonshak, care conține astaxantin până la 1,9% [4].

15 Dezavantajul acestei tulpini este, de asemenea, conținutul mic de astaxantin.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unei tulpini noi de *Haematococcus pluvialis*, care ar asigura o productivitate mai sporită de astaxantin și ar necesita minimum de cheltuieli pentru cultivare.

20 Problema se soluționează prin faptul că se propune o tulpină nouă de *Haematococcus pluvialis* Flotow, depozitată în Colecția Națională de microorganisme a Republicii Moldova (Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova) sub numărul CNM-AV-05 utilizată ca sursă de astaxantin.

Rezultatul invenției constă în sporirea conținutului de astaxantin în biomasa algelor.

25 Rezultatul obținut se datorește particularităților biochimice ale tulpinii, în special proceselor anabolice și catabolice, care decurg în acest organism.

Tulpina propusă a fost colectată dintr-un bazin acvatic creat artificial în zona orașului Chișinău.

30 În cultură algologic pură tulpina se multiplică intens pe mediul cunoscut mineral lichid Bristol cu următoarea componență a macroelementelor (g/l):  $\text{NaNO}_3$  - 0,25;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,25;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,15;  $\text{CaCl}_2$  - 0,05,  $\text{NaCl}$  - 0,05, și microelementelor (mg/l):  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,22;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 1,81;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,079;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 1,082;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 1,0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 9,3;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 0,02; EDTA - 10,0.

În condiții de inducere a sintezei astaxantinului pentru tulpina respectivă, se obțin 3,4% de acest pigment.

Caracterele morfo - culturale ale tulpinii:

35 *Haematococcus pluvialis* Flotow CNM-AV-05 este o algă verde monocelulară. Forma și dimensiunile celulelor variază în funcție de stadiul de dezvoltare.

40 Celulele tinere fuziforme ating dimensiunile de 28,35 - 40,50 x 20,25 - 28,35  $\mu\text{m}$ . Sunt înconjurată de o membrană netedă, îndepărtată de protoplast. Stratul intermediar dintre protoplasmă și membrana celulară (3 $\pm$ 0,2  $\mu\text{m}$ ) este de consistență gelatinoasă. Protoplastul este piriform, cu o prelungire hialină în partea anterioară de unde pleacă 2 flageli izoconți, egali cu lungimea corpului celular. Protoplasma trimite radial prelungiri, care străbat stratul intermediar și ajung până la membrană. Cromatoforul parietal în formă de cupă, foarte fin reticulat, este străbătut de protoplasma hialină. Nucleul este mare și central, iar stigma baciliformă. Vacuolele contractile sunt numeroase.

45 Pe parcursul dezvoltării, alga trece ușor în stadiul palmeloid, celulele devenind înconjurată de un strat micozitar gros (5,8 $\pm$ 0,1  $\mu\text{m}$ ). Ramificațiile membranei celulare, care străbat stratul micozitar, sunt foarte subțiri (0,17 $\pm$ 0,02  $\mu\text{m}$ ).

În stadiul de creștere staționar târziu, celulele vegetative se transformă în ciste (numite și sporangi) de culoare roșie, ce au diametrul în limitele 4,05...89,1  $\mu\text{m}$ .

50 La transferarea cistelor pe mediul nutritiv proaspăt, acestea germinează, producând 8...16 zoospori cu dimensiunile de 8,1...10,1 x 6,1...7,3  $\mu\text{m}$ . În anumite cazuri sporangii produc gameți de sex diferit. Gametangii feminini formează 2...4 oosfere de formă rotundă (20,25 $\pm$ 0,05  $\mu\text{m}$ ), iar cei masculini produc mulți (32...64) gameți elipsoidali foarte mici (sub 2,8  $\mu\text{m}$ ). La fuzionarea gameților se formează zigoți cu pereții celulari stratificați. Germinarea zigoților este similară cu cea a cistelor, în urma ei eliberându-se 16...32 zoospori biflagelați.

55 Zoosporii, celulele mobile și imobile tinere, gameții masculini și feminini au culoare verde, iar celulele mature devin treptat roșii.

## MD 1352 G2

4

În mediul nutritiv lichid celulele tinere formează pelicule fine, ușor disociabile la frontiera aer - lichid. La îmbătrânirea culturii, celulele verzi aflagelate și cistele roșii se depun la fundul vasului.

Pe mediul nutritiv agarizat se formează colonii verzi de formă rotundă, cu diametrul de 1,5...2,0 μm, cu marginea iregulată, suprafața rugoasă și profilul coloniei convex. Poziția coloniilor este deasupra mediului. Pe parcursul îmbătrânirii, coloniile capătă culoare roșie - brună.

Caractere fiziologo - biochimice:

Tulpina microalgei verzi *Haematococcus pluvialis* Flotow CNM-AV-05 crește bine pe mediul Bristol, componența căruia a fost menționată mai sus.

Temperatura optimă este de 27±1°C, pH 6,8...7,0. Intensitatea optimă a luminii este de 2500...3500 lx.

Tulpina este sensibilă la variația condițiilor de cultivare.

În condiții favorabile de existență, se caracterizează printr-o productivitate de 1,320 g/l biomasă absolut uscată. Biomasă absolut uscată de *Haematococcus pluvialis* Flotow CNM-AV-05 are următoarea compoziție (în %): proteină - 26,8; astaxantin - 0,74; clorofile sumare - 1,1.

Condițiile nefavorabile de cultivare, adică intensitatea ce depășește 3500 lx, temperatura mai mare de 29°C, concentrații sporite de clorură de sodiu (mai mari de 0,1 g/l), concentrații foarte mici de săruri de fosfor și azot etc. condiționează inducerea sintezei astaxantinului în celule până la 3,4%.

Gradul de puritate a tulpinii:

Tulpina a fost căpătată prin metoda "picăturii suspendate" în cultură algologic pură și acumulată în mediul lichid și agarizat Bristol. La cultivarea în masă poate fi infectată cu alge și cianobacterii. Contaminarea poate fi evitată prin respectarea condițiilor aseptice.

Exemplu

În vasele de cultură cu volumul de 1 l cu mediu mineral lichid cu următoarea componență a microelementelor (g/l): NaNO<sub>3</sub> - 0,25; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,25; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O - 0,15; CaCl<sub>2</sub> - 0,05; NaCl - 0,05, și microelementelor (mg/l): ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O - 0,22; MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O - 1,81; CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O - 0,079; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 1,082; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O - 1,0; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O - 9,3; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O - 0,02; EDTA - 10,0; pH 6,8...7,0, pregătit pe apă distilată, se introduce inoculum de 0,3 g/l în recalcul la biomasă absolut uscată. Cultivarea se realizează la intensitatea luminii de 3000 lx, la temperatura de 27±1°C. În a 10-a zi de cultivare, se adaugă în mediul nutritiv NaCl în concentrație de 0,8 g/l și se dublează intensitatea luminii. În ziua a 14-a productivitatea atinge 1,320 g/l biomasă absolut uscată, ce conține (%): proteină - 22,2; clorofile sumare - 0,1; β - caroten - 0,1; astaxantin - 3,4.

### (57) Revendicare:

Tulpină a algei verzi *Haematococcus pluvialis* Flotow, CNM-AV-05, utilizată ca sursă de astaxantin.

### (56) Referințe bibliografice:

- Schroeder W., Calo P., Clerc M. De, Johnoson E. Selection for carotenogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma* by dark - generated singlet oxygen. *Microbiology*, 1996, v. 142, p. 2923-2929
- Подопригора О.І., Дацюк Н.М., Борсукевич Б.М., Третяк О.І. Синтез каротиноїдних пігментів дріжджами *Phaffia rhodozyma* на нетрадиційних джерелах живлення. *Мікробіол. ж.*, 1996, т. 58, с. 44-48
- Подопригора О.І., Популях О.В., Дацюк Н.М., Борсукевич Б.М., Клим І.Р., Третяк О.І. Одержання високопродуктивних штамів дріжджів *Phaffia rhodozyma* - продуцент каротиноїдів. *Мікробіологія*, 1996, т. 58, с. 19-24
- Bousset S. and Wonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.*, 1991, v. 32, p. 1077-1082

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

CANȚER Svetlana