



MD 4849 B1 2023.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4849** (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 0010 (22) Data depozit: 2022.02.16	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2023.03.31, BOPI nr. 3/2023
(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; DONI Veronica, MD; CODREANU Liviu, MD; MISCU Vera, MD; ROTARI Ion, MD; TAȘCA Valentina, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD	

(54) Procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum*

(57) Rezumat:

1
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 de microelemente ce conține, mg/L:

2
H₃BO₃ 2,86; MnCl₂·4H₂O 1,81; CuSO₄·5H₂O 0,08; MoO₃ 0,015; FeEDTA 0,5 mL; nanoparticule de Au de 5 nm stabilizate în citrat 4,8-5,1 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 4849 B1 2023.03.31

(54) Process for cultivating *Porphyridium cruentum* microalga**(57) Abstract:**

1
The invention relates to biotechnology, namely to a process for cultivating *Porphyridium cruentum* microalga in order to obtain biomass with a high lipid content.

The process for cultivating *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 microalga 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 of microelements

2
containing, mg/L: H₃BO₃ 2.86; MnCl₂·4H₂O 1.81; CuSO₄·5H₂O 0.08; MoO₃ 0.015; FeEDTA 0.5 mL; Au nanoparticles 5 nm stabilized in citrate 4.8-5.1 nM and distilled water the rest, at a temperature of 25-28°C, pH 6.8-7.2, constant illumination of 50-57 μM photon/m²s, within 14 days.

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

Claims: 1

(54) Способ культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum***(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 микроэлементов, содержащего, мг/л: H₃BO₃ 2,86; MnCl₂·4H₂O

2
1,81; CuSO₄·5H₂O 0,08; MoO₃ 0,015; FeEDTA 0,5 мл; наночастицы Au 5 нм стабилизированные в цитрате 4,8-5,1 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, în particular la un procedeu de cultivare a microalgei roșii *Porphyridium cruentum* în scopul obținerii de biomasă cu un conținut sporit de lipide.

5 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 10 0,014 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer de 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 biomasă obținută constituie 14,15±1,02% [1].

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

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

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 20 0,05; 1 mL/L de 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/L și apă distilată până la 1 L. În calitate de stimulator al biosintezei lipidelor se utilizează nanoparticule de aur cu dimensiunea de 5 nm stabilizate în citrat, care se adaugă la mediul de cultivare în concentrație de 4,8-5,1 nM. Cultivarea se efectuează timp de 14 zile la temperatura constantă de 25-28°C, pH 6,8-7,2 și iluminarea 25 continuă cu intensitatea de 50-57 μmol fotoni/m²·s și agitare lentă periodică.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 52% a conținutului de lipide în biomasă microalgei *Porphyridium cruentum*.

Rezultatul invenției este condiționat de utilizarea nanoparticulelor de aur cu dimensiunea de 5 nm stabilizate în citrat, în calitate de stimulator al biosintezei lipidelor de către microalga 30 marină de interes biotehologic *Porphyridium cruentum*, producător de lipide omega-3. Nanoparticulele pot induce în celulele microalgale un stres oxidativ moderat și drept rezultat stimularea sintezei lipidelor (Alishah Aratboni H. ș.a. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. Microbial Cell Factories, 2019, nr. 18, p. 178).

35 Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

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 de soluție de microelemente ce conține (mg/L): H₃BO₃ 2,86; MnCl₂·4H₂O 1,81; 40 CuSO₄·5H₂O 0,08; MoO₃ 0,015, FeEDTA 0,5 mL/L și apă distilată până la 1 L. La mediul preparat se adaugă 4,8 nM de nanoparticule de Au cu dimensiunea de 5 nm stabilizate în citrat. Cultura start este suspensia de *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 în cantitate de 0,55 g/L. Cultivarea microalgei se efectuează în baloane Erlenmeyer de 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 45 continuu și agitare lentă periodică. Durata ciclului de cultivare este de 14 zile. La finalul ciclului de cultivare biomasă se colectează și se determină conținutul de lipide. Conținutul lipidelor în biomasă este de 21,54%±0,13.

Exemplul 2

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 de soluție de microelemente ce conține (mg/L): H₃BO₃ 2,86; MnCl₂·4H₂O 1,81; 50 CuSO₄·5H₂O 0,08; MoO₃ 0,015, FeEDTA 0,5 mL/L și apă distilată până la 1 L. La mediul preparat se adaugă 5,1 nM de nanoparticule de Au cu dimensiunea de 5 nm stabilizate în citrat. Cultura start este suspensia de *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 în cantitate de 0,55 g/L. Cultivarea 55 microalgei se efectuează în baloane Erlenmeyer de 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 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 $21,62\% \pm 0,08$.

Conținutul de lipide în biomasa de *Porphyridium cruentum*

Procedeele 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 \pm 1,02
Conform soluției revendicate	4,8 nM, AuNP(citrat) 5 nm	21,54 \pm 0,13
	5,1 nM, AuNP(citrat) 5 nm	21,62 \pm 0,08

- 5 Astfel, datele din tabel demonstrează majorarea cu 52% a conținutului de lipide în biomasa microalgei *Porphyridium cruentum* conform procedurii propus în invenție 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 de microelemente 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 5 nm stabilizate în citrat 4,8-5,1 nM și apă distilată restul, la temperatura de 25-28°C, pH 6,8-7,2, iluminarea continuă cu intensitatea de 50-57 μM fotoni/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$, agitare lentă periodică, timp de 14 zile.