



MD 1946 F1 2002.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1946⁽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 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 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
MnSO ₄ · H ₂ O	1,49...1,51
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,079...0,081
H ₃ BO ₃	0,29...0,31

2	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,29...0,31
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	16,9...17,1
5	Co(NO ₃) ₂ · H ₂ 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-episclareolidă 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

MD 1946 F1 2002.06.30

3

Descriere:

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

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

Actualmente β -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].

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: NaNO_3 - 299...300; 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; 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 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 β -caroten în componența ei, adică biomasa absolut uscată constituie $2,7 \pm 0,1$ g/L, iar conținutul brut final de β -caroten - $70,3 \pm 0,9$ mg/L.

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 β -caroten în biomasă.

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: NaNO_3 - 299...300; 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; 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-episcloreolidă ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2$) în cantitate de 0,025...0,075 g/L.

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 β -caroten - $86,1 \pm 2,0$ mg/L față de $70,0 \pm 0,9$ mg/L (soluția cea mai apropiată).

Rezultatul invenției este condiționat de prezența tetranorditerpenic 9-episcloreolidei 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-episcloreolidă 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 γ -lactona, p. t. 132,5-133,5°C cu un randament de 21%, identificată ca 9-episcloreolidă.

Exemplu de realizare a invenției

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: 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; 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 adaugă compusul tetranorditerpenic 9-episcloreolidă 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 analizelor biochimice necesare. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul de mai jos.

55

Tabel

5

Productivitatea algei *H. pluvialis*

Nr.	Procedeu de cultivare	Biomasa absolut uscata inițială (g/L)	Biomasa absolut uscata finală (g/L)	Conținutul brut final de β-caroten (mg/L)
1.	Procedeu conform soluției cele mai apropiate	0,3	2,7±0,1	70,0±0,9
2.	Procedeu propus în inventie	0,3	3,3±0,2	86,1±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 β-caroten în biomasă, respectiv 3,3±0,2 g/L biomasă absolut uscată și 86,1±2,0 mg/L conținut brut final de β-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 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
MnSO ₄ · H ₂ O	1,49...1,51
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,079...0,081
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

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

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2001 0028		
(22) Data depozit: 2001.01.31		
(51) ⁷ : C 12 N 1/12		
Titlul : Procedeu de obținere a biomasei algei verzi Haematococcus pluvialis. (71) Solicitantul : Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD; Universitatea de Stat din Moldova, MD Termeni caracteristici : cultivarea algelor verzi		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
Int. Cl. ⁷ C 12 N 1/12		
(MD) 1993 - 2001		
(EA) 1996 - 2001		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A MD cer. a2000-0154		1
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
A - document care definește statutul general al tehnicii		T - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la data publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data efectuării de documentare		2002.04.08
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

ANEXĂ

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4