



MD 1866 F1 2002.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1866 (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: a 2000 0154 (22) Data depozit: 2000.09.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2002.02.28, BOPI nr. 2/2002
(71) Solicitanți: 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	
(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de cultivare a algei verzi *Haematococcus pluvialis* (Flotow)

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la microbiologie și poate fi utilizată pentru obținerea carotenoidelor.

Esența invenției constă în aceea că procedeul propus de cultivare a algei verzi *Haematococcus pluvialis* (Flotow) include inocularea aplanosporilor verzi în vârstă de 2 săptămâni din momentul transformării lor din celule verzi flagelate în aplanospori verzi pe mediu nutritiv mineral, care conține (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

2	MnSO ₄ · H ₂ O	1,49...1,51
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,079...0,081
5	H ₃ BO ₃	0,29...0,31
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O 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.

10 Alga se cultivă pe mediul nutritiv dat timp de 7 zile, intensitatea iluminării fiind de 1500...2000 lx, pH de 6,8...7,2 și temperatura de 25...27°C.

Rezultatul invenției constă în reducerea timpului de cultivare a algei și în sporirea productivității carotenoidelor.

15 Revendicări: 1

MD 1866 F1 2002.02.28

MD 1866 F1 2002.02.28

3

Descriere:

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

5 *Haematococcus pluvialis* Flotow posedă 3 tipuri de celule în ciclul său de dezvoltare: flagelate mobile verzi, aflagelate imobile verzi (aplanospori sau ciști verzi) și aflagelate imobile roșii (aplanospori sau ciști roșii). În componența celulelor verzi flagelate și aflagelate predomină β -carotenul, iar în celulele aflagelate roșii predomină astaxantinul.

10 Actualmente β -carotenul și astaxantinul au o întrebuințare largă în industria alimentară, microbiologică, farmaceutică și cosmetică. Pe lângă aceasta, se folosesc ca supliment nutritiv la creșterea animalelor [1].

Se cunoaște procedeul de cultivare a algei *H. pluvialis* Flotow (sinonim - *H. lacustris* (Girod)), unde în calitate de inocul se iau aplanospori roșii în vârstă mai mare de 3 luni [2].

15 Dezavantajul acestui procedeu constă în timpul îndelungat al atingerii fazei de dezvoltare staționare – 3 săptămâni, cât și a conținutului scăzut de carotenoizi. Timpul îndelungat de cultivare necesită cheltuieli suplimentare de energie, deci crește și prețul de cost al biomasei.

20 Cel mai apropiat după rezultatul obținut este procedeul ce include: pregătirea mediului descris de Hedlich, la care se adaugă tiamin în cantitate de 0,3 μ M pentru cultivarea algei studiate, determinarea cantității necesare de aplanospori verzi, inocularea acestor aplanospori verzi în mediul nutritiv, cultivarea algei în condiții favorabile și constante: intensitatea iluminării - 1500 lx, temperatură – $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Aplanosporii verzi se iau în vârstă de 3 luni din momentul transformării lor în aplanospori din celule verzi flagelate. După 5 zile de menținere în condiții favorabile de cultivare, cultura algală ce constă din celule flagelate germinate, atinge faza logaritmică de dezvoltare. Cultura se transferă apoi în mediu de nutriție cu o insuficiență de azot și în condiții de iluminare majorată. Alga se cultivă în aceste condiții nefavorabile timp de 7 zile pentru ca celulele verzi (mobile flagelate verzi și aplanosporii verzi) să se transforme în aplanospori roșii, astfel durata totală de cultivare a algei constituind 12 zile [3].

25 Dezavantajul acestui procedeu constă în durata lungă de atingere a fazei staționare - timp de aproximativ 2 săptămâni și a productivității scăzute de carotenoizi în biomasă.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în asigurarea reducerii timpului de cultivare a algei *Haematococcus pluvialis* Flotow și asigurarea productivității sporite de carotenoizi în biomasă.

30 Esența invenției constă în aceea că se propune un procedeu de cultivare a algei *Haematococcus pluvialis* Flotow, care include: inocularea aplanosporilor verzi ai algei *H. pluvialis* în mediu nutritiv mineral, unde inocularea aplanosporilor și cultivarea algei se efectuează pe mediul nutritiv mineral, care conține (în mg/L): NaNO_3 299...301; 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 timp de 7 zile, la intensitatea iluminării de 1500...2000 lx, pH 6,8...7,2 și temperatură de $25 \dots 27^\circ\text{C}$. Pentru inoculare se iau aplanospori verzi în vârstă de 2 săptămâni din momentul transformării lor în aplanospori din celule verzi flagelate.

40 Rezultatul invenției constă în asigurarea reducerii timpului de cultivare de la 12 până la 7 zile și a unei productivități sporite de carotenoizi – $30,1 \pm 0,3$ mg/L carotenoizi sumari sintetizați pe zi, față de procedeul cel mai apropiat - $14,2 \pm 0,6$ mg/L carotenoizi sumari sintetizați pe zi.

45 Rezultatul invenției este condiționat de timpul variat de germinare al aplanosporilor în funcție de vârsta și de tipul lor (verzi sau roșii). Aplanosporii tineri verzi germinează mai repede, deoarece procesele metabolice legate de acest proces decurg cu o viteză mai mare în cazul supunerii lor unor condiții de cultivare favorabile. Productivitatea sporită a carotenoizilor sumari sintetizați pe zi este condiționată de mărirea cantității de biomasă algală acumulată pe zi.

Exemplu de realizare a invenției

50 Se iau 20 de vase cu volumul de 1 L, în care se toarnă câte 0,5 L mediu nutritiv cu următoarea componență, în mg/L: NaNO_3 300; KH_2PO_4 20; K_2HPO_4 80; NaCl 20; 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; H_3BO_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.

Se iau 4 variante de inocul algal, fiecare constituit din tipuri variate de celule, dar în aceeași cantitate – 0,3 g/L în recalcul la biomasa absolut uscată (B.A.U.). Fiecare variantă este testată în 5 repetări, adică introdusă în 5 vase de cultivare. Aceste variante sunt:

55 I variantă – inocul constituit din aplanospori roșii în vârstă de 3 luni;

a II-a variantă – inocul constituit din aplanospori verzi în vârstă de 3 luni;

MD 1866 F1 2002.02.28

4

a III-a variantă – inocul constituent din aplanospori verzi în vârstă de 2 săptămâni;

a IV-a variantă – inocul constituent din celule verzi flagelate.

Vârsta aplanosporilor se numără din momentul transformării lor în aplanospori, din celule flagelate verzi.

5 Cultivarea algelor se efectuează la intensitatea luminii de 1500 lx/m², temperatura 24°C și pH 6,8. La atingerea fazei staționare (la fiecare variantă de experiențe aparte – vezi tabelul) se determină cantitatea biomasei algale (în g/L) utilizând metoda fotocolorimetrică (la "ÓÝE"). După aceasta biomasa algală se aduce la concentrația 10 mg/mL (reieșind din calcule la volumul necesar), prin centrifugare și aducere la volumul respectiv cu apă distilată, apoi se supune analizelor biochimice necesare. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul de mai jos.

10

Productivitatea algei *H. pluvialis* (Flotow) în dependență de tipul celulelor constituente ale inoculului

Vari- anta	Tipul inoculului	Timpul atingerii fazei staționare (zile)	B.A.U. finală (g/L)	Conținutul brut al carotenoizilor sumari sintetizați pe zi (mg/L)
I	Aplanospori roșii în vârstă de 3 luni	21	2,8±0,6	10,5±0,4
II	Aplanospori verzi în vârstă de 3 luni	12	2,5±0,5	14,2±0,6
III	Aplanospori verzi în vârstă de 2 săptămâni	7	2,7±0,1	30,1±0,3
IV	Celule verzi flagelate	7	1,7±0,3	16,8±0,5

15 Din tabel se vede că în cazul utilizării primei variante de inocul, adică a aplanosporilor roșii, faza staționară se atinge la a 21-a zi de cultivare, B.A.U. finală constituie 2,8±0,6 g/L, conținutul brut al carotenoizilor sumari sintetizați pe zi este de 10,5±0,4 mg/L.

La utilizarea variantei a doua de inocul, adică de aplanospori verzi în vârstă de 3 luni faza staționară se atinge la a 12-a zi de cultivare, B.A.U. finală constituie 2,5±0,5 g/L, conținutul brut al carotenoizilor sumari sintetizați pe zi este de 14,2±0,6 mg/L.

20

Utilizarea inoculului descris în varianta a treia, adică a aplanosporilor verzi în vârstă de 2 săptămâni, conform procedurii propus, permite atingerea fazei staționare de către cultura algală la a 7-a zi de cultivare, B.A.U. finală constituie 2,7±0,1 g/L, conținutul brut al carotenoizilor sumari sintetizați pe zi este de 30,1±0,3 mg/L.

25

În varianta a patra, unde în calitate de inocul se utilizează celule verzi flagelate, faza staționară de dezvoltare se atinge la a 7-a zi de cultivare, B.A.U. finală constituie 1,7±0,3 g/L, conținutul brut al carotenoizilor sumari sintetizați pe zi este de 16,8±0,5 mg/L.

Astfel, rezultatele obținute confirmă superioritatea utilizării aplanosporilor verzi în vârstă de 2 săptămâni, în scopul obținerii unei productivități sporite de carotenoizi și reducerii timpului de cultivare.

30

MD 1866 F1 2002.02.28

5

(57) Revendicare:

Procedeu de cultivare a algei verzi *Haematococcus pluvialis* Flotow, care include inocularea aplanosporilor verzi ai algei în mediu nutritiv mineral, **caracterizat prin aceea că** inocularea aplanosporilor și cultivarea algei se efectuează pe mediul nutritiv mineral, care conține (în mg/L):

5	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
10	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
15	H ₃ BO ₃	0,29...0,31
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O 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,
20	timp de 7 zile, intensitatea iluminării de 1500...2000 lx, pH de 6,8...7,2 și temperatura de 25...27°C, iar pentru inoculare se iau aplanospori verzi în vârstă de 2 săptămâni din momentul transformării lor din celule verzi flagelate în aplanospori verzi.	

25

(56) Referințe bibliografice:

1. S. Boussiba and A. Vonshak. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* // Plant Cell Physiol. 1991, v. 32, p. 1077 – 1082
2. C. Hagen, W. Braune, E. Birkner and J. Nuske. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Girod) Rostafinski (Volvocales). I. The accumulation period as an active metabolic process //New Phytol. 1993, No.125, p. 625 - 633
3. K. Grunewald, C. Hagen and W. Braune. Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris* // Eur.J. Phycol. 1997, No. 32, p. 387 – 392

Șef Secție:

CRASNOVA Nadejda

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

CANȚER Svetlana