



MD 4859 B1 2023.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4859** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/12* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C01G 7/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

În 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	
(21) Nr. depozit: a 2022 0009 (22) Data depozit: 2022.02.16	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2023.05.31, BOPI nr. 5/2023
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: RUDI Ludmila, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDIC Valeriu, MD; VALUȚA Ana, MD; DJUR Svetlana, MD; DUMBRĂVEANU Veronica, MD; IAȚCO Iulia, MD; MISCU Vera, MD; ROTARI Mihaela, MD; TAȘCA Ion, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD	

(54) Procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01

(57) Rezumat:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* în scopul obținerii de biomasă cu conținut sporit de lipide.

Procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 include cultivarea pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: KCl 16,04; NaCl 12,52; KNO₃ 1,24; MgSO₄·7H₂O 2,5; CaCl₂ 0,118; K₂HPO₄·3H₂O 0,5; KI 0,05; KBr 0,05; 1 mL/L soluție ce conține, mg/L: H₃BO₃ 2,86;

MnCl₂·4H₂O 1,81; CuSO₄·5H₂O 0,08; MoO₃ 0,015; FeEDTA 0,5 mL; nanoparticule de Au de 10 nm stabilizate în citrat 0,23-0,27 nM și apă distilată restul, la temperatura de 25-28°C, pH 6,8-7,2, iluminarea continuă de 50-57 μM fotoni/m²·s, timp de 14 zile.

Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei lipidelor și acumulării lor în biomasa microalgei *Porphyridium cruentum*.

Revendicări: 1

MD 4859 B1 2023.05.31

(54) Process for cultivation of microalga *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01**(57) Abstract:**

1

The invention refers to biotechnology, namely to a process for cultivation of microalga *Porphyridium cruentum* in order to obtain the biomass with high lipid content.

The process for cultivation of microalga *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 comprises cultivation on a nutrient medium containing, g/L: KCl 16.04; NaCl 12.52; KNO₃ 1.24; MgSO₄·7H₂O 2.5; CaCl₂ 0.118; K₂HPO₄·3H₂O 0.5; KI 0.05; KBr 0.05; 1 mL/L solution containing, mg/L: H₃BO₃ 2.86; MnCl₂·4H₂O 1.81; CuSO₄·5H₂O 0.08;

2

MoO₃ 0.015, FeEDTA 0.5 mL, Au nanoparticles of 10 nm stabilized in citrate 0.023-0.027nM and distilled water the rest, at a temperature of 25-28°C, pH 6.8-7.2, constant lighting of 50-57 μM photons/m²/s, for 14 days.

The result of the invention consists in increasing the biosynthesis of lipids and their accumulation in the biomass of microalga *Porphyridium cruentum*.

Claims: 1

(54) Способ культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01**(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum* с целью получения биомассы с высоким содержанием липидов.

Способ культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 включает культивирование на питательной среде, содержащей, г/л: KCl 16,04; NaCl 12,52; KNO₃ 1,24; MgSO₄·7H₂O 2,5; CaCl₂ 0,118; K₂HPO₄·3H₂O 0,5; KI 0,05; KBr 0,05; 1 мл/л раствора, содержащего, мг/л: H₃BO₃ 2,86; MnCl₂·4H₂O 1,81;

2

CuSO₄·5H₂O 0,08; MoO₃ 0,015; FeEDTA 0,5 мл; наночастицы Au 10 нм стабилизированные в цитрате 0,023-0,027 нМ и дистиллированную воду остальное, при температуре 25-28°C, pH 6,8-7,2, постоянном освещении в 50-57 мкМ фотон/м²·с, в течение 14 дней.

Технический результат состоит в повышении биосинтеза липидов и их накопления в биомассе микроводоросли *Porphyridium cruentum*.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* în scopul obținerii de biomasă cu conținut sporit de lipide.

5 Ficobiotehнологia este un nou domeniu de aplicare a nanoparticulelor. A fost demonstrat efectul stimulator al unor nanoparticule care se implică activ în metabolismul celular al microalgelor. Nanoparticulele pot fi considerate și drept o sursă alternativă de oligoelemente care au funcția de stimulatori ai multiplicării și activității biosintetice. Dimensiunile mici ale nanoparticulelor este unul din factorii determinanți în interacțiunea lor cu celula.

10 Este cunoscut procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 pe mediul mineral cu următoarea componență: macroelemente (g/L) NaNO₃ 5,0; NaCl 7,0; KCl 7,5; MgSO₄·7H₂O 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O 0,15; KBr 0,05; KI 0,05; K₂HPO₄ 0,2; 1,0 mL soluție de microelemente ce conține (g/L): FeCl₃·6H₂O 0,27; ZnSO₄·5H₂O 0,02; CuSO₄·5H₂O 0,05; MnSO₄·5H₂O 0,3; H₃BO₃ 0,6; MoO₃ 0,02; NaVO₃ 0,05. Conform procedurii, în prima zi de cultivare, la suspensia de microalgă se adaugă compusul Co^{III}(DmgH)₂(H₂L)Cl în concentrație de 0,014 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 100 mL cu 50 mL de suspensie în următoarele condiții: pH 6,8-7,2, temperatura de 23-25°C, iluminarea de 2000-3000 lx/cm², la agitare lentă periodică. Conținutul de lipide în biomasa obținută conform procedurii este de 14,15±1,02% [1].

20 Neajunsul acestui procedeu constă în conținutul redus de lipide în biomasă.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea conținutului de lipide în biomasa microalgei *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01.

25 Problema se rezolvă prin procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01, care include cultivarea pe un mediu nutritiv ce conține macroelemente, g/L: KCl 16,04; NaCl 12,52; KNO₃ 1,24; MgSO₄·7H₂O 2,5; CaCl₂ 0,118; K₂HPO₄·3H₂O 0,5; KI 0,05; KBr 0,05; 1 mL/L soluție de microelemente ce conține, mg/L: H₃BO₃ 2,86; MnCl₂·4H₂O 1,81; CuSO₄·5H₂O 0,08; MoO₃ 0,015; FeEDTA 0,5 mL și apă distilată până la 1 L. În calitate de stimulator al sintezei lipidelor se utilizează nanoparticule de aur cu dimensiunea de 10 nm stabilizate în citrat (Sigma), care se adaugă la mediul de cultivare în concentrație de 0,023-0,027 nM. Cultivarea se efectuează timp de 14 zile la temperatură constantă de 25-28°C, pH 6,8-7,2 și iluminarea cu intensitatea de 50-57 μmol fotoni/m²·s, în regim continuu și agitare lentă periodică.

30 Rezultatul tehnic a invenției constă în sporirea cu 39% a conținutului de lipide în biomasa microalgei *Porphyridium cruentum*.

35 Rezultatul invenției se datorează aplicării nanoparticulelor de aur cu dimensiunea de 10 nm stabilizate în citrat, în calitate de stimulator al biosintezei lipidelor de către microalga de interes biotehologic *Porphyridium cruentum*, producător de lipide omega-3. Nanoparticulele pot induce în celulele microalgale o stare de stres oxidativ moderat, și drept urmare stimularea sintezei lipidelor (Alishah Aratboni H., Rafiei N., Garcia-Granados R. et al. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. Microb Cell Fact, 2019, 18, 178, URL: <<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1228-4>>).

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

45 Se prepară mediul de cultivare cu următorul conținut de minerale: macroelemente (g/L): KCl 16,04; NaCl 12,52; KNO₃ 1,24; MgSO₄·7H₂O 2,5; CaCl₂ 0,118; K₂HPO₄·3H₂O 0,5; KI 0,05; KBr 0,05; 1 mL/L soluție de microelemente ce conține (mg/L): H₃BO₃ 2,86; MnCl₂·4H₂O 1,81; CuSO₄·5H₂O 0,08; MoO₃ 0,015; 0,5 mL/L FeEDTA și apă distilată până la 1 L. La mediul preparat se adaugă 0,023 nM de nanoparticule de Au cu dimensiunea de 10 nm stabilizate în citrat. Cultura start este suspensia de *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 în cantitatea de 0,55 g/L. Cultivarea microalgei se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 100 mL cu volumul suspensiei de 50 mL, la temperatura de 25°C, pH 6,8-7,2 și iluminarea cu intensitatea de 50-57 μmol fotoni/m²·s, în regim continuu și agitare lentă periodică. Durata ciclului de cultivare este de 14 zile. La finalul ciclului de cultivare biomasa se colectează și se determină conținutul de lipide. Conținutul lipidelor în biomasă este de 19,6±0,24%.

Exemplul 2

55 Se prepară mediul de cultivare cu următorul conținut de minerale: macroelemente (g/L): KCl 16,04; NaCl 12,52; KNO₃ 1,24; MgSO₄·7H₂O 2,5; CaCl₂ 0,118; K₂HPO₄·3H₂O 0,5; KI 0,05; KBr 0,05; 1 mL/L soluție de microelemente ce conține (mg/L): H₃BO₃ 2,86; MnCl₂·4H₂O 1,81; CuSO₄·5H₂O 0,08; MoO₃ 0,015 și FeEDTA 0,5 mL/L. La mediul preparat se adaugă 0,027 nM de

nanoparticule de Au cu dimensiunea de 10 nm, stabilizate în citrat. Cultura start este suspensia de *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 în cantitate de 0,55-0,6 g/L. Cultivarea microalgei se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 100 mL cu volumul suspensiei de 50 mL la temperatura de 28°C, pH 6,8-7,2 și iluminarea cu intensitatea de 50-57 $\mu\text{mol fotoni/m}^2\text{s}$, în regim continuu și agitare lentă periodică. Durata ciclului de cultivare este de 14 zile. La finalul ciclului de cultivare, biomasa se colectează și se determină conținutul de lipide. Conținutul lipidelor în biomasă este de 19,7±0,12%.

Tabel

Conținutul de lipide în biomasa de *Porphyridium cruentum*

Procedeul aplicat	Compusul, concentrația	Conținutul de lipide, % BAU
Conform celei mai apropiate soluții	0,014 g/L, $\text{Co}^{\text{III}}(\text{DmgH})_2(\text{H}_2\text{L})\text{Cl}$	14,15±1,02
Conform soluției revendicate	0,023 nM, AuNP(citrat) 10 nm	19,60±0,24
	0,027 nM, AuNP(citrat) 10 nm	19,70±0,12

10

Astfel, datele din tabel demonstrează majorarea cu 39% a conținutului de lipide în biomasa microalgei *Porphyridium cruentum* conform procedeeului revendicat față de cea mai apropiată soluție.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 4303 B1 2014.09.30

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01, care include cultivarea pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: KCl 16,04; NaCl 12,52; KNO_3 1,24; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5; CaCl_2 0,118; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5; KI 0,05; KBr 0,05; 1 mL/L soluție ce conține, mg/L: H_3BO_3 2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08; MoO_3 0,015; FeEDTA 0,5 mL; nanoparticule de Au de 10 nm stabilizate în citrat 0,023-0,027 nM și apă distilată restul, la temperatura de 25-28°C, pH 6,8-7,2, iluminarea continuă cu intensitatea de 50-57 $\mu\text{M fotoni/m}^2\text{s}$, agitare lentă periodică, timp de 14 zile.