



MD 3128 G2 2006.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3128** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)
C07F 15/02 (2006.01)
C07F 3/02 (2006.01)
C07C 53/16 (2006.01)
A61K 36/05 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2006 0042 (22) Data depozit: 2006.01.31	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2006.08.31, BOPI nr. 8/2006
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BULIMAGA Valentina, MD; RUDIC Valeriu, MD; ZOSIM Liliana, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; TURTĂ Constantin, MD; PRODIUS Denis, MD; ȘOVA Sergiu, MD; MEREACRE Valeriu, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) **Procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis***

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis*, care poate fi utilizată în industria farmaceutică, precum și în medicina clinică și experimentală.

Procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* include prepararea mediului nutritiv, care conține, g/L de apă: NaHCO₃ - 16,8; K₂HPO₄ - 1,0; KNO₃ - 3,75; NaCl - 1,0; K₂SO₄ - 3,75; CaCl₂·6H₂O - 0,04; MgSO₄·7H₂O - 0,70; H₃BO₃ - 0,00286; MnCl₂·4H₂O - 0,00181; ZnSO₄·7H₂O - 0,00022; CuSO₄·5H₂O - 0,00008; MoO₃ - 0,000015; FeSO₄·7H₂O - 0,024; Fe-EDTA - 0,025, inocularea

2
5 suspensiei de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 g/L și cultivarea ei în decurs de 6 zile în regim de acumulare la iluminarea de 3400...4800 lx, la temperatura de 31...36°C și pH de 9,5...10,0.

10 Noutatea invenției constă în aceea că în prima zi de cultivare în mediu se adaugă suplimentar compusul coordinativ [Fe₂Mg(CCl₃COO)₆(CH₃OH)₃] în cantitate de 0,005...0,025 g/L.

15 Revendicări: 1

MD 3128 G2 2006.08.31

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis*, care poate fi utilizată în industria farmaceutică, medicina clinică și experimentală.

Se știe că superoxiddismutaza (SOD) este o enzimă cu efect antioxidant, capabilă de a distruge radicalii liberi, protejând astfel organismul de acțiunea lor distrugătoare. De aceea este foarte actuală problema obținerii unor produse cu un conținut înalt de SOD, care ar putea fi utilizate atât ca supliment cu efect de lichidare a radicalilor liberi din organismul uman, cât și pentru obținerea unor preparate cu efect antioxidant și antiradicalic pentru profilaxia și combaterea cancerului, preîntâmpinarea îmbătrânirii pielii, protecția la iradiere etc.

Este cunoscut procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* în prezența citratului de Fe(III) și glicinatului de Mn(II) la realizarea căruia are loc majorarea activității SOD în biomasă. Dezavantajul constă în utilizarea compușilor în concentrații înalte – 60 și 40 mg/L, respectiv, ceea ce duce la diminuarea productivității spirulinei [1].

Mai este cunoscut procedeu de obținere a biomasei de spirulină [2] în care se utilizează mediul nutritiv modificat Zarrouk cu următoarea compoziție, g/L: NaHCO_3 – 16,8; K_2HPO_4 – 0,1; KNO_3 – 3,75; NaCl – 1,0; K_2SO_4 – 3,75; CaCl_2 – 0,04; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; H_3BO_3 – 0,00286; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,00181; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,00022; MoO_3 – 0,000015, ce conține $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,024; Fe-EDTA – 0,025 în calitate de sursă de Fe, apă – până la 1L; cultivarea are loc în regim de acumulare timp de 6 zile, iluminarea de 15...24 mii $\text{erg/cm}^2 \cdot \text{s}$, temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, pH-ul optim al mediului fiind 9,5...10,0.

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că mediul utilizat nu asigură o activitate suficient de înaltă a SOD în biomasa de spirulină.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de obținere a biomasei cianobacteriei de *Spirulina platensis* care ar asigura sporirea activității superoxiddismutazei în biomasa de spirulină.

Procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* include prepararea mediului nutritiv, care conține, g/L de apă: NaHCO_3 – 16,8; K_2HPO_4 – 1,0; KNO_3 – 3,75; NaCl – 1,0; K_2SO_4 – 3,75; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,04; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,70; H_3BO_3 – 0,00286; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,00181; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,00022; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,00008; MoO_3 – 0,000015, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,024; Fe-EDTA – 0,025, inocularea suspensiei de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 g/L și cultivarea ei în decurs de 6 zile în regim de acumulare la iluminarea de 3400...4800 lx, la temperatura de 31...36°C și pH de 9,5...10,0. În prima zi de cultivare în mediu se adaugă suplimentar compusul coordinativ $[\text{Fe}_2\text{Mg}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]$ în cantitate de 0,005...0,025 g/L.

Rezultatul invenției în comparație cu cea mai apropiată soluție constă în obținerea biomasei de spirulină cu o activitate a SOD de 2,2 mai sporită.

Rezultatul obținut se datorează faptului că compusul coordinativ utilizat $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]$ provoacă stresul oxidativ în celulele de spirulină; datorită componenței chimice a liganzilor din sfera internă, care sunt reprezentanți de câte 6 resturi de tricloracetat și 3 molecule de metanol. Nu poate fi exclus și aportul fierului în procesul de formare a radicalilor liberi, ceea ce poate contribui la creșterea activității SOD.

Sinteza complexului $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]$ trimetanol-hexakis S-N-tricloracetato(O,O?) - ?₃-oxo-difier (III)magneziu (II).

2,4 g (0,06 moli) NaOH s-au dizolvat în 7 ml de apă. La soluția obținută s-au adăugat 9,81 g (0,06 moli) CCl_3COOH . Aparte, în 30 ml apă s-au dizolvat 10,0 g (0,025 moli) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ și 26,8 g (0,125 moli) $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Soluțiile obținute s-au amestecat împreună. Amestecul obținut s-a încălzit timp de 2 ore la temperatura de $60 \pm 5^\circ\text{C}$ cu agitare permanentă. La răcirea soluției se sedimentează un praf cristalin de culoare roșie-violet. Sedimentul format s-a filtrat și s-a dizolvat în amestec de metanol, acetonitril și toluen în raport volumetric de 0,5 : 1,0 : 25,0 (ml). Soluția obținută a fost păstrată la aer pentru cristalizare.

Peste 2 zile s-au depus monocristale prismatice de culoare roșie, care au fost filtrate, spălate o dată cu metanol, apoi de trei ori cu toluen și uscate la aer. Randamentul după fier este de 4,55 g (57%). Substanța este bine solubilă în metanol, acetonitril, insolubilă în eter, toluen.

Pentru	C	H	Fe	Mg
$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Cl}_{18}\text{O}_{16}\text{Fe}_2\text{Mg}$				
găsit, %:	14,69	1,10	9,12	1,92
calculat, %:	14,74	0,99	9,14	1,99

Frecvențe analitice pentru liganzii carboxilici în spectrele IR sunt oscilațiile de valență ν_{as} și ν_{s} ale grupelor COO⁻. Pentru clusterul sintetizat aceste două benzi sunt prezente în regiunea 1580 cm^{-1} și 1450 cm^{-1} , respectiv, pentru oscilațiile asimetrice și simetrice ale grupei COO⁻.

MD 3128 G2 2006.08.31

4

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Se prepară mediul nutritiv cu următoarea compoziție, g/L: NaHCO_3 – 16,8, K_2HPO_4 – 0,1, KNO_3 – 3,75, NaCl – 1,0, K_2SO_4 – 3,75, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,04, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7, H_3BO_3 – 0,00286, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,00181, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,00022, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,00008, MoO_3 – 0,000015, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,024, Fe-EDTA – 0,025, apă – până la 1L. Se introduce suspensia de spirulină în cantitate de 0,4 g/L. În prima zi de cultivare la mediul nutritiv se adaugă $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]$ în cantitate de 0,025 g/L. Cultivarea se desfășoară timp de 6 zile, respectând parametrii: temperatura de 32°C, pH-ul – 8...9, iluminarea de 3600 lx, în primele 2 zile ale cultivării. Pentru următoarele zile ale cultivării se menține temperatura de 34°C, pH-ul 9,5...10, iluminarea 4800 lx.

La ziua a 6-a se determină activitatea SOD. Productivitatea spirulinei la ziua a șasea este de 1,86 g/L biomasă absolut uscată.

Activitatea SOD în biomasa de spirulină este de 2,2 ori mai sporită față de soluția cea mai apropiată.

Tabel

Activitatea SOD în biomasa de *Spirulina platensis* obținută conform procedurii propus în invenție și celui din soluția cea mai apropiată

Procedeu utilizat	Compusul	Concentrația, g/L	Activitatea SOD, unități convenționale	%
Conform celei mai apropiate soluții	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Fe-EDTA	0,024 0,025	0,42±0,24	100
Conform invenției	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Fe-EDTA $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3]$	0,024 0,025 0,025	1,29±0,13	222,3

MD 3128 G2 2006.08.31

5

(57) Revendicare:

- 5 Procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis*, care include prepararea mediului nutritiv, care
conține, g/L de apă: NaHCO_3 - 16,8; K_2HPO_4 - 1,0; KNO_3 - 3,75; NaCl - 1,0; K_2SO_4 - 3,75; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -
0,04; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,70; H_3BO_3 - 0,00286; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,00181; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,00022;
10 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,00008; MoO_3 - 0,000015; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,024; Fe-EDTA - 0,025, inocularea suspensiei
de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 g/L și cultivarea ei în decurs de 6 zile în regim de
acumulare la iluminarea de 3400...4800 lx, la temperatura de 31...36°C și pH de 9,5...10,0, **caracterizat**
10 **prin aceea că** în prima zi de cultivare în mediu se adaugă suplimentar compusul coordinativ
[$\text{Fe}_2\text{Mg}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{CH}_3\text{OH})_3$] în cantitate de 0,005...0,025 g/L.

15

(56) Referințe bibliografice:

1. Ефремова Н. Изучение влияния цитрата Fe (III) и комплексных соединений Mn (II) на содержание супероксиддисмутазы в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis*. Резюме работы. Конференция Международная а Тинерилор Cercetători, 11 noiembrie, 2005, p. 37
2. Rudic Valeriu. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău, Știința, 1993 p. 8-11

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2006 0042		
(22) Data depozit: 2006.01.31		
(51) : Int.Cl: <i>C12N 1/12</i> (2006.01) <i>C07F 15/02</i> (2006.01) <i>C07F 3/02</i> (2006.01) <i>C07C 53/16</i> (2006.01) <i>A61K 36/05</i> (2006.01) <i>C12N 9/02</i> (2006.01) <i>C12R 1/89</i> (2006.01) Titlul : Procedeu de obținere a biomasei de <i>Spirulina platensis</i> (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : <i>Spirulina platensis</i> , cultivarea, obținerea biomasei spirulinii		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.		
(MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nepublică”) MD 1993-2006; EA 1996-2006; SU-colecția BRTȘ		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	Ефремова Н. Изучение влияния цитрата Fe (III) и комплексных соединений Mn (II) на содержание супероксиддисмутазы в биомассе цианобактерий <i>Spirulina platensis</i> . Rezumatele lucrărilor. Conferența Internațională a Tinerilor Cercetători, 11 noiembrie, 2005, p. 37	
A	Rudic Valeriu. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău. Știința, 1993 p. 8-11	
A	SU 1662442 A1 1991.07.15	1
A	SU 1621823 A1 1991.01.23	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 de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența 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 determinarea datei 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 finalizării documentării		2006.06.07
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

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

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2006 0042		
(22) Data depozit: 2006.01.31		
(51) : Int.Cl: <i>C12N 1/12</i> (2006.01) <i>C07F 15/02</i> (2006.01) <i>C07F 3/02</i> (2006.01) <i>C07C 53/16</i> (2006.01) <i>A61K 36/05</i> (2006.01) <i>C12N 9/02</i> (2006.01) Titlul : Procedeu de obținere a biomasei de <i>Spirulina platensis</i> (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : cultivarea spirulinei, obținerea biomasei de <i>Spirulina platensis</i>		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.		
(MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nepublică”) MD 1993-2006; EA 1996-2006; SU-colecția BRTȘ		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	SU 1621823 A1 1988.03.15	1
A	SU 1662442 A1 1988.07.29	1
A	MD 2386 C2 2004.02.29	1
A	Ефремова Н. Изучение влияния цитрата Fe (III) и комплексных соединений Mn (II) на содержание супероксиддисмутазы в биомассе цианобактерии <i>Spirulina platensis</i> . Резюме работы. Конференция Международная а Тинерилор Cercetători, 11 noiembrie, 2005, p. 37	
A	Rudic Valeriu. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău, Știința, 1993 p. 8-11	
☐ 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 de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit 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 determinarea datei 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 finalizării documentării		

Examinatorul

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