



MD 146 Z 2010.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **146** ⁽¹³⁾ **Z**

(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)
B01D 11/02 (2006.01)
A61K 36/05 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2009 0167 (22) Data depozit: 2009.09.09	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.02.28, BOPI nr. 2/2010
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: MISCU Vera, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDI Liudmila, MD; COJOCARI Angela, MD; RUDIC Valeriu, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de extragere a astaxantinei din biomasă de *Haematococcus*
*pluvialis***

(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de extragere a astaxantinei din biomasa microalgelor, care poate fi folosită în industria microbiologică, alimentară, cosmetică și farmaceutică.

Procedeul de extragere a astaxantinei din biomasă de *Haematococcus pluvialis* include separarea biomasei de lichidul cultural, distrugerea pereților celulari ai biomasei, prelucrarea biomasei cu un solvent organic, agitarea amestecului obținut și separarea extractului de astaxantină prin centrifugare.

2

5

Noutatea invenției constă în aceea, că se efectuează distrugerea mecanică a pereților celulari ai biomasei într-un omogenizator, în calitate de solvent se utilizează alcool etilic de 96%, răcit până la temperatura de 0 C, iar agitarea se efectuează pe un agitator mecanic orbital, timp de 5...10 min.

10

Revendicări: 1
Figuri: 2

15

MD 146 Z 2010.02.28

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de extragere a astaxantinei din biomasa microalgelor, care poate fi folosită în industria microbiologică, alimentară, cosmetică și farmaceutică.

5 Microalga verde *Haematococcus pluvialis* este un recunoscut producător de astaxantină – pigment carotenoidic cu proprietăți antioxidante performante. Rentabilitatea proceselor biotehnologice destinate obținerii preparatelor în bază de astaxantină depinde de aplicarea unor procedee adecvate de extragere a pigmentului, care permit a păstra structura lui nativă în procesul manipularilor și care nu implică substanțe

10 constisitoare, toxice sau de altă natură, care limitează domeniile de aplicare ale extractului astaxantinic. Este cunoscut un procedeu de extragere a astaxantinei din biomasa de *Haematococcus pluvialis* care constă în amestecarea biomasei separate prealabil de lichidul cultural prin centrifugare și prelucrarea pentru distrugerea peretelui celular cu dimetilsulfoxid (DMSO), încălzit în prealabil până la 55°C și agitarea amestecului pe vortex [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că lucrările pot fi realizate doar în condiții speciale, care includ ventilarea intensă, și deci, cheltuieli suplimentare. În același timp, păstrarea extractelor astaxantinice fără deteriorarea structurii moleculei pigmentului este posibilă doar la 0°C, temperatură la care DMSO trece în formă cristalină, ceea ce prezintă un obstacol pentru lucrările ulterioare. Afară de aceasta, extragerea astaxantinei, realizată cu utilizarea DMSO este incompletă, o parte din pigment rămânând în componența rezidului celular, după cum se vede în fig. 1.

20 Mai este cunoscut și procedeu de extragere a astaxantinei în metanol, care constă în amestecarea biomasei de *Haematococcus pluvialis* cu alcool metilic și cu particule de cuarț cu dimensiunea de 0,2...1,0 mm. Amestecul se agită pe un vibrator timp de 10 min, apoi se centrifughează timp de 10 min [2].

Dezavantajul procedurii indicat constă în faptul că pentru extracția astaxantinei se utilizează o substanță toxică (metanolul), ceea ce limitează esențial domeniile de utilizare ulterioară a extractelor obținute.

25 Cea mai apropiată soluție este un procedeu de extragere a astaxantinei din biomasa de *Haematococcus pluvialis*, care se realizează în modul următor: biomasa de *Haematococcus pluvialis*, separată în prealabil de lichidul cultural prin centrifugare și tratată pentru distrugerea peretelui celular, este amestecată cu acetonă, agitată atent pe un agitator magnetic și lăsată pentru 16 ore la temperatura camerei [3].

30 Dezavantajul acestui procedeu constă în durata mare a timpului de extragere care are loc la temperatura camerei timp de 16 ore, la care se produce o degradare a moleculelor de astaxantină, mai ales în cazul când extracția se petrece în vase neermetizate. Afară de aceasta acetona este o substanță inclusă în lista precursorilor substanțelor narcotice și, deci, procurarea, stocarea și utilizarea ei este asociată cu dificultăți suplimentare.

35 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu eficient, inofensiv și ușor de realizat de extragere a astaxantinei din biomasa de *Haematococcus pluvialis*, în urma aplicării căruia se va obține un produs, care poate fi utilizat în diferite domenii, inclusiv în industria alimentară, cosmetică, farmaceutică.

40 Procedeu de extragere a astaxantinei din biomasa de *Haematococcus pluvialis* include separarea biomasei de lichidul cultural prin centrifugare, distrugerea pereților celulari ai biomasei, prelucrarea biomasei cu un solvent organic, agitarea amestecului obținut și separarea extractului de astaxantină prin centrifugare. Totodată se efectuează distrugerea mecanică a pereților celulari ai biomasei într-un omogenizator. În calitate de solvent se utilizează alcool etilic de 96%, răcit până la temperatura de 0°C, iar agitarea se efectuează pe un agitator mecanic orbital, timp de 5...10 min.

45 Rezultatul invenției constă în faptul că în urma aplicării procedurii elaborat în condiții care nu necesită cheltuieli suplimentare se obține un extract de astaxantină non-toxic, care poate fi păstrat fără schimbări calitative și cantitative timp de o lună la 0°C și care poate fi utilizat în industria alimentară, cosmetică, farmaceutică.

În plus, se reduce termenul de extragere (5...10 min), față de soluția cea mai apropiată – 16 ore.

50 Rezultatul obținut se datorează faptului că pentru extragere este utilizat un solvent non-toxic (alcoolul etilic de 96%), acceptat în domeniile menționate, care este relativ ieftin, accesibil, iar lucrul cu el nu necesită condiții speciale. Pe lângă cele menționate, extragerea astaxantinei cu alcool etilic din biomasa de *Haematococcus pluvialis* este completă, fapt ce poate fi urmărit microscopic după decolorarea completă a ciștilor (fig. 2). Datorită polarității specifice a alcoolului etilic la utilizarea lui în calitate de solvent are loc extragerea în el a astaxantinei pure, fără incluziuni lipidice. Răcirea alcoolului până la temperatura de 0°C permite evitarea oxidării termice a astaxantinei în procesul de extracție, împiedicând de asemenea și solubilizarea lipidelor polare. Astfel, utilizarea alcoolului etilic de 96%, răcit la 0°C permite obținerea unui extract astaxantinic cu un grad sporit de puritate.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

60 Biomasa de *Haematococcus pluvialis* în vârstă de 20 zile, ce constă din ciști roșii este separată de lichidul cultural prin centrifugare la 1500 g timp de 5 min. Sedimentul celular este supus dezintegrării mecanice într-un omogenizator pentru distrugerea peretelui celulelor incapsulate. La 1 g de biomasă se adaugă 50 mL de alcool etilic, răcit în prealabil până la temperatura de 0°C. Amestecul se pune pentru 5 min pe un agitator orbital și se agită cu viteză de 300 rotații/min, după aceasta amestecul se centrifughează la 2000g timp de 5 min. Extractul de astaxantină este examinat pentru a stabili puritatea lui și concentrația

5 produsului activ. Pentru aceasta se înregistrează spectrul de absorbție al extractului în intervalul de lungimi de undă de la 400 până la 530 nm și se fixează maximul de absorbție. Prezența unui singur maxim de absorbție la lungimea de undă de 478 nm, ceea ce corespunde absorbției unei soluții de astaxantină pură în alcool etilic, indică asupra gradului înalt de puritate al produsului obținut. Concentrația astaxantinei se determină conform unei curbe de calibrare construită pentru soluții standarde de astaxantină pură în alcool. In cazul nostru ea constituie 412 mkg/mL.

10 Extractul de astaxantină din biomasa de *Haematococcus pluvialis* poate fi utilizat în continuare în diferite produse ori preparate. În caz de necesitate, extractul poate fi păstrat la rece (temperatura de 0°C). Pentru a verifica calitatea extractului după o anumită perioadă de păstrare de 14 și de 28 zile au fost înregistrate spectrele de absorbție ale extractelor. Prezența unui singur maxim de absorbție cu valoare care se deosebește statistic neesențial de valoarea maximului imediat după extragere vorbește despre faptul că în termenii studiați, modificări calitative și cantitative ale extractului de astaxantină nu au avut loc.

Exemplul 2

15 Biomasa de *Haematococcus pluvialis* în vârstă de 20 zile, ce constă din ciști roșii este separată de lichidul cultural prin centrifugare la 1500 g timp de 5 min. Sedimentul celular este supus dezintegrării într-un omogenizator mecanic pentru distrugerea peretelui celulelor încapsulate. La 1 g biomasă se adaugă 50 mL alcool etilic, răcit în prealabil la temperatura de 0°C. Amestecul se pune pentru 10 min pe un agitator magnetic orbital și se agită cu viteza de 300 rotații/min. După aceasta amestecul se centrifughează la 2000 g timp de 5 min. Extractul de astaxantină este examinat pentru a stabili puritatea lui și concentrația produsului activ. Pentru aceasta se înregistrează spectrul de absorbție al extractului în intervalul de lungimi de undă de la 400 până la 530 nm și se fixează maximul de absorbție. Prezența unui singur maxim de absorbție la lungimea de undă de 478 nm, ceea ce corespunde absorbției soluției astaxantinei pure în alcool etilic, indică asupra gradului înalt de puritate al produsului obținut. Concentrația astaxantinei se determină conform unei curbe de calibrare construită pentru soluții standarde de astaxantină pură în alcool. În acest caz concentrația astaxantinei constituie 438 mkg/mL.

25 Extractul de astaxantină din biomasa de *Haematococcus pluvialis* poate fi utilizat în continuare pentru introducerea lui în diferite produse ori preparate. În caz de necesitate, extractul poate fi păstrat la rece (la temperatura de 0°C). Prezența unui singur maxim de absorbție cu valoare care se deosebește statistic neesențial de valoarea maximului imediat după extragere denotă faptul că în termenii studiați modificări calitative și cantitative ale extractului de astaxantină nu au avut loc.

(57) Revendicări:

35 Procedeu de extragere a astaxantinei din biomasă de *Haematococcus pluvialis*, care include separarea biomasei de lichidul cultural prin centrifugare, distrugerea pereților celulari ai biomasei, prelucrarea biomasei cu un solvent organic, agitarea amestecului obținut și separarea extractului de astaxantină prin centrifugare, **caracterizat prin aceea că** se efectuează distrugerea mecanică a pereților celulari ai biomasei într-un omogenizator, în calitate de solvent se utilizează alcool etilic de 96%, răcit până la temperatura de 0 C, iar agitarea se efectuează pe un agitator mecanic orbital, timp de 5...10 min.

(56) Referințe bibliografice:

1. Orosa M., Franquera D., Cid Abalde J. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. Biotechnology Letters. 2001, 23, p. 373-378
2. Tomohisa Katsuda et al. Astaxantin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35, p. 81-86
3. Mendes-Pinto M. et al. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxantin recovery and implications for bioavailability. Journal of Applied Phycology, 200 1, 13, p. 19-24

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

UNGUREANU Mihail

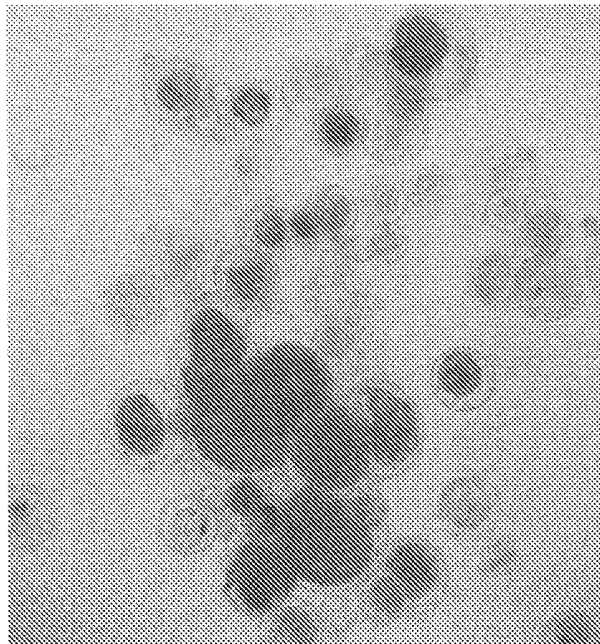


Fig. 1. Biomasa de *Haematococcus pluvialis* după extragere cu DMSO

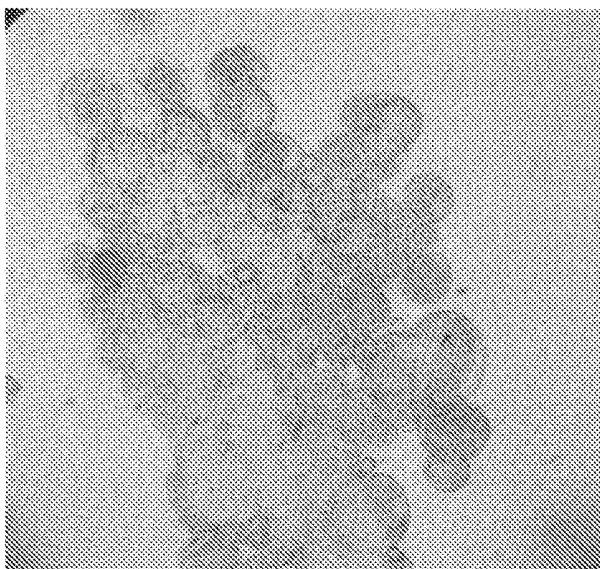


Fig. 2. Biomasa de *Haematococcus pluvialis* după extragere cu alcool etilic de 96% răcit la 0°C

RAPORT DE DOCUMENTARE

pentru cerere de brevet de invenție de scurtă durată conform art.52(2) a Legii nr. 50/2008

(21) Nr. depozit: s 2009 0167		
(22) Data depozit: 2009.09.09		
(51) IPC: Int. Cl.: C12N 1/12 (2006.01) B01D 11/02 (2006.01) A61K 36/05 (2006.01) Titlul: Procedeu de extragere a astaxantinei din biomasă de <i>Haematococcus pluvialis</i> (71) Solicitantul: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD		
I. Condiția de unitate a invenției ☐ satisface		
II. Minimul de documente consultate: MD 1993-2009; EA 1996-2009		
III. Domeniul de documentare: biotehnologie Indicii IPC (ultima redacție): a) Int. Cl.: C12N 1/12 (2006.01); B01D 11/02 (2006.01); A61K 36/05 (2006.01) b) Termeni caracteristici, cuvinte-cheie, sinonime: astaxantina, extragerea, bomasa algelor.		
IV. Documente considerate a fi relevante		
Categoria	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Relevant față de revendicarea nr.
A	Orosa M., Franquera D., Cid Abalde J. Carotenoid accumulation in <i>Haematococcus pluvialis</i> in mixotrophic growth. Biotechnology Letters. 2001, 23, p. 373-378	1
A	Tomohisa Katsuda et al. Astaxantin production by <i>Haematococcus pluvialis</i> under illumination with LEDs. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35, p. 81-86	1
A	Mendes-Pinto M. et al. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of <i>Haematococcus pluvialis</i> : effects on astaxantin recovery and implications for bioavailability. Journal of Applied Phycology, 2001, 13, p. 19-24	1
Categorii de documente citate		
A - document care definește stadiul anterior în general	O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere etc.	
X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă	P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate	
Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură	T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care fundamentează invenția	
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după această dată	D - Document menționat în descrierea cererii de brevet	
Data finalizării documentării	2009.12.10	
Examinatorul	Bazarenco Tatiana	

736 / FC / 05.0 / A / 4 / I /