



MD 4598 B1 2018.10.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4598** (13) **B1**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/12* (2006.01)  
*A01G 33/00* (2006.01)  
*C12R 1/89* (2006.01)  
*C01G 5/00* (2006.01)  
*B82Y 5/00* (2011.01)

### (12) BREVET DE INVENȚIE

<b>In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului</b>	
(21) Nr. depozit: a 2018 0039 (22) Data depozit: 2018.05.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.10.31, BOPI nr. 10/2018
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; RUDI Liudmila, MD; MAFTEI Elena, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; CEPOI Liliana, MD; MISCU Vera, MD; CODREANU Svetlana, MD; DUMBRĂVEANU Veronica, MD; ZINICOVSCAIA Inga, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD	

#### (54) Procedeu de cultivare a microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01

##### (57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01.

Procedeul de cultivare a microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 prevede cultivarea acesteia pe un mediu nutritiv mineral ce conține, g/L: NaCl - 120,0, NaHCO<sub>3</sub> - 4,2, MgSO<sub>4</sub> - 0,6, KNO<sub>3</sub> - 0,5, FeCl<sub>3</sub> - 0,0002, CaCl<sub>2</sub> - 0,033, KHPO<sub>4</sub> - 0,0272, EDTA - 0,0087, nanoparticule de argint cu dimensiunea de 5 nm -

2  
0,0005...0,00055, la temperatura de 25...28°C, pH-ul 8,0 și iluminarea de 3000...4000 lx în regim continuu, în decurs de 8 zile.

Rezultatul invenției constă în majorarea producerii de biomasă de *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 și a conținutului de lipide în biomasă cu scopul obținerii materiei prime pentru elaborarea și fabricarea remediilor liposolubile.

Revendicări: 1

MD 4598 B1 2018.10.31

**(54) Process for cultivation of microalga *Dunaliella salina* CNMN-AV-01****(57) Abstract:**

1  
The invention relates to biotechnology, in particular to a process for cultivation of microalga *Dunaliella salina* CNMN-AV-01.

The process for cultivation of microalga *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 comprises its cultivation on a mineral nutrient medium containing, g/L: NaCl - 120.0, NaHCO<sub>3</sub> - 4.2, MgSO<sub>4</sub> - 0.6, KNO<sub>3</sub> - 0.5, FeCl<sub>3</sub> - 0.0002, CaCl<sub>2</sub> - 0.033, KHPO<sub>4</sub> - 0.0272, EDTA - 0.0087, silver nanoparticles with a size of 5 nm - 0.0005...0.00055, at a temperature of

2  
25...28°C, pH 8.0 and constant illumination of 3000...4000 lx, for 8 days.

The result of the invention consists in increasing the yield of biomass of *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 and the content of lipids in biomass in order to obtain raw material for the development and production of liposoluble remedies.

Claims: 1

**(54) Способ выращивания микроводоросли *Dunaliella salina* CNMN-AV-01****(57) Реферат:**

1  
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу культивирования микроводоросли *Dunaliella salina* CNMN-AV-01.

Способ культивирования микроводоросли *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 включает ее культивирование на минеральной питательной среде содержащей, г/л: NaCl - 120,0, NaHCO<sub>3</sub> - 4,2, MgSO<sub>4</sub> - 0,6, KNO<sub>3</sub> - 0,5, FeCl<sub>3</sub> - 0,0002, CaCl<sub>2</sub> - 0,033, KHPO<sub>4</sub> - 0,0272, EDTA - 0,0087, наночастицы серебра

2  
размером 5 нм - 0,0005...0,00055, при температуре 25...28°C, pH 8,0 и постоянном освещении в 3000...4000 люкс, в течение 8 дней.

Результат состоит в увеличении выхода биомассы *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 и содержания липидов в биомассе с целью получения сырья для разработки и производства липорастворимых средств.

П. формулы: 1

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01.

5 Nanotehnologiile au migrat rapid din domeniul tehnic în medicină, dar și în biotehnologie, creând un nou domeniu științifico-practic - bionanotehnologia. A fost extinsă aria aplicării nanoparticulelor. A fost demonstrat efectul pozitiv al nanoparticulelor asupra creșterii și a metabolismului celular. Dimensiunile mici ale nanoparticulelor favorizează interacțiunea lor cu suprafața celulară și pătrunderea în citosol. Nanoparticulele pot fi o sursă alternativă favorabilă  
10 oligoelementelor care au funcția de stimulatori ai activității biosintetice. Efectul stimulator al nanoparticulelor de argint a fost demonstrat în cazul cianobacteriei *Spirulina platensis*. Procedeu propus corespunde direcției de utilizare a nanoparticulelor în domeniul biotehnologiei.

Este cunoscut procedeu de cultivare a microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 pe medii mineral nutritiv Ben-Amotz ce conține NaCl 120,0 g/L. Mediul mineral este suplimentat cu 1,0 mg/L alanin de Fe(III) și 1,0 mg/L clorură de zinc. Durata cultivării este de 10 zile. Pe durata cultivării, la a 6-a zi, mediul mineral este suplimentat cu NaCl 120,0 g/L în scopul inducerii șocului osmotic. Conform procedurii, valoarea absolută a lipidelor obținute este de 165 mg/L [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în manipulări suplimentare de inducere a stresului salin pe durata cultivării și, ca urmare, creșterea duratei ciclului de desalinizare a biomasei după  
20 colectarea microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu eficient și reproductibil de sporire a producerii de biomasă și a conținutului de lipide în biomasa microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01.

Esența invenției constă în aceea că se propune un procedeu de cultivare a microalgei  
25 *Dunaliella salina* CNMN-AV-01, care prevede cultivarea acesteia pe un mediu nutritiv mineral ce conține, g/L: NaCl - 120,0, NaHCO<sub>3</sub> - 4,2, MgSO<sub>4</sub> - 0,6, KNO<sub>3</sub> - 0,5, FeCl<sub>3</sub> - 0,0002, CaCl<sub>2</sub> - 0,033, KHPO<sub>4</sub> - 0,0272, EDTA - 0,0087, nanoparticule de argint cu dimensiunea de 5 nm - 0,0005...0,00055, la temperatura de 25...28°C, pH-ul 8,0 și iluminarea de 3000...4000 lx în regim continuu, în decurs de 8 zile.

30 Nanoparticulele de Ag sunt produse industrial, dimensiunile anunțate fiind de 5 nm.

Rezultatul invenției constă în asigurarea unei majorări a conținutului de lipide în biomasă, valoarea absolută a lipidelor fiind de 175...182 mg/L.

Rezultatul obținut este condiționat de efectul nanoparticulelor de Ag, care datorită dimensiunilor mici (5 nm) pătrund rapid în celule și stimulează reproducerea celulară, drept  
35 urmare durata ciclului de cultivare se reduce de la 10 zile (conform celui mai apropiat procedeu) la 8 zile. Contactul nanoparticulelor cu membrana celulară induce stimularea producerii lipidelor. Totodată, în biomasa microalgală nu se diminuează conținutul de β-caroten.

## Exemple de realizare a invenției

## 40 Exemplul 1

Se prepară mediul mineral nutritiv Ben-Amotz ce conține, g/L: NaCl - 120,0; NaHCO<sub>3</sub> - 4,2, MgSO<sub>4</sub> - 0,6, KNO<sub>3</sub> - 0,5, FeCl<sub>3</sub> - 0,0002, CaCl<sub>2</sub> - 0,033, KHPO<sub>4</sub> - 0,0272, EDTA - 0,0087. La mediul preparat se adaugă nanoparticule de Ag cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0,0005 g/L. Cultura start este suspensia de *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 în cantitate de 0,2 g/L.  
45 Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer cu volumul de 500 ml și volumul de lucru de 300 ml la temperatura de 25°C, pH-ul 8,0 și iluminarea de 3000...4000 lx în regim continuu.

La ziua a 8-a se colectează biomasa microalgală și se determină conținutul de lipide. Valoarea absolută a lipidelor este de 175±2,5 mg/L.

## 50 Exemplul 2

Se prepară mediul mineral nutritiv Ben-Amotz ce conține, g/L: NaCl - 120,0, NaHCO<sub>3</sub> - 4,2, MgSO<sub>4</sub> - 0,6, KNO<sub>3</sub> - 0,5, FeCl<sub>3</sub> - 0,0002, CaCl<sub>2</sub> - 0,033, KHPO<sub>4</sub> - 0,0272, EDTA - 0,0087. La mediul preparat se adaugă nanoparticule de Ag cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0,00055 g/L. Cultura start este suspensia de *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 în cantitate de 0,2 g/L.  
55 Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer cu volumul de 500 ml și volumul de lucru de 300 ml la temperatura de 25°C, pH-ul 8,0 și iluminarea de 3000...4000 lx în regim continuu.

La ziua a 8-a se colectează biomasa microalgală și se determină conținutul de lipide. Valoarea absolută a lipidelor este de 182±1,4 mg/L (vezi tabelul de mai jos).

Conținutul de lipide în biomasa microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 la cultivare conform procedurii propus în invenție și celei mai apropiate soluții

5

Procedura utilizată	Compusul (nanoparticule), concentrația g/L	Durata ciclului de cultivare, zile	Valoarea absolută a lipidelor mg/L
Conform celei mai apropiate soluții	NaCl – 120,0 [Fe(ala)] – 0,001 ZnCl <sub>2</sub> – 0,001	10	165,0
Conform soluției revendicate	AgNP - 0,0005	8	175,0±2,5
	AgNP - 0,00055	8	182,0±1,4

Astfel, datele din tabel confirmă conținutul sporit de lipide în biomasa microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01, în condițiile ciclului de cultivare redus la 8 zile și salinitatea mediului de cultivare de NaCl 120 g/L în procedura propus în invenție față de procedura cel mai apropiat.

**(56) Referințe bibliografice citate în descriere:**

1. Iulia Iațco. Model de diminuare a consecințelor stresului hipersalin la *Dunaliella salina*. Akademos, 2011, nr. 4 (23), p. 68-73

**(57) Revendicări:**

Procedura de cultivare a microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01, care prevede cultivarea acesteia pe un mediu nutritiv mineral ce conține, g/L: NaCl - 120,0, NaHCO<sub>3</sub> - 4,2, MgSO<sub>4</sub> - 0,6, KNO<sub>3</sub> - 0,5, FeCl<sub>3</sub> - 0,0002, CaCl<sub>2</sub> - 0,033, KHPO<sub>4</sub> - 0,0272, EDTA - 0,0087, nanoparticule de argint cu dimensiunea de 5 nm - 0,0005...0,00055, la temperatura de 25...28°C, pH-ul 8,0 și iluminarea de 3000...4000 lx în regim continuu, în decurs de 8 zile.