



MD 3101 G2 2006.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3101** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)
C07C 53/18 (2006.01)
C07F 15/02 (2006.01)
C07F 3/02 (2006.01)
A61K 36/05 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2006 0001 (22) Data depozit: 2005.12.26	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2006.07.31, BOPI nr. 7/2006
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; ZOSIM Liliana, MD; BULIMAGA Valentina, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; CIUMAC Daniela, MD; TURTĂ Constantin, MD; PRODIUS Denis, 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 particular la procedee de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de fier, care poate fi utilizată în industria alimentară, farmaceutică și medicină.

Procedeul de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* include prepararea mediului nutritiv, care conține, g/L de apă: NaHCO₃ – 16,8; K₂HPO₄·3H₂O – 1,0; NaNO₃ – 2,5; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; CaCl₂·6H₂O – 0,04; MgSO₄·7H₂O – 0,20; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015,

2

5 inocularea suspensiei de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,4 g/L și cultivarea ei în decurs de 6 zile în regim de acumulare la iluminarea de 3000...4800 lx, temperatura de 30...35°C și pH de 9,5...10,0. În mediu suplimentar se introduce compusul coordinativ [Fe₂MgO(CCl₃COO)₆(THF)₃] în concentrație de 0,040...0,050 g/L în rate, și anume o jumătate în prima zi de cultivare și o jumătate în a treia zi de cultivare.

Revendicări: 1

15

MD 3101 G2 2006.07.31

MD 3101 G2 2006.07.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de obținere a biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de fier, care poate fi utilizată în industria alimentară, farmaceutică și medicină.

5 Fierul este un element esențial pentru organismul uman. Insuficiența lui duce la anemie. Fierul anorganic nu poate fi absorbit atât de ușor ca fierul organic. Deoarece fierul din surse organice este mai bine asimilat, utilizarea lui este mai avantajoasă și mai eficientă.

Este cunoscut un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de ficobiliproteine și carotenoizi, care include inocularea și cultivarea acestora pe un mediu nutritiv, 10 conținând în g/L de apă: $\text{NaHCO}_3 - 16,8$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 1,0$; $\text{NaNO}_3 - 2,5$; $\text{NaCl} - 1,0$; $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$; $\text{MoO}_3 - 0,000015$ și unul din compușii coordinativi: azotat de hexa-?-glicinato(O,O')-?-3-oxo-triacvotrier(III)trihidrat- $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, hexa-?-treoninato(O,O')-?-3-oxo-triacvotrier(III)- $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Tre})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3$ sau hexa-?-alaninato 15 (O,O')-?-3-oxo-triacvotrier(III)tetrahidrat- $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Ala})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, care se adaugă la mediu la a treia zi de cultivare în concentrație de 5...10 mg/L, totodată cultivarea se efectuează 5...6 zile la temperatura de 30...35° C și iluminarea de 3000...4000 lx [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că cultivarea spirulinei pe mediul dat conform parametrilor descriși, deși se utilizează în calitate de sursă de fier unul din compușii menționați, nu 20 permite obținerea unei biomase de spirulină cu un conținut sporit de fier. Compusul coordinativ este inoculat la a treia zi de cultivare în concentrație de 5...10 mg/L în scopul obținerii biomasei cu un conținut sporit de ficobiliproteine și carotenoizi. Sursa de fier este inclusă pentru procesul de sinteză a acestor substanțe și nu pentru asigurarea unui conținut sporit al fierului în biomasă.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de obținere a biomasei de spirulină cu un conținut sporit de fier - sursă de produse nutritive, inclusiv forme 25 medicamentoase fierocomponente antianemice.

Problema se soluționează prin aceea că procedeul de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* include prepararea mediului nutritiv cu următoarea compoziție, g/L:

30 $\text{NaHCO}_3 - 16,8$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 1,0$; $\text{NaNO}_3 - 2,5$; $\text{NaCl} - 1,0$; $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$; $\text{MoO}_3 - 0,000015$; apă și o sursă de fier, inocularea spirulinei (0,4 g/L) și cultivarea ei în decurs de 6 zile în regim de acumulare la o iluminare de 3000...4800 lx, temperatura de 30° ... 35° C și pH optim al mediului de 9,5 - 10,0, în calitate de sursă de fier se adaugă compusul coordinativ $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{THF})_3]$, în concentrație de 0,040 - 0,050 g/L în rate: ? în prima zi 35 de cultivare și ½ în a treia zi de cultivare.

Rezultatul obținut în comparație cu cea mai apropiată soluție constă în sporirea conținutului de fier în biomasa de spirulină de 3,8... 5,7 ori.

Rezultatul obținut se datorează faptului că ligandul utilizat din compusul coordinativ al Fe este 40 inclus eficient în fracțiile de aminoacizi liberi, peptide, proteine, proteide și glucide prin mecanisme de absorbție și includere legate de prezența unor chelați din rândul unor constituenți majori ai biomasei, care prin grupele funcționale de o reactivitate chimică pronunțată (COO^- , NH_3^+ , SH , S-S , OH), grupele alcoolilor primari și secundari, cetogrupele, devin liganzi intracelulari eficienți pentru fier. Putem presupune că în procesul de cultivare a spirulinei, acumularea acestui bioelement, are loc 45 în baza unui mecanism de absorbție ionică pe contul transportului activ. De asemenea se pot implica și unele mecanisme realizate de sistemele energetice fermentative și de absorbție, legate de membrane și biocationi. Acest mecanism implică și stereospecificitatea unor enzime membranare, activate de către ionii de Fe^{3+} , precum și unele grupe speciale de transportatori membranari (ionofori ferici specifici - siderofori) capabili de a extrage ionii de fier din mediul nutritiv și de a-i transporta în interiorul celulei.

50 Sinteza compusului coordinativ $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{THF})_3]$ s-a efectuat conform C. Turtă, S. Shova, D. Prodius, V. Mereacre, M. Gdaniec, Yu. Simonov and Ja. Lipkowski „Novel heteronuclear ($\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{Mg}$)- μ_3 -oxo-bridged trichloroacetates: synthesis and X-ray study of $[\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{Mg}^{\text{II}}\text{O}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{Py})_3] \cdot \text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5$ and $[\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{Mg}^{\text{II}}\text{O}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{THF})_3]$, Inorganica Chimica Acta, 357, 15(1), 2004, p. 4396-4404.

55 *Exemplu de realizare a invenției*

Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență, g/L: $\text{NaHCO}_3 - 16,8$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 1,0$; $\text{NaNO}_3 - 2,5$; $\text{NaCl} - 1,0$; $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$; $\text{MoO}_3 -$

MD 3101 G2 2006.07.31

4

0,000015. La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40 g/L , apoi ? (0,025 g/L) de $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{THF})_3]$.

Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 250 ml cu 100 ml suspensie în următoarele condiții: 4000 lx, temperatura de 32° C, pH-ul mediului de cultivare 8...9 în primele 3 zile ale cultivării. În a treia zi de cultivare se adaugă restul cantității de $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{THF})_3]$ – 0,025 g/L, cultivarea este continuată pe parcursul a trei zile cu respectarea parametrilor: 4800 lx, la temperatura de 35°C și pH-ul de 9...10.

La ziua a șasea biomasa se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării de surplusul de săruri, utilizând în acest scop o soluție de acetat de amoniu de 1,5%, și se determină cantitatea de fier.

Biomasa obținută conține 1020 mg% fier și poate fi utilizată ca sursă pentru obținerea unor produse, inclusiv forme medicamentoase antianemice.

Datele obținute cu privire la cantitatea de fier în biomasa *Spirulina platensis* cultivată conform procedurii propus în invenție și conform celei mai apropiate soluții sunt prezentate în tabel.

Conținutul fierului în biomasa *Spirulina platensis*

Tabel

Procedeu utilizat	Compusul	Concentrația, g/L	Conținutul fierului în biomasa de spirulină, %
Conform celei mai apropiate soluții	$\text{Fe}_3\text{O}(\text{Ala})_6(\text{H}_2\text{O})_3[\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	0,05 0,010	$0,18 \pm 0,01$ $0,29 \pm 0,02$
Conform soluției propuse în invenție	$[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{THF})_3]$	0,050	$1,02 \pm 0,07$

Datele din tabel confirmă majorarea de 3,8...5,7 ori a conținutului de fier în biomasa de spirulină cultivată conform procedurii propus în invenție față de cea mai apropiată soluție.

(57) Revendicare:

Procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis*, care include prepararea mediului nutritiv, care conține, g/L de apă: NaHCO_3 – 16,8; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; NaNO_3 – 2,5; NaCl – 1,0; K_2SO_4 – 1,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,04; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,20; 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 și o sursă de fier, inocularea suspensiei de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,4 g/L, cultivarea ei în decurs de 6 zile în regim de acumulare la iluminarea de 3000...4800 lx, temperatura de 30...35°C și pH de 9,5...10,0, **caracterizat prin aceea că** în calitate de sursă de fier se utilizează compusul coordinativ $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{THF})_3]$, care se adaugă la mediu în concentrație de 0,040...0,050 g/L în rate, și anume o jumătate în prima zi de cultivare și o jumătate în a treia zi de cultivare.

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 2386 C2 2004.02.29

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2006 0001		
(22) Data depozit: 2005.12.26		
(51) : Int.Cl: <i>C12N 1/12</i> (2006.01) <i>C07C 53/18</i> (2006.01) <i>C07F 15/02</i> (2006.01) <i>C07F 3/02</i> (2006.01) <i>A61K 36/05</i> (2006.01) Titlul : Procedeu de obtinere a biomasei de <i>Spirulina platensis</i> (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : <i>Spirulina platensis</i> , procedee de obținere a biomasei, cultivarea cianobacteriilor		
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 și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	SU 1621823 A1 1988.03.15	1
A	SU 1662442 A1 1988.07.29	1
A	Yulian Yuan, Xuena Guo, Xiuping He, Borun Zhang, Shigiu Liu. Construction of a higbiomass, iron-enriched yeast strain and study on distribution of iron in the cells of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Biotechnology Letters, 2004, vol. 26, p. 311-315	1
A	MD 2386 C2 2004.02.29	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 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		2006.05.12
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