



MD 4104 B1 2011.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4104** ⁽¹³⁾ **B1**

(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(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 2010 0141 (22) Data depozit: 2010.12.22	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.03.31, BOPI nr. 3/2011
(71) Solicitant: RUDIC Valeriu, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; MISCU Vera, MD; RUDI Liudmila, MD; CEPOI Liliana, MD; IAȚCO Iulia, MD (73) Titular: RUDIC Valeriu, MD	

(54) Tulpină de algă *Haematococcus pluvialis* Flotow – sursă de astaxantină

(57) Rezumat:

Invenția se referă la biotehnologie și poate
fi utilizată pentru obținerea astaxantinei.

Tulpina de algă *Haematococcus pluvialis*
Flotow este depozitată în Colecția Națională de
Microorganisme Nepatogene a Institutului de
Microbiologie și Biotehnologie al Academiei

de Științe a Republicii Moldova cu numărul
CNMN-AV-07 și poate fi utilizată în calitate
de sursă de astaxantină.

Rezultatul constă în sporirea productivității
algei și a cantității de astaxantină.

Revendicări: 1

(54) Strain of *Haematococcus pluvialis* Flotow alga – source of astaxanthin

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology and
can be used to produce astaxanthin.

The strain of *Haematococcus pluvialis*
Flotow alga is deposited with the National
Collection of Nonpathogenic Microorganisms
of the Institute of Microbiology and
Biotechnology of the Academy of Sciences of
the Republic of Moldova under the number

2
CNMN-AV-07 and can be used as a source of
astaxanthin.

5 The result is to increase the productivity of
alga and the quantity of astaxanthin.

10 Claims: 1

(54) Штамм водоросли *Haematococcus pluvialis* Flotow – источник астаксантина

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии
и может быть использован для получения
астаксантина.

Штамм водоросли *Haematococcus*
pluvialis Flotow депонирован в Националь-
ной Коллекции Непатогенных Микро-
организмов Института Микробиологии и
Биотехнологии Академии Наук Республики
Молдова под номером CNMN-AV-07 и

2
может быть использован в качестве источ-
ника астаксантина.

5 Результат состоит в повышении про-
дуктивности водоросли и в увеличении
количества астаксантина.

10 П. формулы: 1

MD 4104 B1 2011.03.31

3

Descriere:

Invenția se referă la tulpinile de microalge producătoare de substanțe bioactive, în special la tulpina algei verzi *Haematococcus pluvialis* Flotow, care poate fi utilizată în biotehnologie pentru obținerea astaxantinei.

- 5 Astaxantina – pigment din grupa carotenoizilor, este unul din cei mai de valoare anti-oxidanți, cunoscuți în prezent. Activitatea antioxidantă a acestei substanțe este net superioară, comparativ cu cea a unor astfel de antioxidanți recunoscuți ca tocoferolul, acidul ascorbic, β -carotenul, lycopina ș.a.

- 10 Privită din perspectiva contracarării stresului oxidativ, care conform concepției contemporane prezintă un mecanism patofiziologic de bază, comun unui număr mare de maladii, astaxantina este un compus valoros, care poate fi utilizat în tratamentul afecțiunilor cardiovasculare, cancerului, tulburărilor neurologice și imune, diabetului zaharat, ischemiei, bolilor Alzheimer, Parkinson, etc., precum și pentru încetinirea îmbătrânirii organismului în ansamblu.

- 15 La etapa actuală, ca sursă de astaxantină sunt considerate un număr restrans de micro-organisme, dintre care drojdia *Phaffia rhodozyma* [1] și *Agrobacterium aurantiacum* [2].

- 20 Dezavantajele acestor tulpini sunt cantitatea mică de astaxantină și cheltuielile mari pentru cultivare. Astfel *Phaffia rhodozyma* conține 30...800 mg de astaxantină la kg de biomasă absolut uscată (adică până la 0,08%), iar *Agrobacterium aurantiacum* – 30...120 mg de astaxantină la kg de biomasă absolut uscată (adică până la 0,012%).

Este cunoscută tulpina *Haematococcus pluvialis* Flotow CNMN-AV-05 [3].

Dezavantajul acestei tulpini este productivitatea mică, și anume 1,32 g/l de biomasă absolut uscată (BAU).

- 25 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unei tulpini noi de *Haematococcus pluvialis*, care ar asigura o productivitate mai sporită de biomasă cu un conținut suficient de astaxantină și minimum de cheltuieli pentru cultivare.

Esența invenției constă în aceea că se propune tulpina de algă *Haematococcus pluvialis* Flotow CNMN-AV-07 în calitate de sursă de astaxantină.

- 30 Productivitatea de biomasă a tulpinii de algă *Haematococcus pluvialis* Flotow cu numărul CNMN-AV-07 este 3,0 g/l față de 1,32 g/l cea mai apropiată soluție și conține 2,4% astaxantină. Astfel, la cultivarea noii tulpini se obțin 3,0 g/l de biomasă cu un conținut de 2,4% de astaxantină, ceea ce în valori absolute constituie 72 mg. În cazul celei mai apropiate soluții acest indiciu constituie 44,9 mg.

Rezultatul constă în sporirea productivității algei și a cantității de astaxantină.

- 35 Tulpina propusă a fost colectată dintr-un bazin acvatic artificial din apropierea satului Căpřiana.

În cultură algologic pură tulpina se multiplică intens pe mediul mineral lichid RD cu următoarea componență a macroelementelor (g/l): NaNO_3 – 0,3; KH_2PO_4 – 0,02; K_2HPO_4 – 0,08; NaCl – 0,02; CaCl_2 – 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0001; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,0015; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,00008; H_3BO_3 – 0,0003; $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,0003; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0175; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0002; EDTA – 0,0075.

În condiții obișnuite de cultivare tulpina respectivă are o productivitate de 3,0 g/l cu un conținut de astaxantină de 2,4% din biomasă absolut uscată.

Caractere morfo-culturale ale tulpinii

- 45 *Haematococcus pluvialis* Flotow CNM-AV-07 este o algă verde monocelulară. Structura celulară a *Haematococcus pluvialis* se aseamănă cu cea a majorității algelor monocelulare din ordinul *Volvocales*. În dependență de etapa de dezvoltare, forma și dimensiunile celulelor variază.

- 50 În condiții optime de creștere celulele vegetative verzi au formă sferică spre elipsoidală cu diametrul între 8...20 μm înconjurată de o membrană netedă, îndepărtată de protoplast, fiind acoperite de o matrice extracelulară gelatinoasă de o grosime variabilă. Din partea posterioară a protoplastului pleacă 2 flageli izoconți de lungime egală cu cea a corpului celular. Cromatoforul parietal în formă de pară sau cupă, foarte fin reticulat, este străbătut de protoplasmă hialină. Nucleul este mare, dispus central, cu un singur nucleol și nu este atașat de flageli. Pe parcursul dezvoltării alga trece ușor în formă palmeloidă, celulele mobile își pierd flagelii și devin celule vegetative în stare de repaus, fiind înconjurată de un strat mucozitar cu grosimea de $5,8 \pm 0,10 \mu\text{m}$. În condiții de iluminare excesivă celulele vegetative

MD 4104 B1 2011.03.31

4

se transformă în ciști roșii – aplanospori. La această etapă celulele acumulează o cantitate masivă de astaxantină în picături de lipide din citoplasmă. Când condițiile devin favorabile aplanosporii revin la forma vegetativă.

Caractere fiziologo-biochimice

- 5 Tulpina microalgei verzi *Haematococcus pluvialis* Flotow CNMN-AV-07 crește bine pe mediul RD, componența căruia a fost menționată mai sus. Temperatura optimă este de 25...27°C, pH 7,0. Intensitatea optimă a luminii este de 1500...3000 lx.

Tulpina este sensibilă la variația condițiilor de cultivare.

- 10 În condiții favorabile de existență se caracterizează printr-o productivitate de 3 g/l biomasă absolut uscată. Biomasă absolut uscată de *Haematococcus pluvialis* Flotow CNMN-AV-07 are conținutul de astaxantină de 2,4%.

Gradul de puritate a tulpinii

- 15 Tulpina a fost obținută prin metoda „picăturii suspendate” în cultură algologic pură și acumulată în mediul lichid și agarizat RD. La cultivarea în masă poate fi infectată cu alge și cianobacterii. Contaminarea poate fi evitată prin respectarea condițiilor aseptice.

Exemplu de realizare a invenției

- 20 În vase de cultură cu volumul de 1 litru în mediul mineral lichid cu următoarea compoziție a microelementelor (g/L): $\text{NaNO}_3 - 0,3$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,02$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,08$; $\text{NaCl} - 0,02$; $\text{CaCl}_2 - 0,05$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,01$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,0001$; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,0015$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,0003$; $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,0003$; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,0175$; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,0002$; EDTA – 0,0075, pH 7,0, pregătit pe apă distilată, se introduce inoculumul de 0,3 g/l calculat pentru biomasă absolut uscată. Cultivarea se realizează la intensitatea luminii de 1500 lx timp de 10 zile, după care 5 zile la intensitatea luminii de 3000 lx, la temperatura de 25...27°C. În ziua a 15-a productivitatea ajunge până la 25 3 g/l de biomasă absolut uscată, ce conține 2,4% astaxantină.

30

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Maher T. Astaxanthin: A versatile carotenoid antioxidant. International journal of integrative medicine, 2000, vol.2, nr.4, p.14-17
2. Yokoyama A., Miki W. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. FEMS Letters, 1995, vol. 128, p.139-144
3. MD 1352 G2 2000.10.31

(57) Revendicări:

Tulpină de algă *Haematococcus pluvialis* Flotow CNMN-AV-07 în calitate de sursă de astaxantină.

Șef secție:

COLESNIC Inesa

Examinator:

GORDIENCO Maria

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: a 2010 0141 (32) Data de prioritate recunoscută:		
(22) Data depozit: 2010.12.22 Raport de documentare internațională: ☐ da		
(54) Titlul: Tulpină de algă <i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow -sursă de astaxantină		
(71) Solicitant: RUDIC Valeriu, MD		
(51) (Int.Cl): Int. Cl.: C12N 1/12 (2006.01) C12P 23/00 (2006.01) C12R 1/89 (2006.01)		
II. Condiții de unitate a invenției: x satisface ☐ nu satisface		
Note:		
III.Revendicări: claritatea, susținerea de descriere		
Note: x satisface ☐ nu satisface		
IV. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare)		
MD (Documentare Invenții (inclusiv cereri nepublicate)) - Tulpina de microalga verde <i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow; astaxantină. "Worldwide" (Espacenet) – Strain of <i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow green mycroalga;astaxanthin EA, CIS (Eapatis) – штамм зеленой микроводоросли <i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow; астаксантин SU (nonpublic) – штамм зеленой микроводоросли <i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow; астаксантин Alte BD –		
V. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate		
Boussiba S. and Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga <i>Haematococcus pluvialis</i> . Plant Cell Physiol., 1991, v. 32, p. 1077-1082.		
VI. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	Boussiba S. and Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga <i>Haematococcus pluvialis</i> . Plant Cell Physiol., 1991, v. 32, p. 1077-1082.	1
A,C,D	MD 1352 G2 2000.10.31	1
A,D	Maher T. Astaxanthin: A versatile carotenoid antioxidant. International journal of integrative medicine,2000,vol.2,nr.4, p.14-17	1
A,D	Yokoyama A., Miki W. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-	1

A A	producing bacterium <i>Agrobacterium aurantiacum</i> . FEMS Letters, 1995, vol.128, p.139-144	
	MD 132 Z 2010.01.31 MD 146 Z 2010.02.28	1 1
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general		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 pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur		E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie		D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare		C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
		& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate		L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării,		2011.01.10
Examinator		GORDIENCO Maria