



MD 132 Y 2010.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **132** ⁽¹³⁾ **Y**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)
A61K 36/05 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

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

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2009 0173 (22) Data depozit: 2009.09.18	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.01.31, BOPI nr. 1/2010
(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 obținere a preparatului uleios de astaxantină**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la ficobiotehnologie, în special la procedeele de obținere a substanțelor bioactive din biomasă de microalge.

Procedeul de obținere a preparatului uleios de astaxantină include tratarea biomasei de *Haematococcus pluvialis* cu soluție de 0,1N de

2
5 HCl, spălarea până la un pH neutru, amestecarea biomasei cu ulei vegetal, agitarea amestecului timp de 3 ore și separarea de reziduul de biomasă.

Revendicări: 1

Figuri: 2

10

MD 132 Y 2010.01.31

Descriere:

Invenția se referă la ficobiotehnologie, în special la procedeele de obținere a substanțelor bioactive din biomasa microalgelor și poate fi folosită în industria microbiologică, alimentară, cosmetică și farmaceutică.

5 Microalga verde *Haematococcus pluvialis* este un producător de astaxantină - pigment carotenoidic cu proprietăți antioxidante performante. Astfel, biomasa de *Haematococcus pluvialis*, în dependență de condițiile de cultivare aplicate poate conține până la 3% astaxantină. Ținând cont de structura complexă a acestui compus, păstrarea lui în timp necesită condiții specifice, una din metodele posibile fiind trecerea produsului activ în uleiuri vegetale. O asemenea formulă asigură păstrarea structurii native și

10 sporește esențial biodisponibilitatea produsului activ pentru organismul uman.
Este cunoscut procedeul de obținere a preparatului uleios de astaxantină, care constă în amestecarea biomasei uscate de *Haematococcus pluvialis* cu ulei de palmier și polisorbant 80 hidrofilic în proporții de 0,32:0,65:0,05. Biomasa de hematococ, înainte de amestecare, este omogenizată și uscată prin pulverizare [1].

15 Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că astaxantina în mare parte rămâne încapsulată în ciste de *Haematococcus* și se solubilizează doar într-o măsură nesemnificativă. În același timp, preparatul mai conține și polisorbant 80 hidrofilic, adăugarea căruia ridică prețul de cost al produsului.

Mai este cunoscut procedeul de obținere a preparatului uleios astaxantinic prin emulsionarea biomasei de *Haematococcus pluvialis*, preparatul având următoarea componență: ulei vegetal 65%;
20 proteină izolată din boabe de mază 3%; biomasa de *Haematococcus pluvialis* 0,05...2,00%, apă distilată până la 100%. Procedeul se realizează în modul următor: biomasa microalgei liofilizată în cantitate de 0,05...2,00%, împreună cu proteina izolată din mază (Pisane HD, Cosura, Belgium) în cantitate de 3% este dispersată în apă deionizată pe un agitator magnetic la temperatura camerei, timp de 30 min. Emulsionarea cu ulei se face cu un ultraomogenizator (Ultra Turrax T-25) la 13 000 rot/min, timp de 3 min [2].

25 Dezavantajul acestui procedeu, ca și a celui precedent, constă în aceea că solubilizarea astaxantinei este minimală, iar produsul final este o emulsie, care necesită stabilizare cu o soluție proteică, ceea ce modifică esențial conținutul preparatului.

În calitate de cea mai apropiată soluție a fost selectat procedeul de obținere a preparatului uleios de astaxantină prin extragerea directă a astaxantinei în uleiuri vegetale din biomasa de *Haematococcus pluvialis*, care se realizează în modul următor: cultura de *Haematococcus pluvialis* (30 ml) se amestecă cu ulei vegetal comercial (de soia, porumb, semințe de struguri, masline) în aceeași cantitate. Amestecul se agită puternic timp de 48 ore, după care, astaxantina din biomasa de hematococ, fiind accentuat lipofilică, trece în uleiul vegetal [3].

35 Dezavantajul acestui procedeu constă în perioada îndelungată a extragerii care are loc la temperatura camerei timp de 48 ore. Afară de acesta, repetarea strictă și de multiple ori a extragerii astaxantinei direct în ulei, conform metodei indicate mai sus, denotă, că extragerea, chiar și după 48 ore este incompletă, biomasa de hematococ păstrându-și culoarea specifică roșie.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu eficient, inofensiv
40 și ușor de realizat, de obținere a unui preparat uleios de astaxantină, care poate fi utilizat în diferite domenii, inclusiv în industria alimentară, cosmetică și farmaceutică.

Invenția soluționează problema prin aceea că procedeul de obținere a preparatului uleios de astaxantină include tratarea biomasei de *Haematococcus pluvialis* cu soluție de 0,1N de HCl, spălarea până la un pH neutru, amestecarea biomasei cu ulei vegetal, agitarea amestecului timp de 3 ore și separarea de reziduul de biomasă.

45 Rezultatul tehnic al invenției constă în faptul că în urma aplicării procedurii elaborat se obține un preparat uleios de astaxantină, în care astaxantina trece integral din biomasă în ulei, iar timpul de extragere se reduce de 16 ori față de prototip.

50 Rezultatul tehnic obținut se datorează faptului, că hidroliza acidă a biomasei de hematococ asigură trecerea rapidă a astaxantinei, care se caracterizează prin proprietăți puternic lipofile, din ciste roșii în faza uleioasă.

*Exemple de realizare a invenției**Exemplul 1*

55 Biomasa de *Haematococcus pluvialis* în vârstă de 20 zile, ce constă din ciste roșii este separată de lichidul cultural prin centrifugare timp de 5 min la 1500 g. Sedimentul celular este supus hidrolizei acide cu soluție de 0,1N HCl timp de 5 min, după care se spală abundant cu apă distilată până la neutralizarea pH-ului. În continuare la biomasa de hematococ (0,1 g recalculat la biomasă absolut uscată) se adaugă 15 ml de ulei de floarea soarelui. Amestecul se pune pentru 3 ore pe un agitator orbital și se agită cu viteza de 800 rot/min. După aceasta reziduul de biomasă decolorat complet se
60 separă prin decantare. Preparatul uleios de astaxantină este examinat pentru a stabili puritatea lui și concentrația produsului activ (astaxantinei). Pentru aceasta se înregistrează spectrele de absorbție ale uleiului curat de floarea soarelui și a preparatului uleios de astaxantină în bază de ulei de floarea soarelui în intervalul de lungimi de undă de la 400 la 530 nm și se fixează maximul de absorbție. Prezența unui singur maxim de absorbție în spectrul preparatului uleios de astaxantină, necaracteristic

MD 132 Y 2010.01.31

4

uleiului pur în domeniul lungimii de undă de 482...486 nm, indică asupra gradului înalt de puritate al produsului obținut (fig. 1). Concentrația astaxantinei se determină conform unei curbe de calibrare construită pentru soluții standarde de astaxantină pură. În cazul dat ea constituie 165 ?g/ml.

5 Preparatul uleios de astaxantină din biomasa de *Haematococcus pluvialis* poate fi utilizat în continuare în diferite produse sau preparate.

Exemplul 2

10 Biomasa de *Haematococcus pluvialis* în vârstă de 20 zile, ce constă din ciste roșii este separată de lichidul cultural prin centrifugare timp de 5 min la 1500 g. Sedimentul celular este supus hidrolizei acide cu soluție de 0,1N HCl timp de 5 min, după care se spală abundant cu apă distilată până la neutralizarea pH-ului. În continuare la biomasa de hematococ (0,1 g recalculat la biomasa absolut uscată) se adaugă 15 ml ulei de măsline. Amestecul se pune pentru 3 ore pe un agitator orbital și se agită cu viteza de 800 rot/min. După aceasta reziduul de biomasă decolorat complet se separă prin decantare. Preparatul uleios de astaxantină este examinat pentru a stabili puritatea lui și concentrația produsului activ (astaxantinei). Pentru aceasta se înregistrează spectrele de absorbție ale uleiului curat

15 de măsline și a preparatului uleios de astaxantină în bază de ulei de măsline în intervalul de lungimi de undă de la 400 la 530 nm și se fixează maximul de absorbție. Prezența unui singur maxim de absorbție în spectrul preparatului uleios de astaxantină, necaracteristic uleiului pur la lungimea de undă de 482...486 nm, indică asupra gradului înalt de puritate al produsului obținut (fig. 2). Concentrația astaxantinei se determină conform unei curbe de calibrare construită pentru soluții standarde de astaxantină pură. În cazul dat ea constituie 172 ?g/ml.

20

Preparatul uleios de astaxantină din biomasa de *Haematococcus pluvialis* poate fi utilizat în diferite produse sau preparate.

25

(57) Revendicări:

30 Procedeu de obținere a preparatului uleios de astaxantină care include tratarea biomasei de *Haematococcus pluvialis* cu soluție de 0,1N de HCl, spălarea până la un pH neutru, amestecarea biomasei cu ulei vegetal, agitarea amestecului timp de 3 ore și separarea de reziduul de biomasă.

(56) Referințe bibliografice:

1. Odeberg J.M. et al. Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulation. European Journal of Pharmaceutical Sciences. (2003) 19, 299-304
2. Gouveia L. et al. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsion. Eur. Food Res. Technol. (2006) 222, 362-367
3. Chang Duk Rfng, Sang Jun Sim. Directed extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils. Biotechnol. Lett. (2008) 30, 441-444

Director Departament:

JOVMIR Tudor

Examinator:

COLESNIC Inesa

Redactor:

LOZOVANU Maria

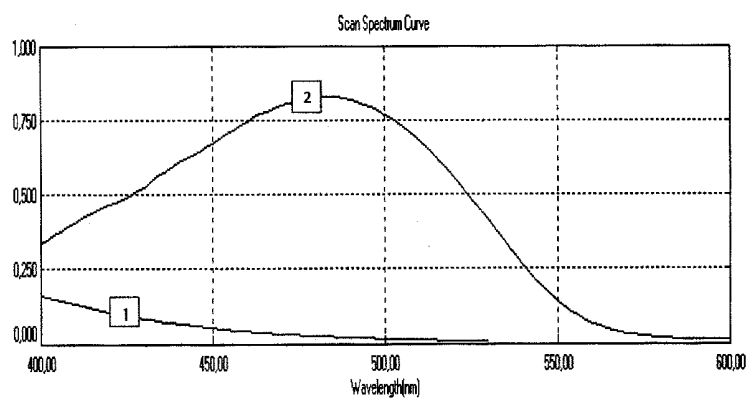


Fig. 1. Spectrul de absorbție a uleiului de floarea soarelui (1) și a preparatului uleios de astaxantină

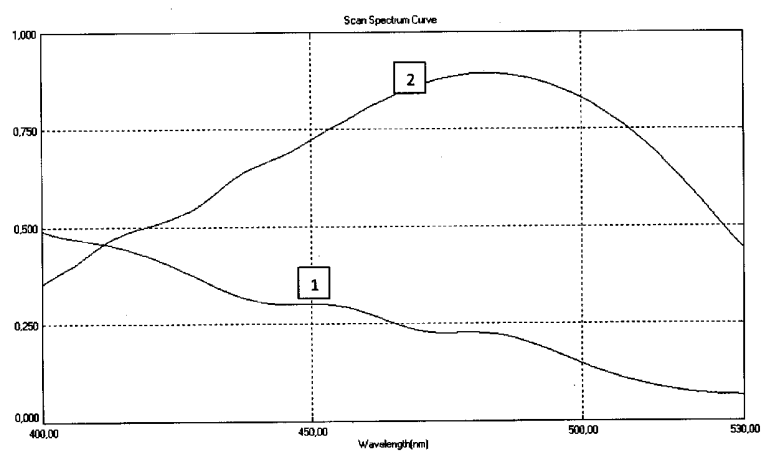


Fig. 2. Spectrul de absorbție a uleiului de olive (1) și a preparatului uleios de astaxantină (2)

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 0173		
(22) Data depozit: 2009.09.18		
(51) IPC: Int. Cl.: C12N 1/12 (2006.01) A61K 36/05 (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul: Procedeu de obținere a preparatului uleios de astaxantină (71) Solicitantul: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD		
I. Condiția de unitate a invenției ☒ X satisface ☐ nu satisface. Notă:		
II. Minimul de documente consultate: MD, EA		
III. Domeniul de documentare: Indicii IPC (ultima redacție): Int. Cl.: C12N 1/12 (2006.01) a) A61K 36/05 (2006.01) b) Termeni caracteristici, cuvinte-cheie, sinonime: astaxantină, hidroliza, acid, ulei vegetal, астаксантин, гидролиз, кислота, растительное масло, <i>Haematococcus pluvialis</i>		
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	MD 1352 G2 1999.11.30	1
A	MD 1723 G2 2001.08.31	1
A	RU 2050388 C1 1995.12.20	1
A	Odeberg J.M. et al. Oral bioavalability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulation. European Jornal of Pharmaceutical Sciences. (2003) 19, 299-304	1
A	Gouveia L. et al. <i>Chlorella vulgaris</i> and <i>Haematococcus pluvialis</i> biomass as colouring and antioxidant in food emilsion. Eur. Food Res. Technol. (2006) 222, 362-367	1
A	Chang Duk Rfng, Sang Jun Sim. Directed extraction of astaxanthin from <i>Haematococcus</i> culture using vegetable oils. Biotechnol. Lett. (2008) 30, 441-444	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 2009.11.17		
Examinatorul Colesnic Inesa		