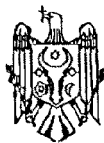




MD 4360 B1 2015.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4360** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12P 23/00* (2006.01)
B01D 11/00 (2006.01)
A61K 36/02 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In 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 2013 0066 (22) Data depozit: 2013.09.23 (41) Data publicării cererii: 2015.05.31, BOPI nr. 5/2015	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.07.31, BOPI nr. 7/2015
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BULIMAGA Valentina, MD; RUDIC Valeriu, MD; PISOV Maria, MD; DENCICOV Lidia, MD; GONȚA Maria, MD; DUCA Gheorghe, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de obținere a mixoxantofilei din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de obținere a pigmentului carotenoidic mixoxantofila din biomasa de *Spirulina platensis* pentru utilizare în industria alimentară sau în medicină.

Conform invenției, procedeul constă în aceea că se efectuează extragerea repetată a mixoxantofilei din biomasa cu soluție hidroetanolică de 70...96% cu separarea biomasei prin centrifugare și unificarea extractelor obținute, la care se adaugă hidroxid

2
de kalium de 40%, în raport de 3:1 față de cantitatea de biomasă supusă extracției, se menține 4...6 ore și se adaugă hexan, după care prin decantare se separă fracția etanolică cu conținut de mixoxantofilă, care se diluează cu apă până la concentrația alcoolului etilic de 45...50%, se centrifughează la 6000 rot/min, iar cristalele obținute se spală cu soluție de etanol de 45...50% și se usucă.

Revendicări: 1

MD 4360 B1 2015.07.31

(54) Process for producing myxoxanthophyll from *Spirulina platensis* cyanobacterium biomass

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, particularly to a process for producing the myxoxanthophyll carotenoid pigment from *Spirulina platensis* biomass for use in the food industry or medicine.

According to the invention, the process consists in that it is carried out re-extraction of myxoxanthophyll from the biomass with 70...96% water-ethanol solution with separation of biomass by centrifugation and unification of produced extracts, to which is added 40% potassium hydroxide in a ratio of

2
3:1 to the amount of the extracted biomass, is maintained for 4...6 hours and is added hexane, afterwards by decantation is separated the myxoxanthophyll-containing ethyl fraction, which is diluted with water to the ethyl alcohol concentration of 45...50%, is centrifuged at 6000 rev/min, and the resulting crystals are washed with 45...50% ethanol solution and dried.

Claims: 1

(54) Способ получения миксоксантофилла из биомассы *Spirulina platensis*

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу получения каротиноидного пигмента миксоксантофилла из биомассы *Spirulina platensis* для использования в пищевой промышленности или в медицине.

Согласно изобретению, способ состоит в том что осуществляют повторную экстракцию миксоксантофилла из биомассы 70...96%-ным водноэтанольным раствором с отделением биомассы центрифугированием и унифицированием полученных экстрактов, к которым добавляют 40%-ный гидроксид калия, в

2
соотношении 3:1 к количеству экстрагированной биомассы, выдерживают 4...6 часов и добавляют гексан, после чего путём декантирования отделяют этиловую фракцию с содержанием миксоксантофилла, которую разбавляют водой до концентрации этилового спирта 45...50%, центрифугируют при 6000 об/мин, а полученные кристаллы промывают раствором 45...50%-ного этанола и высушивают.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de obținere a pigmentului carotenoidic mixoxantofilă din biomasă de *Spirulina platensis* pentru utilizare în industria alimentară sau în medicină.

Mixoxantofilă este un carotenoid glicozidic. Interesul sporit față de carotenoizi, inclusiv față de mixoxantofilă, este legat de capacitatea lor antioxidantă, ceea ce pune în fața cercetătorilor sarcina de a elabora tehnologii de separare și purificare a carotenoizilor pentru producerea lor în cantități industriale.

Este cunoscut un procedeu de obținere a mixoxantofilei din biomasa cianobacteriei *Synechocystis* PCC 680, care include următoarele etape: separarea în faza staționară (în a 4-a zi de cultivare) a biomasei de lichidul de cultură prin centrifugare, obținerea extractului de mixoxantofilă prin adăugarea acetonei de 50% într-un mojar cu bile de sticlă, centrifugarea și eliminarea precipitatului. În supernatantul portocaliu se conțin 95% din conținutul total de mixoxantofilă și doar cantități mici de alți pigmenți. Purificarea ulterioară se efectuează supunând extractul acetonic obținut la extracție ulterioară în faza lichid-lichid în conformitate cu următoarele proporții (volumul total de aproximativ 1 litru): extract de mixoxantofilă - 1 parte, 1 parte acetonă, 1 parte de hexan + 1 parte de apă, se toarnă treptat una după alta într-o pâlnie și se agită, după care se adaugă 10 g NaCl. La etapa ulterioară de separare, mixoxantofila se află în faza hexanică. Extractul hexanic este evaporat într-un evaporator rotativ la 25°C în întuneric, în decurs de 30 min. Precipitatul de mixoxantofilă se usucă. Purificarea ulterioară se efectuează prin cromatografie preparativă cu faze inverse pe coloană de Biocard (250 x 25 mm) la presiunea de 10...15 bar. Pentru separarea și eluția pigmentului de mixoxantofilă se utilizează soluțiile A și B cu concentrația inițială în raport de 80:20 și cea finală de 0:100. Soluția A: amestec de acetonă-metanol cu 10% soluție tampon fosfat, soluția B - etilacetat. Detectia pigmentilor se efectuează la 405 nm. Se recomandă utilizarea mixoxantofilei sau echinenonei pentru tratamentul profilactic și/sau terapeutic în condiții determinate sau favorizate de procese oxidative la oameni și animale [1].

Dezavantajele acestui procedeu constau în utilizarea unor solvenți toxici ca acetona și metanolul, precum și purificarea suplimentară pe coloană de Biocard, ceea ce mărește costul și diminuează randamentul.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de obținere a mixoxantofilei din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*, care asigură excluderea unor astfel de solvenți toxici ca acetona și metanolul, majorarea randamentului și obținerea mixoxantofilei în formă de cristale cu o puritate înaltă.

Esența invenției constă în faptul că se efectuează extragerea repetată a mixoxantofilei din biomasă cu soluție hidroetanolică de 70...96% cu separarea biomasei prin centrifugare și unificarea extractelor obținute, la care se adaugă hidroxid de kalium de 40%, în raport de 3:1 față de cantitatea de biomasă supusă extracției, se menține 4...6 ore și se adaugă hexan, după care prin decantare se separă fracția etanolică cu conținut de mixoxantofilă, care se diluează cu apă până la concentrația alcoolului etilic de 45...50%, se centrifughează la 6000 rot/min, iar cristalele obținute se spală cu soluție de etanol de 45...50% și se usucă.

Rezultatul tehnic obținut constă în utilizarea alcoolului etilic în calitate de extragent al mixoxantofilei și excluderea unor astfel de solvenți volatili și toxici ca acetona și metanolul, ceea ce facilitează etapele ulterioare de purificare (saponificarea și precipitarea mixoxantofilei prin diminuarea concentrației alcoolului la valorile de 45...50%) și asigură obținerea mixoxantofilei sub formă de cristale, ce determină o puritate înaltă (99,9%) și un randament de 99,0%.

Rezultatul tehnic obținut se datorează insolubilității mixoxantofilei în soluții alcoolice de 45...50%, ceea ce reprezintă o noutate și permite separarea ei de alți pigmenți, care rămân în soluție.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

5 g de biomasă de spirulina se suspendă în 25 ml de apă purificată și 175 ml de alcool etilic de 80% și se agită în decurs de 60 min. Se centrifughează la 6000 rot/min pentru a separa extractul de restul de biomasă, la care se adaugă 100 ml alcool etilic de 70% și se agită timp de 30 min pentru extracția repetată a pigmentilor. La extractele reunite se

- 5 adaugă 15 ml KOH de 40%, se lasă pentru 4...6 ore pentru saponificare, apoi se adaugă 100 ml hexan pentru înlăturarea beta-carotenului și a fracției lipidice. În pâlnia de decantare se separă fracția de clorofilă saponificată, apoi fracția etanolică ce conține mixoxantofilă se diluează cu apă până la atingerea concentrației alcoolului de 50%, după care se supune centrifugării la 6000 rot/min. Cristalele obținute se spală cu soluție de C_2H_5OH de 50% și se usucă.

Exemplul 2

- 10 10 g de biomasă de spirulină se suspendă în 75 ml de apă purificată și 200 ml de alcool etilic de 96% și se agită în decurs de 60 min. Se centrifughează la 6000 rot/min și se separă extractul de restul de biomasă. La precipitatul obținut se adaugă 140 ml alcool etilic de 96% și se agită timp de 30 min pentru extracția repetată a pigmentilor. La extractele reunite se adaugă 30 ml de KOH de 40%, se lasă pe 4...6 ore pentru saponificare, apoi se mai adaugă 100 ml hexan pentru înlăturarea carotenoizilor și a fracției lipidice și se agită.
- 15 În pâlnia de decantare se separă fracția de clorofilă saponificată, apoi fracția etanolică ce conține mixoxantofilă se diluează cu apă până la atingerea concentrației alcoolului de 45%, după care se supune centrifugării la 6000 rot/min. Cristalele obținute se spală cu soluție de C_2H_5OH de 45% și se usucă.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. WO 2002024183 A1 2002.03.28

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a mixoxantofilei din biomasă de *Spirulina platensis*, care constă în aceea că se efectuează extragerea repetată a mixoxantofilei din biomasă cu soluție hidroetanolică de 70...96% cu separarea biomasei prin centrifugare și unificarea extractelor obținute, la care se adaugă hidroxid de kalium de 40%, în raport de 3:1 față de cantitatea de biomasă supusă extracției, se menține 4...6 ore și se adaugă hexan, după care prin decantare se separă fracția etanolică cu conținut de mixoxantofilă, care se diluează cu apă până la concentrația alcoolului etilic de 45...50%, se centrifughează la 6000 rot/min, iar cristalele obținute se spală cu soluție de etanol de 45...50% și se usucă.

Șef Secție Examinare:

GROSU Petru

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2013 0066

(22) Data depozit: 2013.09.23

(71) Solicitant: **UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD**

(54) **Titlul: Procedeu de obținere a mixoxantofiei din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis***

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C12P 23/00* (2006.01)
B01D 11/00 (2006.01)
A61K 36/02 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): “alge”, “mixoxantofila”, “alge carotenoizi”

Int. Cl : *C12P 23/00* (2006.01), *B01D 11/00* (2006.01), *A61K 36/02* (2006.01), *C12N 1/12* (2006.01)

"Worldwide" (Espacenet): “mixoxantophyll”, “algae carotenoids”, “algae pigments”

Int. Cl : *C12P 23/00* (2006.01), *B01D 11/00* (2006.01), *A61K 36/02* (2006.01), *C12N 1/12* (2006.01)

EA, CIS (Eapatis): “водоросли пигменты”, “водоросли каротеноиды”, “миксоксантофилл”

Int. Cl : *C12P 23/00* (2006.01), *B01D 11/00* (2006.01), *A61K 36/02* (2006.01), *C12N 1/12* (2006.01)

SU (nonpublic): “водоросли пигменты”, “водоросли каротеноиды”, “миксоксантофилл”

Int. Cl : *C12P 23/00* (2006.01), *B01D 11/00* (2006.01), *A61K 36/02* (2006.01), *C12N 1/12* (2006.01)

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

Hatem E. Mohamed, Allison M. L. van de Meene, Robert W. Roberson, and Wim F. J. Vermaas.
 Myxoxanthophyll Is Required for Normal Cell Wall Structure and Thylakoid Organization in the
 Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 J. Bacteriol., 2005, 187(20),p. 6883–6892.

<http://www.chem21.info/info/191123/>

<http://medbiol.ru/medbiol/botanica/001458ef.htm>

<http://www.biofine.ru/bfins-1050-3.html>

V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 130 Z 2010.12.31	1
A	MD 163 C2 1995.06.23	1
A	MD 167 Z 2010.11.30	1
A	MD 228 Z 2011.02.28	1
A	MD 2386 C2 2004.11.30	1
A	MD 2409 C2 2004.11.30	1
A	MD 3129 G2 2007.04.30	1
A	MD 4191 C1 2013.07.31	1
A	KR 20120137091 A 2012.12.20	1
A	KR 20120137086 A 2012.12.20	1
A	KR 20120137085 A 2012.12.20	1
A	RU 2456814 C1 2012.07.27	1
A	WO 2011052635 A1 2011.05.05	1
A	US 2009035835 A1 2009.02.05	1
A	US 2004228875 A1 2004.11.18	1
A	US 6579714 B1 2003.06.17	1
A	UA 24468 U 2007.07.10	1
A	UA 16270 U 2005.11.15	1
A	KR 20040047486 A 2004.06.05	1
A	JP 2005295829 A 2005.10.27	1
A	RU 2320195 C1 2008.03.27	1
A, D, C	WO 2002024183 A1 2002.03.28	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 evidența 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		30.04.2015
Examinator		LUPAȘCU Lucian