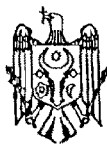




MD 4191 C1 2013.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4191** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int.Cl: *C09B 61/00* (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
B01D 11/00 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2012 0003 (22) Data depozit: 2011.12.14</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2012.12.31, BOPI nr. 12/2012</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BULIMAGA Valentina, MD; RUDIC Valeriu, MD; PISOV Maria, MD; DJUR Svetlana, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p>	

(54) **Procedeu de extragere a ficocianinei din biomasa algei *Spirulina platensis***

(57) Rezumat:

1
 Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de extragere a ficocianinei din biomasa algei *Spirulina platensis* pentru utilizare în calitate de colorant cu proprietăți antioxidante.

Procedeu, conform invenției, include: demineralizarea biomasei, suspendarea în apă

2
 5 distilată, dezagregarea celulelor prin congelare-decongelare în două repetiții, extragerea suspensiei la agitare cu o soluție alcoolică de
 10 10...20%, ce conține CaCl₂ în concentrație de 5...10 g/l și separarea extractului prin centrifugare.

Revendicări: 1

15

MD 4191 C1 2013.07.31

(54) Process for extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* alga biomass

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, in particular to a process for extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* alga biomass for use as a colorant with antioxidant properties.

The process, according to the invention, includes: demineralization of biomass, sus-

2
pension in distilled water, destruction of cells by double freezing-unfreezing, extraction of suspension by mixing with 10...20% alcohol solution, containing CaCl₂ in a concentration of 5...10 g/l and separation of the extract by centrifugation.

Claims: 1

(54) Способ экстракции фикоцианина из биомассы водоросли *Spirulina platensis*

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу экстракции фикоцианина из биомассы водоросли *Spirulina platensis* для использования в качестве красителя с антиоксидантными свойствами.

Способ, согласно изобретению, включает: деминерализацию биомассы, суспен-

2
зирование в дистиллированной воде, разрушение клеток путём 2-кратного замораживания-оттаивания, экстракцию суспензии перемешиванием с 10...20% спиртовым раствором, который содержит CaCl₂ в концентрации 5...10 г/л и разделение экстракта центрифугированием.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de extragere a ficocianinei din biomasa algei *Spirulina platensis* pentru utilizare în calitate de colorant cu proprietăți antioxidante.

5 Cererea crescândă de consum pentru aditivi alimentari și cosmetici, inclusiv coloranți naturali, necesită dezvoltarea eficientă a unor resurse naturale și renovabile. Printre resursele naturale înalt eficiente, cianobacteria *Spirulina platensis* este explorată pe larg în ultimii ani în calitate de producător de ficobiliproteine, în special de ficocianină. Ficocianina este utilizată în calitate de colorant alimentar la prepararea unor astfel de produse ca gumele de mestecat, gelurile, înghețata, produsele lactate, precum și în cosmetică, în calitate de colorant și ca agent de tratare a bolilor de piele. Nu mai puțin importante sunt și rezultatele studiilor care confirmă capacitatea antioxidantă, anti-bacteriană, anticancerigenă, efectele antiinflamatorii, neuroprotective și hepatoprotective ale ficocianinei. Obținerea și utilizarea ficocianinei în calitate de colorant cu proprietăți antiradicalice sunt limitate din cauza cheltuielilor mari de producere, fiind impusă necesitatea elaborării unor procedee mai simple și eficiente de extragere și separare a acestui pigment.

Este cunoscut un procedeu de extragere a ficocianinei din biomasa de spirulină care include următoarele etape: suspendarea biomasei algale (2...12 g/l) în soluție de 10 g/l CaCl₂ și distrugerea pereților celulari cu adăugarea unor bile de sticlă cu diametrul de 0,8...1,0 mm, agitarea la viteza de 1500 rot/min și extragerea ficocianinei în sistemul de două faze apoase prin adăugarea polietilenglicolului (PEG) 1450 și fosfatului de potasiu în concentrații finale de 7 și 20%, respectiv, ajustarea pH-ului cu acid fosforic până la valoarea de 6,5, urmată de centrifugarea și separarea fazelor. Procedul permite obținerea ficocianinei cu puritatea (A620/A280) egală cu 1,7 cu un randament de 7...14,4%, recalculat la biomasa uscată [1].

Dezavantajul procedurii constă în puritatea joasă (A620/A280 = 1,3...1,7), randamentul scăzut (7...14,4%) al ficocianinei, precum și instabilitatea ei la păstrare în soluție de CaCl₂.

30 Soluția cea mai apropiată de obiectul revendicat reprezintă procedul de extracție a ficocianinei din biomasa de spirulină care include următoarele etape: demineralizarea, suspendarea în apă, agitarea, congelarea-decongelarea în 2 repetiții cu scopul distrucției pereților celulari, centrifugarea și extracția sedimentului prin utilizarea soluției etanolice [2].

35 Dezavantajul procedurii constă în obținerea unor indicatori mici ai purității, randamentului și duratei de păstrare a ficocianinei la întuneric.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de extragere a ficocianinei din biomasa de spirulină, care să permită micșorarea duratei procesului și asigurarea unei purități și a unui randament înalt, precum și stabilitatea de lungă durată a ficocianinei la păstrare în condiții de întuneric la temperaturile de 0...4°C și 10...15°C.

45 Esența invenției constă în faptul că se propune un procedeu de extragere a ficocianinei din biomasa algei *Spirulina platensis* care include etapele: separarea biomasei de lichidul cultural, suspendarea biomasei în soluție, dezagregarea celulelor și extragerea ficocianinei la agitarea suspensiei, urmată de separarea extractului prin centrifugare, totodată biomasa, înainte de extragere, este demineralizată și trecută în suspensie apoasă, după care urmează dezagregarea celulelor prin congelare-decongelare și extragerea ficocianinei cu soluție alcoolică de 10%...20%, ce conține CaCl₂ în concentrație de 5...10 g/l.

50 Rezultatul tehnic obținut constă în majorarea purității ficocianinei extrase de 1,7...2,4 ori, a randamentului de 1,6...3,2 ori (în comparație cu soluția cea mai apropiată), precum și a duratei de păstrare la întuneric până la 30 și 185 zile la temperaturile de 10...15°C și 0...4°C, respectiv, și se datorează extragerii selective și complete a ficocianinei în cazul utilizării în calitate de extragenți a CaCl₂ și a soluției alcoolice, care posedă și efect sinergic de conservare.

55

*Exemple de realizare a invenției**Exemplul 1*

Biomasa de spirulină cultivată în decurs de 12 zile se separă de lichidul cultural prin filtrare, se spală consecutiv cu soluție de 1,5% acetat de amoniu și apă distilată în raport de 1:1, se suspendă în apă distilată (20mg/ml) și se supune congelării-decongelării de 2 ori. La suspensie se adaugă 3 volume de soluție alcoolică de 13,3%, ce conține 10 g/l CaCl₂ și se agită periodic în decurs de 45 min. Se centrifughează la 6 mii rot/min timp de 20 min și se examinează supernatantul obținut. Se măsoară absorbanta la 620, 650 și 280 nm. Se determină puritatea ficocianinei prin raportul A620/A280. Cantitatea de ficocianină (mg/ml) se determină după formula: $(A_{620}-0,474A_{650})/5,34$, iar randamentul, în %, prin recalculare la biomasa uscată.

Exemplul 2

Biomasa de spirulină cultivată în decurs de 12 zile se separă de lichidul cultural prin filtrare, se spală consecutiv cu soluție de 1,5% acetat de amoniu și apă distilată în raport de 1:1, se suspendă în apă distilată (20mg/ml) și se supune congelării-decongelării de 2 ori. La suspensie se adaugă 2 volume de soluție alcoolică de 15%, ce conține 10 g/l CaCl₂ și se agită în decurs de 45 min. Se centrifughează la 6 mii rot/min timp de 20 min și se examinează supernatantul obținut. Se măsoară absorbanta la 620, 650 și 280 nm. Se determină puritatea ficocianinei prin raportul A620/A280. Cantitatea de ficocianină (mg/ml) se determină după formula: $(A_{620}-0,474A_{650})/5,34$, iar randamentul, în %, prin recalculare la biomasa uscată.

Exemplul 3

Biomasa de spirulină cultivată în decurs de 12 zile se separă de lichidul cultural prin filtrare, se spală consecutiv cu soluție de 1,5% acetat de amoniu și apă distilată în raport de 1:1, se suspendă în apă distilată (20mg/ml) și se supune congelării-decongelării de 2 ori. La suspensie se adaugă 1 volum de soluție alcoolică de 20%, ce conține 10 g/l CaCl₂ și se agită în decurs de 45 min. Se centrifughează la 6 mii rot/min timp de 20 min și se examinează supernatantul obținut. Se măsoară absorbanta la 620, 650 și 280 nm. Se determină puritatea ficocianinei prin raportul A620/A280. Cantitatea de ficocianină (mg/ml) se determină după formula: $(A_{620}-0,474A_{650})/5,34$, iar randamentul, în %, prin recalculare la biomasa uscată.

Totodată, a fost extrasă ficocianina din biomasa *Spirulina platensis* conform celei mai apropiate soluții.

Exemplul 1

Biomasa de *Spirulina platensis*, cultivată în decurs de 12 zile, este separată de lichidul cultural și suspendată în soluție de 10 g/l CaCl₂ (2 g/l), după care se efectuează distrugerea pereților celulari cu adăugarea unor bile de sticlă cu diametrul de 0,8...1,0 mm, agitarea la viteza de 1500 rot/min și extragerea ficocianinei în sistemul de 2 faze apoase prin adăugarea polietilenglicolului (PEG) 1450 și a fosfatului de potasiu în concentrații finale de 7 și 20%, respectiv, ajustarea pH-ului cu acid fosforic până la valoarea 6,5, urmată de centrifugare și separarea fazelor. Procedul permite obținerea ficocianinei cu puritatea (A620/A280) egală cu 1,35 și un randament de 15,4%, recalculat la biomasa uscată.

Exemplul 2

Biomasa de *Spirulina platensis*, cultivată în decurs de 12 zile, este separată de lichidul cultural și suspendată în soluție de 10 g/l CaCl₂ (6 g/l), după care se efectuează distrugerea pereților celulari cu adăugarea unor bile de sticlă cu diametrul de 0,8...1,0 mm, agitarea la viteza de 1500 rot/min și extragerea ficocianinei în sistemul de 2 faze apoase prin adăugarea polietilenglicolului (PEG) 1450 și a fosfatului de potasiu în concentrații finale de 7 și 20%, respectiv, ajustarea pH-ului cu acid fosforic până la valoarea de 6,5, urmată de centrifugare și separarea fazelor. Procedul permite obținerea ficocianinei cu puritatea (A620/A280) egală cu 1,38 și un randament de 8,7%, recalculat la biomasa uscată.

Exemplul 3

Biomasa de *Spirulina platensis*, cultivată în decurs de 12 zile, este separată de lichidul cultural și suspendată în soluție de 10 g/l CaCl₂ (12 g/l), după care se efectuează distrugerea pereților celulari cu adăugarea unor bile de sticlă cu diametrul de 0,8...1,0 mm, agitarea la viteza de 1500 rot/min și extragerea ficocianinei în sistemul de 2 faze apoase prin adăugarea polietilenglicolului (PEG) 1450 și a fosfatului de potasiu în concentrații finale de 7 și 20%, respectiv, ajustarea pH-ului cu acid fosforic până la valoarea 6,5, urmată de

centrifugare și separarea fazelor. Procedul permite obținerea ficocianinei cu puritatea (A620/A280) egală cu 1,75 și un randament de 8%, recalculat la biomasa uscată.

Rezultatele obținute privind puritatea și randamentul ficocianinei extrase din biomasa de spirulină sunt prezentate în tabel.

5

Puritatea și randamentul ficocianinei extrase din biomasa de spirulină

Procedul utilizat	Concentrația biomasei, g/l	Puritatea ficocianinei, A620/A280	Randamentul ficocianinei, %	Durata de păstrare la întuneric, zile	
				0...4°C	10...15°C
Conform celei mai apropiate soluții	2,0	1,35	15,4	7	2
	6,0	1,38	8,7	7	2
	12,0	1,75	8,0	7	2
Conform soluției propuse în invenție	5,0	3,17	24,8	185	30
	6,7	2,98	25,0	185	30
	10,0	2,90	25,9	185	30

10 Astfel, în comparație cu cea mai apropiată soluție, rezultatele obținute conform invenției demonstrează majorarea purității ficocianinei extrase de 1,7...2,4 ori, a randamentului de 1,6...3,2 ori, precum și a duratei de păstrare la întuneric până la 30 și 185 zile la temperaturile de 10...15°C și 0...4°C, respectiv.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Cisneros M., Rito-Palomares M. A simplified strategy for the release and primary recovery of C-phycoerythrin produced by *Spirulina maxima*. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2004, vol. 18, nr. 4, p. 385-390
2. CN 101607988 A 2009.12.23

(57) Revendicări:

Procedul de extragere a ficocianinei din biomasa algei *Spirulina platensis* care constă în aceea că biomasa se demineralizează, se suspendă în apă distilată, se dezagreghează celulele prin congelare-decongelare în două repetiții, se extrage suspensia la agitare cu o soluție alcoolică de 10...20%, ce conține CaCl₂ în concentrație de 5...10 g/l, după care extractul se separă prin centrifugare.

Șef Secție:	IUSTIN Viorel
Examinator:	LUPAȘCU Lucian
Redactor:	LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii	
(21) Nr. depozit: a 2012 0003	
(22) Data depozit: 2011.12.14	
(54) Titlul: Procedeu de extragere a ficocianinei din biomasa algei <i>Spirulina platensis</i>	
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(51) (Int.Cl): Int.Cl: C09B 61/00 (2006.01) C12N 1/12 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01) B01D 11/00 (2006.01)	
II. Condiții de unitate a invenției:	<input checked="" type="checkbox"/> satisface <input type="checkbox"/> nu satisface
Note:	
III.Revendicări: claritatea, susținerea de descriere	<input checked="" type="checkbox"/> satisface <input type="checkbox"/> nu satisface
Note:	
IV. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)	
<p>MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): “spirulina”, “procedeu spirulina”, “ficocianina obținere”, “spirulina demineralizare”, “spirulina congelare-decongelare”, “spirulina extragere alcoolică”, “ficocianină clorura de calciu” Int.Cl. : C09B 61/00, C12N1/12, C12P 21/00, B01D 11/00</p> <p>"Worldwide" (Espacenet) : “spirulina”, “method spirulina”, “phycocyanin obtaining”, “spirulina demineralization”, “spirulina freeze-thawing”, “spirulina alcoholic extract”, “phycocyanin calcium chloride” Int.Cl. : C09B 61/00, C12N1/12, C12P 21/00, B01D 11/00</p> <p>EA, CIS (Earpatis) : “спирулин”, “способ спирулин”, “получение фикоцианина”, “спирулин деминерализация”, “спирулин замораживание-оттаивание”, “спирулин спиртовой экстракт”, “ фикоцианин хлористый кальций” Int.Cl. : C09B 61/00, C12N1/12, C12P 21/00, B01D 11/00</p> <p>SU (nonpublic) : “спирулин”, “способ спирулин”, “получение фикоцианина”, “спирулин деминерализация”, “спирулин замораживание-оттаивание”, “спирулин спиртовой экстракт”, “фикоцианин хлористый кальций” Int.Cl. : C09B 61/00, C12N1/12, C12P 21/00, B01D 11/00</p> <p>RO-Patent : “spirulina”, “procedeu spirulina”, “ficocianina obținere”, “spirulina demineralizare”, “spirulina congelare-decongelare”, “spirulina extragere alcoolică”, “ficocianină clorura de calciu” Int.Cl. : C09B 61/00, C12N1/12, C12P 21/00, B01D 11/00</p>	

V. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

<http://healthbenefitsofspirulina.com/>
<http://www.benefitsofspirulina.com/>
www.algbiotek.com
www.cyanopros.com
www.ncbi.nlm.nih.gov
www.spirulinasource.com
www.algaecollection.com
www.scirus.com
www.phycox.com
www.sciencedirect.com

Ganapathi P., S. Chethana A., Sridevi K. Method to obtain C-phycoyanin of high purity. Journal of Chromatography A, 2006, Volume 1127, Issues 1– 2, p. 76– 81.

Silveira ST, Quines LK, Burkert CA, Kalil SJ. Separation of phycoyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. Bioprocess Biosyst Eng., 2008 Aug;31(5):477-482.

Patil G, Chethana S, Sridevi AS, Raghavarao KS. Method to obtain C-phycoyanin of high purity. J Chromatogr A., 2006, 1127(1-2):76-81.

Boussiba S., Richmond A. Isolation and characterization of phycoyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. Arch. Microbiol., 1979, 120, p. 155-159

Abalde J., Betancourt L., Torres E., Cid A., Barwell C. Purification and characterization of phycoyanin from marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. Plant Science, 1998, Vol.136, Issue 1, p.109-120

Valderrama J., Perrut M., Majewski W. Extraction of Astaxantine and Phycoyanine from Microalga with Superficial Carbon Dioxide. J. Chem.Eng, 2003, 48(4), p.827-830

Cisneros M., Rito-Palomares M. A Simplified Strategy for the Release and Primary Recovery of c-phycoyanin Produced by *Spirulina maxima*. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2004, vol.18, nr. 4, p. 385-390

Pusri J. Extraction of Phycoyanin from *Spirulina* for food grade. Thesys-Master of Science in Biotechnology, 1995

Prabuthas P., Majumdar S., Srivastav P. P. and Mishra H. N. Standardization of rapid and economical method for nutraceuticals extraction from algae. Journal of Stored Products and Postharvest Research, 2011, vol. 2(5), p. 93 – 96

VI. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 1008 G2 1998.08.31	1
A	CN 101003565 A 2007.07.25	1
A	CN 1958598 A 2007.05.09	1
A	JP 20066230272 A 2006.09.07	1
A	CN 1563083 A 2005.01.12	1
A	CN 1417227 A 2003.05.14	1

A	CN 1291616 A 2001.04.18	1
A	CN 1295080 A 2001.05.16	1
A	JP 7046993 A 1995.02.21	1
A	CN 101891809 A 2010.11.24	1
A	JP 1123865 A 1989.05.16	1
A	MD 3781 G2 2008.12.31	1
A	Cisneros M., Rito-Palomares M. A simplified strategy for the release and primary recovery of C-phycoerythrin produced by <i>Spirulina maxima</i> . <i>Chemical and Biochemical Engineering Quarterly</i> , 2004, vol. 18, nr. 4, p. 385-390	1
A	Valderama J., Perrut M., Majewski W. Extraction of Astaxanthin and Phycocyanin from Microalgae with Superficial Carbon Dioxide. <i>J. Chem. Eng.</i> , 2003, 48(4), p. 827-830	1
A	Pusri J. Extraction of Phycocyanin from <i>Spirulina</i> for food grade. <i>Thesys-Master of Science in Biotechnology</i> , 1995	1
A	Prabuthas P., Majumdar S., Srivastav P., Mishra H. Standardization of rapid and economical method for nutraceuticals extraction from algae. <i>Journal of Stored Products and Postharvest Research</i> , 2011, vol. 2(5), p. 93-96	1
A, D, C	CN 101607988 A 2009.12.23	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

2012.10.03

Examinator

LUPAȘCU Lucian