



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 230 560⁽¹³⁾ C2
(51) МПК⁷ A 61 K 33/00, 35/80

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

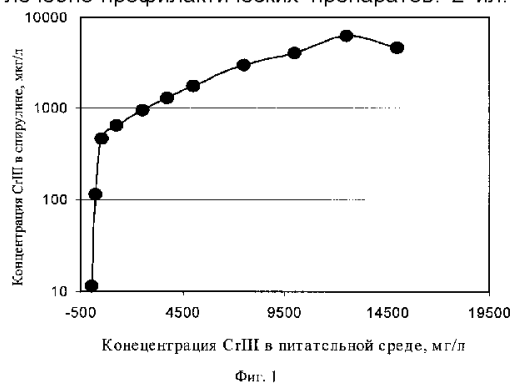
(21), (22) Заявка: 2002115679/15, 11.06.2002
(24) Дата начала действия патента: 11.06.2002
(43) Дата публикации заявки: 27.01.2004
(46) Дата публикации: 20.06.2004
(56) Ссылки: RU 2144078 C1, 10.01.2000. RU 2096037 C1, 20.11.1997. DE 3421644, 12.12.1985.
(98) Адрес для переписки:
141980, Московская обл., г. Дубна,
ул. Жолио-Кюри, 6, ОИЯИ

(72) Изобретатель: Мосулишвили Лигури Михайлович (GE),
Белокобыльский Алим Иванович (GE),
Киркесали Елена Ивановна (GE),
Фронтасьева М.В. (RU), Павлов С.С. (RU)
(73) Патентообладатель:
Объединенный институт ядерных исследований (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА СПИРУЛИНЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ ХРОМ

(57) Изобретение относится к области получения препарата биомассы спирулины. Предложен оптимальный способ культивации биомассы спирулины (*Spirulina platensis*) в присутствии органического соединения трехвалентного хрома, при котором хром интенсивно и эндогенно включается в органические молекулы спирулины при сохранении естественного состояния и белкового состава биомассы. Суспензия готовится из пятидневной культуры спирулины, которая подвергается предварительной гомогенизации, способствующей частичному укорочению нитей спирулины и в дальнейшем - ускорению и стимуляции ее роста, а также интенсивному эндогенному включению хрома в биокomплексы клеток. Способ позволяет

получить хромсодержащую биомассу спирулины с такими качественными характеристиками, пригодную для производства диетических и лечебно-профилактических препаратов. 2 ил.



Фиг. 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 230 560** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 33/00, 35/80**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2002115679/15, 11.06.2002

(24) Effective date for property rights: 11.06.2002

(43) Application published: 27.01.2004

(46) Date of publication: 20.06.2004

(98) Mail address:
141980, Moskovskaja obl., g. Dubna,
ul. Zholio-Kjuri, 6, OIJaI

(72) Inventor: Mosulishvili Liguri Mikhajlovich (GE),
Belokobyl'skij Alim Ivanovich (GE), Kirkesali
Elena Ivanovna (GE), Frontas'eva M.V.
(RU), Pavlov S.S. (RU)

(73) Proprietor:
Ob"edinennyj institut jadernykh issledovanij (RU)

(54) **METHOD FOR PREPARING CHROME-CONTAINING SPIRULINA PREPARATION**

(57) Abstract:

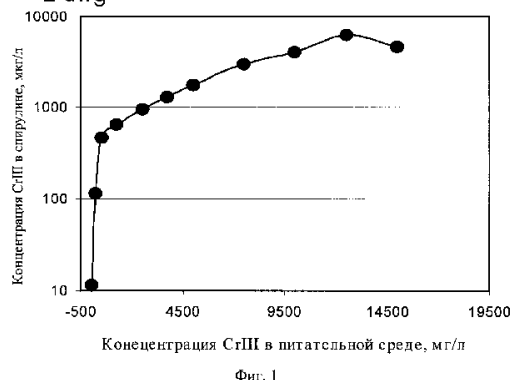
FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to preparing the spirulina biomass preparation. Invention proposes optimal culturing method for preparing spirulina biomass (*Spirulina platensis*) in the presence of trivalent chrome organic compound when chrome is incorporated into spirulina organic molecules endogeneously and intensively in retaining the natural state and protein composite of spirulina. Suspension is prepared from 5-old days culture of spirulina that is subjected for preliminary homogenization promoting to stimulation of its growth and acceleration and stimulation of its growth in the following, and intensive endogenous chrome incorporation in cellular biocomplexes. Method provides preparing chrome-containing spirulina

biomass showing such qualitative indices and useful for manufacturing dietetic and curative-prophylactic preparations.

EFFECT: improved preparing method.

2 dwg



Изобретение относится к способам получения биологически активных препаратов на основе биомассы микроводоросли *Spirulina platensis* и может быть применено в биотехнологии, микробиологии, медицине, альгологии и пищевой промышленности.

Известен способ [1] использования высоких доз трипиколината хрома (1000-10000 мкг в день) для лечения диабета второго типа - снижения уровня гипергликемии и стабилизации содержания глюкозы в крови человека. Это предложение касается способа лечения и не описывает способа получения препарата. Кроме того, учитывая богатый состав и свойства спирулины, можно ожидать, что для профилактики и лечения диабета на ранних стадиях применение препаратов на основе ее биомассы, содержащей хром в оптимальных дозах, будет эффективнее, чем применение трипиколината хрома.

Известен также способ использования ионов хрома, входящего в состав органического соединения, для обогащения биомассы микроводоросли [2], который можно рассматривать как прототип. Сущность способа заключается в выращивании спирулины на питательной среде в накопительном режиме с последующим внесением в культивируемый раствор водной дисперсии гексагидрата хлористого хрома, выращивании в течение 3-5 суток, отделением биомассы спирулины, промывкой, сушкой и измельчением до получения продукта, содержащего не менее 500 мг/кг хрома в биомассе.

Биомасса спирулины благодаря своим высоким качествам (богатству белками, витаминами и другими ценными веществами) является хорошей основой для создания хромсодержащих препаратов с целью профилактики и лечения диабета и других заболеваний, связанных с дефицитом хрома, на ранних стадиях. Известно, что длительный прием спирулины способствует лечению диабета при одновременном оздоровлении организма.

Из литературы известны примеры биологической активности препаратов на основе биомассы *Spirulina platensis* [3-8]. Поэтому очень важно, чтобы способ получения хромсодержащего препарата на основе *Spirulina platensis* обеспечивал эндогенное включение хрома в ее биомассу в концентрациях, соответствующих фармацевтическим нормам и обеспечивал нормальные условия роста клеток, а значит, и естественные свойства биомассы. Хром, являясь жизненно важным элементом для живых организмов, может быть и токсичен в больших концентрациях. Концентрации хрома в питательной среде при получении биомассы спирулины с концентрацией 500 мг хрома/кг в способе [2] настолько велики, что при них рост клеток микроводоросли идет на фоне борьбы за выживание и, конечно, качество биомассы не может быть естественным и ее белковый состав должен меняться.

Целью предлагаемого изобретения является получение биомассы спирулины с оптимальными концентрациями хрома (CrIII), наиболее полезной для организма при сохранении естественных свойств спирулины и ее белкового состава.

Поставленная цель достигается тем, что

органическое соединение трехвалентного хрома (CrIII) - уксуснокислый хром ($\text{Cr}(\text{CH}_3\text{COOH})_3$) в заданных концентрациях по хрому, а именно 375 мкг/л до 22,5 мг/л, вводят в специально приготовленный раствор суспензии *Spirulina platensis* в стандартной питательной водно-солевой среде Заруха. Суспензия готовится из пятидневной культуры спирулины, выращенной в питательной среде Заруха. Клетки отделяют от раствора путем центрифугирования. Полученный плотный осадок вручную суспензируют в слабо притертом гомогенизаторе Поттера в растворе среды Заруха с целью частичного укорочения нитей спирулины. Это способствует стимуляции роста клеток спирулины в дальнейшем и интенсивному эндогенному включению хрома в ее органические биоконплексы, а также сохранению естественного состава биомассы. После добавления раствора уксуснокислого хрома в суспензию спирулины, приготовленную вышеописанным способом, клетки культивируются в течение 5 суток при освещении лампами накаливания и температуре 34°C. По окончании культивации полученная биомасса отделяется от раствора общеизвестными методами, а затем в ней определяется содержание хрома. Содержание хрома в биомассе контролируется и выбирается в пределах от 30 до 250 мкг/г. Одновременно ведется микроскопический контроль качества биомассы спирулины и определение ее белкового состава. Полученные результаты показывают, что концентрации хрома в биомассе спирулины удовлетворяют фармакологическим требованиям, а белковый состав остается неизменным.

Полученные результаты демонстрируются следующими графическими материалами:

- на фиг.1 представлена зависимость концентрации хрома в сухой биомассе спирулины от концентрации хрома в питательной среде на 5 сутки от начала культивирования в присутствии уксуснокислого хрома. Результаты получены методом эпитеплового нейтронного активационного анализа на импульсном быстром реакторе ИБР-2 ОИЯИ (г. Дубна). Из полученной кривой видны пределы концентраций CrIII в питательной среде от 375 мкг/л до 22,5 мг/л и соответствующие им концентрации хрома в сухой биомассе спирулины. Концентрации хрома от 30 до 250 мкг/г сухой спирулины, предлагаемые для профилактических и лечебных целей, соответствуют нормальной скорости роста культуры (фиг.2) и при этом сохраняются свойства спирулины и ее белковый состав;

- на фиг.2 показана зависимость выхода биомассы спирулины от концентрации в ней хрома, из которой видно, что для предлагаемых доз хрома сохраняется естественная скорость роста, что также подтверждается одновременным микроскопическим контролем качества культуры и определением белкового состава биомассы методом капиллярного электрофореза.

Пример осуществления способа: питательная водно-солевая среда Заруха готовится из следующих ингредиентов: NaHCO_3 13,61 г/л, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1,0 г/л, Na_2CO_3 4,03 г/л, NaNO_3 2,5 г/л, K_2SO_4 1,0

г/л, NaCl 1,0 г/л, MgSO₄ 0,2 г/л, CaCl₂·2H₂O 0,04 г/л, FeSO₄·7H₂O 0,01 г/л, Na₂EDTA 0,008 г/л (основной раствор), а также из микроэлементов, добавляемых в объеме 1 мл на 1 л основной среды: H₂BO₃ 2,86·10⁻³ г/л, MgCl₂·4H₂O 1,81·10⁻³ г/л, ZnSO₄·7H₂O 0,22·10⁻³ г/л, CuSO₄·5H₂O 8·10⁻⁵ г/л, MoO₃ 15·10⁻⁶ г/л, NH₄VO₃ 23·10⁻⁶ г/л, K₂Cr₂(SO₄)₃·2H₂O 96·10⁻⁶ г/л, NiSO₄·7H₂O 48·10⁻⁶ г/л, Na₂WO₄·2H₂O 18·10⁻⁶ г/л, Ti₂(SO₄)₃ 40·10⁻⁶ г/л, Co(NO₃)₂·6H₂O 44·10⁻⁶ г/л. Для приготовления суспензии культура спирулины предварительно выращивается в течение 5 дней в питательной среде Заруха по методу, описанному в работе [9]. Это обеспечивает при дальнейшей культивации высокую скорость роста и качество биомассы спирулины. После пятидневной культивации клетки отделяются от раствора путем центрифугирования при 3000 г в течение 10 мин. Полученный плотный осадок вручную суспензируется в слабо притертом гомогенизаторе Поттера в среде Заруха. При этом происходит частичное укорочение нитей спирулины, способствующее в дальнейшем ускорению роста культуры и интенсивному эндогенному включению хрома в ее биоконплексы. Раствор суспензии готовится из расчета 10 г плотного осадка на 1 л питательной среды. Затем в него добавляется 0,1 М раствор уксуснокислого хрома (Cr(CH₃COOH)₃) в концентрациях по хрому от 375 мкг/л до 22,5 мг/л. Последующая культивация спирулины проводится в течение 5 суток при температуре 34°C, освещении двумя лампами накаливания по 150 В каждая, рН 9,5-10,5 и перемешивании 160 об/мин.

Урожай биомассы собирается путем центрифугирования при 3000 г в течение 20 мин при 4°C. Полученный осадок промывается бидистиллированной водой и снова центрифугируется при тех же условиях. Следующая промывка проводится бидистиллированной водой, подкисленной лимонной кислотой (50 г/л H₂O). После этого проводится центрифугирование при 12000 г в течение 20 мин при 4°C. окончательно полученный плотный осадок лиофильно высушивается и из него готовятся таблетки для анализа.

Содержание хрома в биомассе спирулины определялось методом эпитеплового нейтронного активационного анализа. Зависимость концентрации хрома в биомассе спирулины от его концентрации в питательной среде показана на фиг.1 Как видно из кривой на фиг.1, добавление CrIII в питательную среду от 0,5 мг/л до 15 мг/л приводит к увеличению количества связываемого клетками хрома без выхода на насыщение. Это облегчает задачу определения оптимальных доз CrIII в биомассе спирулины. На фиг.2 показана кинетика роста биомассы *Spirulina platensis* при культивации в питательной среде с различными концентрациями CrIII. Как видно из полученных кривых, прирост биомассы, а значит и ее естественные свойства в течение 5-6 дней культивации, практически не зависят от концентрации CrIII в питательной среде. Одновременно проводимый

микроскопический контроль подтверждает сохранение естественного качества клеток спирулины. Контроль белкового состава биомассы спирулины, выращенной в этом эксперименте методом гель-электрофореза, также свидетельствует о том, что естественный белковый состав остается неизменным.

Таким образом, способ позволяет в накопительном режиме достигнуть включения 30-250 мкг CrIII на 1 г лиофилизированной биомассы спирулины без изменения ее качественных характеристик, что вполне соответствует фармакологическим дозам для изготовления полноценных профилактических и лечебных препаратов на основе матрицы спирулины. Из научно-технической и патентной литературы не известны способы, позволяющие получать хромсодержащую биомассу спирулины с такими качественными характеристиками, пригодную для производства диетических и лечебно-профилактических препаратов.

Литература

1. (21)97120726/14 (22)15.12.97 Высокие дозы трипиколлината хрома для лечения диабета второго типа. Мккарти М. (US).
2. RU 2144078, 10.01.2000
3. Fox D. Health Benefits of Spirulina. In: Spirulina, Algae of Life. Bulletin of Institute of Oceanography (Monaco) No. 12, (1993).
4. М.Рисман. Биологически активные пищевые добавки. Арт-Бизнес-Центр, Москва, (1989), 220.
5. A.Belay, Y. Ota, K. Miyakawa, H. Shimamatsu. - Current Knowledge on Potential Health Benefits of *Spirulina platensis*. J. Appl. Phycol. (1993), No. 5, 235-241.
6. Hirahashi T., Matsumoto M., Hazeki K., Saeki Y., Ui M., Seya T. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. International Immunopharmacology 2, 423-434, (2002).
7. Rangsayatom N., Upatham E.S., Kruatrachue M., Pokethitiyook K.P., Lanza G.R. Phytoremediation potential of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium. Environmental Pollution, 119, 45-53, (2002).
8. Ortego-Calvo J.J., Maruclos C., Hermosin B., Sair-Juwenez C. Chemical composition of *Spirulina* and eucaryotic algae food products marketed in Spain. J. of Applied Phycology, 5, 425-435, (1993).
9. М.Г. Владимирова. В.Е. Семененко. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. Москва, Мир, (1968).

Формула изобретения:

Способ получения препарата спирулины, содержащей хром, включающий культивирование микроводоросли на питательной среде и внесение биологически активного хрома, с последующей инкубацией культуры, отличающийся тем, что в питательную среду с пятидневной культурой спирулины в виде предварительно гомогенизированной суспензии добавляют уксуснокислый хром в концентрации по хрому от 375 мкг/л до 22,5 мг/л и культивируют 5 дней до получения биомассы, содержащей хром от 30 до 250 мкг/г.

