



MD 1723 G2 2001.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1723<sup>(13)</sup> G2  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 12 N 1/12

(12) BREVET DE INVENȚIE

(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 micro-biologică, 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 NaNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, EDTA, apă distilată și surse de cationi Mo<sup>6+</sup> și Mn<sup>2+</sup>. Suplimentar mediul conține K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, în calitate de surse de cationi Mo<sup>6+</sup> și Mn<sup>2+</sup> se adaugă (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O și MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, respectiv, în următorul raport al componentelor, în mg/L:

NaNO <sub>3</sub>	299...301
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	19,9...20,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	79,9...80,1

2	NaCl	19,9...20,1
	CaCl <sub>2</sub>	46,9...47,1
5	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	9,9...10,1
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,099...0,11
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,49...1,51
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,079...0,081
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,29...0,31
10	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,29...0,31
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	16,9...17,1
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> 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 G2 2001.08.31

# MD 1723 G2

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  $\beta$ -caroten și astaxantin.

În prezent  $\beta$ -carotenul 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:  $\text{KNO}_3$  - 1000;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 200;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 200;  $\text{CaCl}_2$  - 150;  $\text{NaHCO}_3$  - 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):

$\text{NaNO}_3$	250
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250
$\text{NaCl}$	50
$\text{CaCl}_2$	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
$\text{MoO}_3$	0,015
$\text{H}_3\text{BO}_3$	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:  $\text{NaNO}_3$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{NaCl}$ ;  $\text{CaCl}_2$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MoO}_3$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; EDTA, unde în calitate de sursă de cationi  $\text{Mo}^{6+}$  se adaugă  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , iar în calitate de sursă de cationi  $\text{Mn}^{2+}$  se adaugă  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  și suplimentar mediul conține  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  în următorul raport cantitativ al elementelor, mg/L:

$\text{NaNO}_3$	299...302
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	19,9...20,1
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	79,9...80,1
$\text{NaCl}$	19,9...20,1
$\text{CaCl}_2$	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
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,29...0,31
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	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 G2

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* in ele.

### Exemplu de realizare a invenției

În baloane cotate se pregătesc mediile nutritive minerale Bristol (soluția cea mai apropiată), cu următoarea componență (mg/L):  $\text{NaNO}_3$  - 250;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 250;  $\text{NaCl}$  - 50;  $\text{CaCl}_2$  - 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;  $\text{MoO}_3$  - 0,015;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 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):  $\text{NaNO}_3$  - 300;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 20;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 80;  $\text{NaCl}$  - 20;  $\text{CaCl}_2$  - 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;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 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  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ , 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 G2

5

## (57) Revendicare:

Mediu nutritiv pentru cultivarea algei verzi *Haematococcus pluvialis*, care conține  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EDTA, apă distilată și surse de cationi  $\text{Mo}^{6+}$  și  $\text{Mn}^{2+}$ , caracterizat prin aceea că suplimentar mediul conține  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , iar în calitate de surse de cationi  $\text{Mo}^{6+}$  și  $\text{Mn}^{2+}$  se adaugă  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  și  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  în următorul raport al componentelor, în mg/L:

$\text{NaNO}_3$	299...301
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	19,9...20,1
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	79,9...80,1
$\text{NaCl}$	19,9...20,1
$\text{CaCl}_2$	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
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,29...0,31
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	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.

## (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. Семененко В.Е. Москва: ИФР РАН, 1991, с. 123
5. Майяр 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