



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00561

(22) Data de depozit: 17/09/2021

(41) Data publicării cererii:  
30/03/2023 BOPI nr. 3/2023

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI  
AL ACADEMIEI ROMÂNE,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.296,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• ARDELEAN IOAN, ALEEA ZORELELOR,  
NR.1, BL.43, SC.A, ET.10, AP.62,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• MOISESCU CRISTINA,  
STR.IZVORUL MUREȘULUI, NR.9, BL.D9,  
SC.F, ET.2, AP.56, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• ARDELEAN ANA VALENTINA,  
ALEEA ZORELELOR, NR.1, BL.43, SC.A,  
AP.62, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• NEGUȚ CONSTANTIN DANIEL,  
ALEEA SANDULEȘTI, NR.3, BL.E16, SC.A,  
ET.8, AP.44, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO

(74) Mandatar:  
CABINET N.D. GAVRIL S.R.L.,  
STR.ȘTEFAN NEGULESCU NR.6A,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI

(54) PROCEDEU BIOTEHNOLOGIC DE STIMULARE A CREȘTERII  
CANTITĂȚII DE BIOMASĂ DE CHLORELLA SOROKINIANA  
UTEX 1230

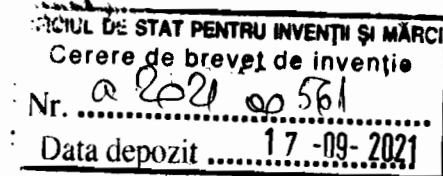
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu biotehologic de obținere a biomasei de microalgă verde *Chorella sorokiniana* UTEX 1230. Procedeu, conform invenției, constă în aceea că, biomasa de microalgă tulpina *Chorella sorokiniana* UTEX 1230 cultivată în mediu în sine cunoscut, aflată în faza de creștere exponențială, având o densitate optică (D.O.) la 660 nm de aproximativ 0.05 unități D.O., este iradiată cu raze gama de 75 Gy, cu un debit de doză între 0,1 și 1,0 Gy/s, timp de 1...10 min, până când cultura algală ajunge prin creștere și multiplicare celulară până la o D.O. la

660 nm de aproximativ 0,2 unități D.O., cultura astfel iradiată este amestecată cu o cantitate de 150...230 ori mai mare mediu de cultură neiradiat și se menține în continuare timp de 7 zile la presiune atmosferică, cu temperatura de 30°C și iluminare de 16500 lux, în mediu barbotat permanent cu aer atmosferic, rezultând o creștere a randamentului de biomasă recoltată, lipide și proteine totale, clorofile și caroteni totali.

Revendicări: 1  
Figuri: 2





Procedeu biotehnologic de stimulare a creșterii cantității de biomasă de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230

Invenția se referă la un procedeu biotehnologic pentru obținerea creșterii randamentului de biomasă, lipide și proteine totale, clorofile și caroteni totali din microalga verde *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230, de interes economic pentru industria farmaceutică și alimentară.

*Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 este o tulpină microalgală robustă și cu creștere rapidă adecvată atât la nivel de laborator, cât și la nivel de stație pilot.

Microalgele atrag atenția ca o nouă sursă durabilă de biomasă, a cărei capacitate de a realiza fotosinteza oxigenică este mult mai intensă raportată la cantitatea de biomasă comparativ cu capacitatea plantelor superioare.

Microalgele prezintă un interes considerabil la nivel mondial datorită potențialului extins de aplicare în industriile energiei regenerabile, durabile și economice folosite pentru obținerea de biocombustibili, de produse biofarmaceutice, nutraceutice, precum și de produse medicamentoase bioactive și ingrediente alimentare.

În mod particular, microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 este folosită în special pentru producția la scară largă de lipide pentru biocombustibili precum și pentru compuși specifici de interes comercial cum ar fi antioxidanții de tipul carotenoizilor.

Deși microalgele sunt surse fezabile pentru bioenergie și biofarmaceutice în general, la ora actuală există limitări în ceea ce privește tehnologia de obținere a biomasei la scară industrială.

Se cunosc diferite procedee biotehnologice de obținere a biomasei microalgale cum ar fi cultivarea în coloană cu bule, ridicător de aer, ecran plat, coloană verticală, bioreactor tubular.

Brevetul KR20160143327 – "Metodă de cultivare a microalgelor și metodă de control al ingredientelor nutriționale acumulate în celulele microalgelor" se referă la o metodă de cultivare a microalgelor și la o metodă de control al conținutului de substanțe nutritive acumulate în celulele microalgelor folosind modificarea temperaturii culturii în timpul fazei de creștere și inducție a microalgelor cultivate în condiții autotrofe. Și, de asemenea, se referă la o metodă de control al conținutului de proteine, carbohidrați și lipide care se acumulează în celulele microalgelor prin cultivarea în mediu cu deficit de azot.

Lucrarea științifică – „Evaluarea efectului câmpului magnetic de 5-10 mT asupra microalgelor *Chlorella sorokiniana*” - Lupu Ana-Maria și col. - prezintă efectele stimulative și/sau inhibitoare ale câmpului magnetic de 5-10 mT asupra *Chlorella*

*sorokiniana* preparată în laborator din cultură pură. S-a evidențiat clorofila totală pe baza rezultatelor preliminare care au urmărit evoluția ratei de creștere celulară. Rezultatele au arătat un efect stimulator asupra productivității biomasei algelor pentru un câmp magnetic de 50 Hz, dar s-a observat un efect inhibitor pentru câmpul de 15 Hz. Ambele influențe ar putea fi aplicate pentru îmbunătățirea unor procese biotehnologice industriale.

Dezavantajele acestor procedee sunt legate de:

- limitarea cantității de lumină în culturile dense,
- asigurarea unei temperaturi constante,
- în cazul cultivării la scară largă, randamentul obținerii de biomasă este în general mic.
- greutatea substanței uscate a biomasei rezultate este foarte mică,

Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui procedeu biotehnologic de stimulare a ratei de creștere a cantității de biomasă de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 prin aplicarea radiațiilor gama, un timp 1 -10 minute, asupra unei culturi microalgale de colecție, bine caracterizată din punct de vedere științific.

Procedeu biotehnologic de stimulare a creșterii cantității de biomasă de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 constă în aceea că biomasa de microalgă *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 cultivată în mediul BG<sub>11</sub>, în sine cunoscut, până la o densitate optică (D.O.) la 660 nm de aproximativ 0.05 unități D.O. aflată în faza de creștere este iradiată cu raze gama la 75 Gy, cu un debit de doză între 0,1 - 1,0 Gy/s, timp de 1 -10 minute, cultura astfel iradiată este amestecată cu o cantitate de 150 -230 ori mai mare decât mediul de cultură neiradiat. Experientul durează timp de 7 zile, are loc la presiunea atmosferică, la temperatură de 30°C și iluminare de 16.500 lux, în mediul barbotat permanent cu aer atmosferic

Avantajele aplicării invenției:

- se stimulează creșterea cantității de biomasă de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230;
- se accelerează creșterea (scade timpul de generație) la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230;
- crește concentrația de lipide totale, de proteine totale, clorofile a și b, caroten total
- se asigură o distribuție uniformă a energiei luminoase, a temperaturii și a nutrienților pentru a furniza aceiași parametri tuturor celulelor.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătură și cu fig. 1 și 2 care reprezintă:

Fig. 1 - Aspectul macroscopic al culturii martor si iradiate (75 Gy) de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230, la începutul experimentului (imaginea din stanga) si la finalul perioadei de crestere de 7 zile (imaginea din dreapta)

Fig. 2 - Reprezentarea sintetică a compoziției chimice a biomasei de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 consecutiv iradierii gama 75 Gy, comparativ cu martorul neiradiat

Procedeul biotehnologic de stimulare a creșterii cantității de biomasă de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 conform invenției se realizează astfel:

Microalga verde *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230, care este o tulpină de referință pe plan internațional folosită atât în cercetări fundamentale cât și aplicative a fost cultivată în mediul BG<sub>11</sub> până la o densitate optică (D.O.) la 660 nm de aproximativ 0.05 unități D.O. aflate în faza de creștere exponențială

Microalga verde *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 a fost cultivată în mediul BG<sub>11</sub>, în sine cunoscut, până la o densitate optică finală (D.O.) la 660 nm de aproximativ 0.2 unități D.O. aflate în faza de creștere exponențială

Cultura a fost repartizată axenic în 24 tuburi de plastic sterile de câte 50 ml fiecare. Din cele 24 de tuburi cu cultură, au fost selectate aleatoriu 12 tuburi care au funcționat ca martor, iar celelalte 12 tuburi au fost supuse iradierii cu doza de 75 Gy, 1 -10 minute cu un debit de doză între 0,1 - 1,0 Gy/s.

După iradierea celor 12 tuburi la intensitate de 75 Gy, atât probele iradiate cât și probele neiradiate, au fost trecute în condiții axenice în vase sterile de câte 10 l fiecare, așezate alternativ un vas mator și un alt vas cu probă iradiată.

Vasele au fost dotate în interiorul lor cu câte un dispozitiv de barbotare fiind astfel asigurată omogenizarea corespunzătoare a culturii pentru o distribuție uniformă a energiei luminoase, a temperaturii și a nutrienților pentru a furniza aceiași parametri tuturor celulelor.

Incubarea s-a făcut la presiunea atmosferică, la temperatura de 30°C cu iluminare exclusiv din panoul frontal al incubatorului care asigură o intensitate luminoasă la suprafața vasului de cultură de 16.500 lux.

După 7 zile de la trecerea culturii martor și a culturii iradiate în vasele de 10 l și de cultivare în lumină continuă cu barbotare, s-a procedat la colectarea biomasei algale din fiecare vas de cultură.

De asemenea, după cele 7 zile de creștere, s-a determinat D.O la 660 nm a celor două probe, astfel proba martor a avut o D.O de 0,253 unități, iar proba iradiată 0,324 unități, ceea ce demonstrează că proba iradiată a avut o creștere mai accentuată decât martorul neiradiat. (fig. 1)

Recoltarea biomasei s-a facut prin centrifugarea culturii timp de 10 minute la 8.000 rotații pe minut.

Biomasa recoltată a fost analizată în privința următorilor parametri cantitativi:

- a) Biomasa umedă și uscată
- b) Concentrația de clorofilă a și b
- c) Concentrația în caroteni totali
- d) Concentrația în proteine totale
- e) Concentrația în lipide totale

Determinarea acestor parametri s-a facut prin metodele clasice corespunzatoare, în sine cunoscute.

Principalele rezultate obținute demonstrează că microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 iradiată cu 75 Gy prezintă o creștere celulară mai rapidă decât cultura martor neiradiată; și anume 107% biomasă la proba iradiată comparativ cu 100% la probe martor, neiradiată. De asemenea, parametrii analizați precum concentrația de clorofilă a (100% față de 133,4 %), clorofila b (100% față de 139,5%), concentrația în caroteni totali (100% față de 125%), concentrația în proteine totale (100% față de 173,3%), concentrația în lipide totale (100% față de 110%) sunt mai mari la proba iradiată comparativ cu proba martor neiradiată (fig. 1)

Astfel, pomindu-se de la probe identice, după 7 zile de la iradierea cu radiație gama 75 Gy, proba iradiată produce o cantitate mai mare de biomasă totală decât martorul neiradiat, această biomasă având și o concentrație mai mare în clorofilă a și b, caroteni totali, în proteine totale și în lipide totale (fig. 1).

## REVENDICARE

Procedeul biotehologic de stimulare a creșterii cantității de biomasă de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 caracterizat prin aceea că, biomasă de microalgă *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 cultivată în mediul BG<sub>11</sub>, în sine cunoscut, pornind de la o D.O. de 660 nm de aproximativ 0,05 unitati, aflată în faza de creștere exponențială, este iradiată cu raze gama la 75 Gy, cu un debit de doză între 0,1 - 1,0 Gy/s, timp 1-10 minute, până când cultura algala ajunge prin creștere și multiplicare celulară până la o densitate optică (D.O.) la 660 nm de aproximativ 0,2 unități D.O. cultura astfel iradiată este apoi amestecată cu o cantitate de 150 - 230 ori mai mare de mediu cultură neiradiat și se menține în condiții de timp de 7 zile la presiunea atmosferică, cu temperatura de 30 °C și iluminare de 16.500 lux, în mediul barbotat permanent cu aer atmosferic.

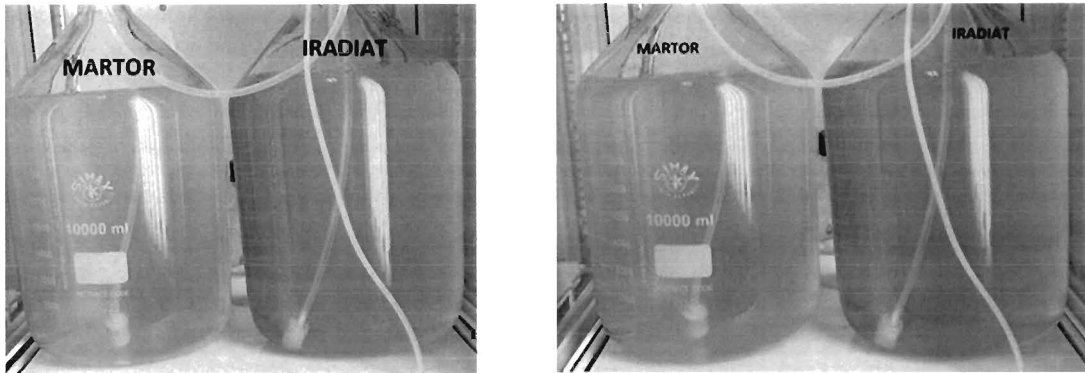


Fig. 1

	Lipide totale	Proteine	Caroteni totali	Clorofila a	Clorofila b
Martor neiradiat	100%	100%	100%	100%	100%
Proba iradiată 75 Gy	110,8	173,3	125,6	133,4	139,5

Fig. 2