



MD 3129 G2 2006.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3129** (13) **G2**

(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)
C07F 15/02 (2006.01)
C07F 3/02 (2006.01)
C07C 53/134 (2006.01)
A61K 36/05 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2006 0043 (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; MELNIC Silvia, MD; MEREACRE Valeriu, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

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

(57) Rezumat:

1 Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de obținere a biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* și poate fi aplicată în industria farmaceutică, medicina clinică și experimentală.

Procedeul, conform invenției, include inocularea cianobacteriei în cantitate de 0,40...0,45 g/L într-un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaHCO₃ – 16,8, K₂HPO₄ – 0,1, KNO₃ – 3,75, NaCl – 1,0, K₂SO₄ – 3,75, CaCl₂·6H₂O – 0,04, MgSO₄·7H₂O – 0,7, H₃BO₃ – 0,00286, MnCl₂·4H₂O – 0,00181, ZnSO₄·7H₂O – 0,00022, CuSO₄·5H₂O – 0,00008,

2
5 MoO₃ – 0,000015, FeSO₄·7H₂O – 0,024, Fe-EDTA – 0,025, apă – până la 1 L, la care în prima zi de cultivare se adaugă compusul coordinativ [Fe₂MgO(C₄H₃OCOO)₃(CH₃COO)₃(H₂O)(C₄H₈O)] în cantitate de 0,005...0,025 g/L, și cultivarea ei în regim de acumulare în decurs de 6 zile la iluminarea de 3400...4800 lx, temperatura de 31...36°C, pH 9,5...10,0.

10 Rezultatul constă în sporirea activității super-oxidismutazei în biomasa obținută.

15 Revendicări: 1

MD 3129 G2 2006.08.31

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* și poate fi aplicată 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 conținut înalt de SOD, care ar putea fi utilizate atât ca supliment alimentar 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 procedeul de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* în prezența citratului de Fe(III) și glicinatului de Mn(II). Rezultatul obținut constă în sporirea 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 procedeul de obținere a biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* în care se utilizează mediul nutritiv modificat Zarrouk cu următoarea compoziție, g/L: NaHCO₃ – 16,8, K₂HPO₄ – 0,1, KNO₃ – 3,75, NaCl – 1,0, K₂SO₄ – 3,75, CaCl₂ · 6H₂O – 0,04, MgSO₄ · 7H₂O – 0,7, 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, apă – până la 1L, cultivarea are loc în regim de acumulare timp de 6 zile, la iluminarea de 15...24 mii erg/cm² și temperatura de 35 ± 1° C, pH-ul optim al mediului fiind 9,5...10,0 [2].

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 *Spirulina platensis* care ar asigura sporirea activității superoxiddismutazei în biomasa de spirulină.

Procedeul de obținere a biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* include inocularea cianobacteriei în cantitate de 0,40...0,45 g/L într-un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaHCO₃ – 16,8, K₂HPO₄ – 0,1, KNO₃ – 3,75, NaCl – 1,0, K₂SO₄ – 3,75, CaCl₂ · 6H₂O – 0,04, MgSO₄ · 7H₂O – 0,7, 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, apă – până la 1 L, la care în prima zi de cultivare se adaugă compusul coordinativ [Fe₂MgO(C₄H₃OCOO)₃(CH₃COO)₃(H₂O)(C₄H₈O)] în cantitate de 0,005...0,025 g/L și cultivarea ei în regim de acumulare în decurs de 6 zile la o iluminare de 3400...4800 lx, temperatura de 31...36° C, pH 9,5...10,0.

Rezultatul obținut în comparație cu cea mai apropiată soluție constă în obținerea biomasei de spirulină cu o activitate a superoxiddismutazei de 4,75 ori mai sporită.

Rezultatul obținut se datorează faptului că compusul coordinativ utilizat [Fe₂MgO(C₄H₃OCOO)₃(CH₃COO)₃(H₂O)(C₄H₈O)] provoacă stresul oxidativ, având în sfera internă liganzii care sunt reprezentați de câte 3 resturi de furoat, 3 resturi de acetat, o moleculă de tetrahidrofuran și apă. Nu poate fi exclusă nici contribuția fierului în procesul de formare a radicalilor liberi, ceea ce duce la activizarea mecanismului de protejare a celulei algale, exprimat prin creșterea activității SOD.

Sinteza compusului coordinativ [Fe₂MgO(CH₃COO)₃(C₄H₃OCOO)₃(C₄H₈O)(H₂O)].

Amestecul din 0,818 g (2,02 mmol) Fe(NO₃)₃ · 9H₂O, 1,07 g (5,00 mmol) Mg(CH₃COO)₂ · 4H₂O și 0,815 g (5,99 mmol) NaCH₃COO · 3H₂O în 30 ml de apă la temperatura camerei produce [Fe₂MgO(CH₃COO)₆(H₂O)₃]. La interacțiunea acestor precursori cu cantități echimolare (1 : 6) de acid piromucic (C₄H₃OCOOH) în 35 ml de tetrahidrofuran (reflux, timp de 5 ore) se obține o soluție de culoare roșie a compusului titular. După răcirea soluției a fost obținut un produs cristalin. Produsul a fost filtrat, spălat de câteva ori cu etanol și uscat la aer. Randamentul după fier este de 0,275 g (17%). Substanța este bine solubilă în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, puțin solubilă în tetrahidrofuran, insolubilă în eter, toluen, apă, metanol, cloroform.

Pentru	C	H	Fe	Mg
C ₂₅ H ₂₈ Cl ₁₈ Fe ₂ Mg				
Găsit, %	40,2	3,64	14,72	3,13
Calculat, %	39,90	3,75	14,84	3,23

MD 3129 G2 2006.08.31

4

5 Spectrul de rezonanță gama (Mossbauer) a compusului titular la temperatura de 80K reprezintă un singur dublet cu vârfuri puțin asimetrice (vezi figura). Valoarea deplasării izomerului (δ_{Fe}) de 0,41 mm/s și despicării de cuadropol (ΔE_Q) de 1,002 mm/s confirmă prezența fierului (III) în stare de spin înalt ($S=5/2$).

Exemplu de realizare a invenției

10 Se prepară mediul nutritiv cu următoarea compoziție: $NaHCO_3 - 16,8$, $K_2HPO_4 - 0,1$, $KNO_3 - 3,75$, $NaCl - 1,0$, $K_2SO_4 - 3,75$, $CaCl_2 \cdot 6H_2O - 0,04$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0,7$, $H_3BO_3 - 0,00286$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O - 0,00181$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O - 0,00022$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O - 0,00008$, $MoO_3 - 0,000015$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O - 0,024$, 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

15 $[Fe_2MgO(C_4H_3OCOO)_3(CH_3COO)(H_2O)(C_4H_8O)]$ 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...10 și iluminarea de 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.

20 Activitatea SOD în biomasa de spirulină este de 4,75 ori mai sporită față de soluția cea mai apropiată.

Tabel

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

Procedul utilizat	Compusul	Concen- trația, g/L	Activitatea SOD, unități convenționale	%
Conform celei mai apropiate soluții	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ Fe-EDTA	0,024 0,025	$0,42 \pm 0,24$	100
Conform procedeu- lui propus	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ Fe-EDTA $[Fe_2MgO(C_4H_3OCOO)_3(CH_3COO)(H_2O)(C_4H_8O)]$	0,024 0,025 0,025	$2,0 \pm 0,09$	475,06

MD 3129 G2 2006.08.31

5

(57) Revendicare:

- 5 Procedeu de obținere a biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* care include inocularea cianobacteriei în cantitate de 0,40...0,45 g/L într-un mediu nutritiv ce conține, 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 1 L, cultivarea ei în regim de acumulare în decurs de 6 zile la o iluminare de 3400...4800 lx, temperatura de 31...36°C, pH
- 10 9,5...10,0, **caracterizat prin aceea că** în prima zi de cultivare în mediul nutritiv se adaugă suplimentar compusul coordinativ $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_3(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{H}_2\text{O})(\text{C}_4\text{H}_8\text{O})]$ 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 биомасе цианобактерии *Spirulina platensis*. Резюме ale Conferinței internaționale a tinerilor cercetători din Moldova. 11.11.2005, p. 37
2. Rudic Valeriu. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău, Știința, 1993, p. 8...11

Director Departament:

JOVMIR Tudor

Examinator:

GUȘAN Ala

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2006 0043	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2006.01.31	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.: 32) data : 33) țara : (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 53/134</i> (2006.01) <i>A61K 36/05</i> (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul : Procedeu de obținere a biomasei de <i>Spirulina platensis</i> (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : biomasa de <i>Spirulina platensis</i> , $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_3(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{H}_2\text{O})(\text{C}_4\text{H}_8\text{O})]$	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.	
MD 1994-2006, EA 1996-2006, SU 1970-1994, inclusiv și colecția „nepublică”	
II. Documente considerate ca relevante	
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente
A	Ефремова Н. Изучение влияния цитрата Fe(III) и комплексных соединений Mn(II) на содержание супероксиддисмутазы в биомассе цианобактерии <i>Spirulina platensis</i> . Rezumate ale Conferinței internaționale a tinerilor cercetători din Moldova. 11.11.2005, 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	27.06.2006
Examinatorul	Gușan Ala