



REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1723 (13) F1
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/12

(12) BREVET DE INVENȚIE

| | |
|--|---|
| Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării | |
| (21) Nr. depozit: 99-0265 (22) Data depozit: 1999.11.23 | (43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 2001.08.31, BOPI nr. 8/2001 |
| (71) Solicitant: Universitatea de Stat din Moldova, MD (72) Inventatori: Rudic Valeriu, MD; Dudnicenco Tatiana, MD (73) Titular: Universitatea de Stat din Moldova, MD | |

(54) Mediu de cultură pentru alga verde *Haematococcus pluvialis*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologia microbiologică, în special la mediile nutritive pentru cultivarea algei verzi *Haematococcus pluvialis*, utilizată ca sursă de o gamă largă de carotenoizi, în special de β-caroten și astaxantin.

Esența invenției constă în aceea că se propune un mediu nutritiv pentru cultivarea algei verzi *Haematococcus pluvialis*, care conține NaNO₃, KH₂PO₄, NaCl, CaCl₂, MgSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, H₃BO₃, FeCl₃·6H₂O, Co(NO₃)₂·H₂O, EDTA, apă distilată și surse de cationi Mo⁶⁺ și Mn²⁺. Suplimentar mediul conține K₂HPO₄, în calitate de surse de cationi Mo⁶⁺ și Mn²⁺ se adaugă (NH₄)₆Mo₂₄·4H₂O și MnSO₄·H₂O, respectiv, în următorul raport al componentelor, în mg/L:

| | |
|---------------------------------|-------------|
| NaNO ₃ | 299...301 |
| KH ₂ PO ₄ | 19,9...20,1 |
| K ₂ HPO ₄ | 79,9...80,1 |

| | | |
|----|---|---------------|
| | 2 | |
| | NaCl | 19,9...20,1 |
| | CaCl ₂ | 46,9...47,1 |
| 5 | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 9,9...10,1 |
| | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,099...0,11 |
| | MnSO ₄ ·H ₂ O | 1,49...1,51 |
| | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,079...0,081 |
| | H ₃ BO ₃ | 0,29...0,31 |
| 10 | (NH ₄) ₆ Mo ₂₄ ·4H ₂ O | 0,29...0,31 |
| | FeCl ₃ ·6H ₂ O | 16,9...17,1 |
| | Co(NO ₃) ₂ ·H ₂ O | 0,19...0,21 |
| | EDTA | 7,4...7,6 |
| | apă distilată | până la 1 L. |
| 15 | Rezultatul invenției constă în asigurarea nivelului înalt al sintezei carotenoizilor. | |
| | Revendicări: 1 | |

MD 1723 F1

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologia microbiologică, în special la mediile de cultură pentru cultivarea algei verzi *Haematococcus pluvialis* - sursă de o gamă largă de carotenoizi, în special de β -caroten și astaxantin.

În prezent β -carotenu și astaxantinul sunt carotenoizii de bază, utilizați în calitate de coloranți naturali în industria alimentară și ca remediu bioactiv în industria farmaceutică și cosmetică, datorită proprietăților sale antioxidante, anticancerogene și imunostimulatoare. De asemenea, se utilizează ca supliment nutritiv în acvacultură, gospodăria avicolă și zootehnie [1, 2, 3].

Se cunoaște mediul de cultură pentru alga *Haematococcus pluvialis*, Gromov 6, care conține, în mg/L: KNO_3 - 1000; K_2HPO_4 - 200; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 200; CaCl_2 - 150; NaHCO_3 - 200; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,079; $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 2,63; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 9,3; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,02; EDTA - 3; apă distilată - până la 1 L. [4].

Neajunsul acestui mediu constă în nivelul scăzut al productivității algei (0,5-0,7 g/L biomasă absolut uscată (BAU)) și un conținut scăzut de carotenoizi sumari (3,504 \pm 0,113% din BAU).

Cel mai apropiat după compoziție și rezultatul obținut este mediul nutritiv Bristol [5], cu următoarea componență (mg/L):

| | |
|---|-------------|
| NaNO_3 | 250 |
| KH_2PO_4 | 250 |
| NaCl | 50 |
| CaCl_2 | 50 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 150 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,22 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1,81 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,08 |
| MoO_3 | 0,015 |
| H_3BO_3 | 2,86 |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 6,0 |
| $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0,044 |
| EDTA | 1 |
| apă distilată | până la 1L. |

Neajunsul acestui mediu constă în lipsa unor cantități echilibrate ale componentelor mediului nutritiv și productivitate scăzută (0,975 \pm 0,051 g/L BAU în a 7-a zi de cultivare).

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în propunerea unui mediu nutritiv nou, cu o componență mai echilibrată de constituente chimice, ce asigură o productivitate a algei mai sporită, cu un conținut mai ridicat de carotenoizi sumari.

Esența invenției constă în aceea că se propune un mediu nou pentru cultivarea algei verzi *Haematococcus pluvialis*, care conține: NaNO_3 ; KH_2PO_4 ; NaCl ; CaCl_2 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; MoO_3 ; H_3BO_3 ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; EDTA, unde în calitate de sursă de cationi Mo^{6+} se adaugă $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, iar în calitate de sursă de cationi Mn^{2+} se adaugă $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ și suplimentar mediul conține K_2HPO_4 în următorul raport cantitativ al elementelor, mg/L:

| | |
|---|---------------|
| NaNO_3 | 299...302 |
| KH_2PO_4 | 19,9...20,1 |
| K_2HPO_4 | 79,9...80,1 |
| NaCl | 19,9...20,1 |
| CaCl_2 | 46,9...47,1 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 9,9...10,1 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,099...0,11 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 1,49...1,51 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,079...0,081 |
| H_3BO_3 | 0,29...0,31 |
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,29...0,31 |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 16,9...17,1 |
| $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0,19...0,21 |
| EDTA | 7,4...7,6 |
| apă distilată | până la 1 L |

MD 1723 F1

4

Rezultatul invenției constă în faptul că mediul propus asigură un nivel înalt al productivității culturii de algă - cu 129% față de soluția cea mai apropiată. Cultura de algă crescută pe mediul dat sintetizează cu 2.197% mai mulți carotenoizi sumari în comparație cu soluția cea mai apropiată.

Rezultatul invenției este condiționat de faptul că în mediul nutritiv propus raportul dintre cationii și anionii sărurilor minerale constituente este echilibrat atât cantitativ, cât și calitativ, asigurând optim necesitatea algei *Haematococcus pluvialis* în ele.

Exemplu de realizare a invenției

În baloane cotate se pregătesc mediile nutritive minerale Bristol (soluția cea mai apropiată), cu următoarea componență (mg/L): NaNO_3 - 250; KH_2PO_4 - 250; NaCl - 50; CaCl_2 - 50; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 150; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,22; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,08; MoO_3 - 0,015; H_3BO_3 - 2,86; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 6,0; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,044; EDTA - 1; apă distilată - până la 1 L; și mediul propus în invenție, cu următoarea componență (mg/L): NaNO_3 - 300; KH_2PO_4 - 20; K_2HPO_4 - 80; NaCl - 20; CaCl_2 - 47; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 10; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 1,5; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,08; H_3BO_3 - 0,3; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 17,0; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,2; EDTA - 7,5; apă distilată - până la 1 L. În 5 vase se toarnă câte 0,5 L de mediu nutritiv Bristol, iar în celelalte 5 vase se toarnă câte 0,5 L de mediu nutritiv propus. Se introduce inoculat de algă ce constituie 0,3 g/L calculate față de BAU. Cultivarea se realizează în aceleași condiții, adică la intensitatea luminii 1500 lucși/m^2 , temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$, pH - 6,8-7,0.

În cazul mediului nutritiv Bristol, productivitatea în ziua a 7-a de cultivare a algei *Haematococcus pluvialis* atinge la $0,975 \pm 0,051 \text{ g/L}$ BAU ce conține (în %): proteină - $26,954 \pm 0,023$, clorofile sumare - $1,124 \pm 0,011$, carotenoizi sumari - $4,907 \pm 0,013$.

În cazul utilizării mediului nutritiv propus, productivitatea algei studiate în ziua a 7-a de cultivare ajunge la $2,234 \text{ g/L}$ BAU, ce conține (în %): proteină - $27,235 \pm 0,009$, clorofile sumare - $1,103 \pm 0,020$, carotenoizi sumari - $7,824 \pm 0,023$.

MD 1723 F1

5

(57) Revendicare:

Mediu nutritiv pentru cultivarea algei verzi *Haematococcus pluvialis*, care conține NaNO₃, KH₂PO₄, NaCl, CaCl₂, MgSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, H₃BO₃, FeCl₃·6H₂O, Co(NO₃)₂·H₂O, EDTA, apă distilată și surse de cationi Mo⁶⁺ și Mn²⁺, caracterizat prin aceea că suplimentar mediul conține K₂HPO₄, iar în calitate de surse de cationi Mo⁶⁺ și Mn²⁺ se adaugă (NH₄)₆Mo₂₄·4H₂O și MnSO₄·H₂O în următorul raport al componentelor, în mg/L:

| | |
|---|---------------|
| NaNO ₃ | 299...301 |
| KH ₂ PO ₄ | 19,9...20,1 |
| K ₂ HPO ₄ | 79,9...80,1 |
| NaCl | 19,9...20,1 |
| CaCl ₂ | 46,9...47,1 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 9,9...10,1 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,099...0,11 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 1,49...1,51 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,079...0,081 |
| H ₃ BO ₃ | 0,29...0,31 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₂₄ ·4H ₂ O | 0,29...0,31 |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 16,9...17,1 |
| Co(NO ₃) ₂ ·H ₂ O | 0,19...0,21 |
| EDTA | 7,4...7,6 |
| apă distilată | până la 1 L. |

(56) Referințe bibliografice:

1. Bussiba S. and Vonshak A. Astaxantin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* // Plant Cell Physiol, 1991, v. 32, p. 1077-1082
2. Neamțu G., Cîmpeanu G., Enache A. Dicționar de biochimie vegetală, București: Ceres, 1989, 302 p.
3. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău: Știința, 1989, 140 p.
4. Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР //, под ред. Семеновко В.Е. Москва: ИФР РАН, 1991, с. 123
5. Майар П., Трики А., Салазар-Гонзалес, Годэ К. Биосинтез каротиноидов и образование этилена в течение фотопериода у *Haematococcus pluvialis* в закрытом трубчатом реакторе, Физиология растений, 1994, т. 41, с. 209-213

Șef Secție: CRASNOVA Nadejda

Examinator: BAZARENCO Tatiana

Redactor: ANDRIUȚĂ Victoria