



## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1946 (13) F1  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 12 N 1/12

## (12) BREVET DE INVENȚIE

<b>Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării</b>	
(21) Nr. depozit: a 2001 0028 (22) Data depozit: 2001.01.31	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2002.06.30, BOPI nr. 6/2002
(71) Solicitant: INSTITUTUL de MICROBIOLOGIE al ACADEMIEI DE ȘTIINȚE a REPUBLICII MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA de STAT din MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; DUDNICENCO Tatiana, MD; DRAGALIN Ion, MD; VLAD Pavel, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL de MICROBIOLOGIE al ACADEMIEI de ȘTIINȚE a REPUBLICII MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA de STAT din MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de obținere a biomasei algei verzi *Haematococcus pluvialis*

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologia microbiologică, în special la procedeele de obținere a biomasei algei verzi *Haematococcus pluvialis*, utilizate ca sursă de carotenoide.

Esența invenției constă în aceea că procedeul propus include cultivarea algei verzi *Haematococcus pluvialis* timp de 7 zile pe mediu nutritiv care conține, în mg:

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
NaCl	19,9...20,1
CaCl <sub>2</sub>	46,9...47,1
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

	2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <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
5 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.

10 Intensitatea iluminării constituie 1500 lx, pH - 6,8...7,2 și temperatura - 25...27°C. Inoculatul se adaugă în mediu în cantitate de 0,3 g/L. În a doua zi de cultivare în acest mediu se adaugă compusul organic tetranorditerpenă 9-episcclareolidă în cantitate de 0,025...0,075 g/L.

15 Rezultatul invenției constă în sporirea productivității biomasei algei și sintezei carotenoidelor.

Revendicări: 1

# MD 1946 F1 2002.06.30

3

## Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la microbiologie, și poate fi utilizată pentru obținerea carotenoidelor.

5 În condiții favorabile de dezvoltare alga respectivă conține în componența sa carotenoida  $\beta$ -caroten, iar în condiții nefavorabile de dezvoltare  $\beta$ -carotenul se transformă în astaxantină.

Actualmente  $\beta$ -carotenul și astaxantina au o întrebuințare largă în industria alimentară, microbiologică, farmaceutică și cosmetică. Pe lângă acestea, ele se folosesc ca supliment nutritiv la creșterea animalelor [1].

10 Cel mai apropiat după esență și rezultatul obținut este procedeul de obținere a biomasei algei verzi *H. pluvialis* pe mediul nutritiv cu următoarea componență, mg/L:  $\text{NaNO}_3$  - 299...300;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 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;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 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; inoculatul de algă constituie 0,3 g/L în recalcul la biomasa absolut uscată. Cultivarea se realizează la intensitatea iluminării de 1500 lx, temperatura de 24...27°C, pH 15 6,8...7,0 [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că condițiile de cultivare menționate ale algei *H. pluvialis* nu asigură o productivitate înaltă și în conținut sporit de  $\beta$ -caroten în componența ei, adică biomasa absolut uscată constituie 2,7 $\pm$ 0,1 g/L, iar conținutul brut final de  $\beta$ -caroten - 70,3 $\pm$ 0,9 mg/L.

20 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu nou de obținere a biomasei algei *Haematococcus pluvialis*, ce ar asigura un nivel înalt al productivității și ar garanta sporirea conținutului brut final de  $\beta$ -caroten în biomasă.

25 Esența invenției constă în aceea că se propune un procedeu de obținere a biomasei algei verzi *Haematococcus pluvialis* care include: pregătirea mediului nutritiv pe bază de apă distilată cu următoarea componență, mg/L:  $\text{NaNO}_3$  - 299...300;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 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;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 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. Inoculatul de algă constituie 0,3 g/L în recalcul la biomasa absolut uscată. Cultivarea se realizează la intensitatea iluminării de 1500 lx, temperatura de 24...26°C, pH 6,8...7,0, unde suplimentar la mediul nutritiv în a doua zi de cultivare se adaugă compusul tetranorditerpenic 9-episclareolidă ( $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2$ ) în cantitate de 0,025...0,075 g/L.

30 Rezultatul invenției constă în faptul că procedeul propus asigură o productivitate sporită a *H. pluvialis* - 3,3 $\pm$ 0,2 g/L biomasă absolut uscată față de cea mai apropiată soluție - 2,7 $\pm$ 0,1 g/L, și un conținut brut final sintetizat de  $\beta$ -caroten - 86,1 $\pm$ 2,0 mg/L față de 70,0 $\pm$ 0,9 mg/L (soluția cea mai apropiată).

35 Rezultatul invenției este condiționat de prezența tetranorditerpenic 9-episclareolidei în mediul nutritiv la cultivarea algei *H. pluvialis*. Terpenoida respectivă este inclusă ușor în metabolismul algei datorită structurii sale chimice și a echipamentului enzimatic constituent al algei. Proprietățile și procedeul de obținere a compusului tetranorditerpenic 9-episclareolidă sunt descrise în Dragalin I., Dragalin A., Vlad P. Regruparea norambreinolidei catalizate cu sulfocationit în xilen// Analele științifice ale USM, seria "Științe chimico-biologice". Chișinău, 2001, p. 230-231, unde se menționează că din produsul reacției a fost separată 40  $\gamma$ -lactona, p. t. 132,5-133,5°C cu un randament de 21%, identificată ca 9-episclareolidă.

### Exemplu de realizare a invenției

45 Se iau 5 vase cu volumul de 1 L, în care se toarnă câte 0,5 L mediu nutritiv pregătit pe bază de apă distilată cu următoarea componență în mg/L:  $\text{NaNO}_3$  - 300;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 20;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 80;  $\text{NaCl}$  - 20,  $\text{CaCl}_2$  - 47,4;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 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;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 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. Inoculatul de algă cantitatea căruia constituie 0,3 g/L în recalcul la biomasa absolut uscată se introduce în mediul proaspăt pregătit. Cultivarea algelor se realizează la intensitatea iluminării de 1500 lx; temperatura de 24...26°C, pH 6,8...7,0, timp de 7 zile, iar suplimentar la mediul nutritiv, în a doua zi de cultivare, se 50 adaugă compusul tetranorditerpenic 9-episclareolidă în cantitate de 0,05 g/L.

La a 7-a zi de cultivare se determină cantitatea biomasei de algă (în g/L) utilizând metoda fotocolorimetrică. După aceasta biomasa algei se aduce la concentrația de 10 mg/ml (reieșind din calculul la volumul necesar), prin centrifugare și aducere la volumul respectiv cu apă distilată, apoi se supune 55 analizelor biochimice necesare. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul de mai jos.

# MD 1946 F1 2002.06.30

4

Tabel

5

Productivitatea algei *H. pluvialis*

Nr.	Procedeu de cultivare	Biomasa absolut uscată inițială (g/L)	Biomasa absolut uscată finală (g/L)	Conținutul brut final de $\beta$ -caroten (mg/L)
1.	Procedeu conform soluției celei mai apropiate	0,3	2,7 $\pm$ 0,1	70,0 $\pm$ 0,9
2.	Procedeu propus în invenție	0,3	3,3 $\pm$ 0,2	86,1 $\pm$ 2,0

Datele în tabel demonstrează eficacitatea utilizării procedurii propus în scopul obținerii unei productivități înalte a algei *H. pluvialis* și a unui conținut sporit de  $\beta$ -caroten în biomasă, respectiv 3,3 $\pm$ 0,2 g/L biomasă absolut uscată și 86,1 $\pm$ 2,0 mg/L conținut brut final de  $\beta$ -caroten.

10

## (57) Revendicare:

Procedeu de obținere a biomasei algei verzi *Haematococcus pluvialis*, care include cultivarea algei pe mediu nutritiv ce conține, în mg:

15

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
NaCl	19,9...20,1
20 CaCl <sub>2</sub>	46,9...47,1
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
25 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
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <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
30 apă distilată	până la 1 L,

timp de 7 zile, cu intensitatea iluminării de 1500 lx, pH 6,8...7,2, temperatura de 25...27°C și adăugarea inoculatului în cantitate de 0,3 g/L, **caracterizat prin aceea că** în a doua zi de cultivare în mediu se adaugă tetranorditerpenic 9-episclareolidă în cantitate de 0,025...0,075 g/L.

35

## (56) Referințe bibliografice:

1. Boussiba S. and Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*//Plant Cell Physiol., 1991, v. 32, p. 1077-1082
2. MD 736 G2
3. MD 1723 F1

Șef Secție:

CRASNOVA Nadejda

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

ANDRIUȚĂ Victoria