



MD 3171 F1 2006.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3171** ⁽¹³⁾ **F1**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)
C07F 3/06 (2006.01)
C07C 229/76 (2006.01)
A61K 36/05 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
<p>(21) Nr. depozit: a 2006 0058 (22) Data depozit: 2006.02.17 (41) Data publicării cererii:</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2006.10.31, BOPI nr. 10/2006</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; BULIMAGA Valentina, MD; ZOSIM Liliana, MD; GULEA Aurelian, MD; POIRIER Donald, CA; CIAPURINA Ludmila, MD; CIUMAC Daniela, MD; TODERAȘ Ion, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p>	

(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* cu un conținut sporit de zinc și poate fi aplicată în industria alimentară și farmaceutică, precum și în 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, K₂HPO₄·3H₂O - 1,0, NaNO₃ - 2,5, NaCl -

2

5 1,0, K₂SO₄ - 1,0, CaCl₂·6H₂O - 0,04, MgSO₄·7H₂O - 0,20, H₃BO₃ - 0,00286, MnCl₂·4H₂O - 0,00181, CuSO₄·5H₂O - 0,00008, MoO₃ - 0,000015, apă - până la 1 L și [Zn(Gly L-Ser)] 0,02...0,03, care se adaugă în rate: 1/3 în prima zi și 2/3 în a treia zi de cultivare, și cultivarea ei în regim de acumulare în decurs de 6 zile la o iluminare de 3000...4800 lx, temperatura de 30...35°C și pH 9,5...10,0.

Revendicări: 1

15

MD 3171 F1 2006.10.31

MD 3171 F1 2006.10.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de obținere a biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de zinc și poate fi aplicată în industria alimentară, farmaceutică, în medicina clinică și experimentală.

5 Este cunoscut procedeu de cultivare a spirulinei, în care biomasa de spirulină se cultivă pe mediul nutritiv modificat Zarrouk [1], în care în calitate de sursă de zinc este utilizată sarea anorganică a acestui bioelement $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Procedeu dat include: prepararea mediului nutritiv cu următoarea compoziție, g/L: $NaHCO_3$ 16,8, K_2HPO_4 0,1, KNO_3 2,5, $NaCl$ 1,0, K_2SO_4 3,75, $CaCl_2$ 0,04, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,70, H_3BO_3 0,00386, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,00181, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,00008, MoO_3 0,000015, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,024; Fe-EDTA 0,025 și $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,00022, inocularea spirulinei (0,4 g/L) și cultivarea ei în decurs de 6 zile în regim de acumulare la o iluminare de 3,0...4,8 mii lx, temperatura de $35 \pm 1^\circ C$, pH-ul optim al mediului de 9,5...10,0.

15 Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că cultivarea spirulinei pe mediul dat, conform parametrilor descriși, nu asigură acumularea în biomasă în cantități substanțiale a zincului și nici includerea lui eficientă în diverse fracții bioactive ale spirulinei, de aceea nu permite obținerea unei biomase de spirulină cu un conținut sporit de zinc.

20 Mai este cunoscut un procedeu de obținere a biomasei, care include cultivarea spirulinei pe un mediu nutritiv cu următoarea compoziție, g/L: $NaHCO_3$ 16,8, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1,0, $NaNO_3$ 2,5, $NaCl$ 1,0, K_2SO_4 1,0, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,04, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,20, H_3BO_3 0,00286, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,00181, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,00008, MoO_3 0,000015, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001, EDTA 0,08, apă și unul din compușii coordinați ai Zn(II): $[Zn(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O]$, sau $[Zn(CH_2ClCOO)_2 \cdot 4H_2O]$, sau $[Zn(CH_2BrCOO)_2 \cdot 4H_2O]$, sau $[Zn(CH_2Br_2COO)_2 \cdot 4H_2O]$, sau $[Zn(CCl_2COO)_2 \cdot 4H_2O]$, sau $[Zn(CBr_3COO)_2 \cdot 4H_2O]$, sau $[Zn(CH_2ClCOO)_2 \cdot 4H_2O]$, utilizați în calitate de sursă de zinc, care se adaugă la mediul în a treia zi de cultivare în concentrație de 0,005...0,020 g/L, cultivarea se realizează conform parametrilor: iluminarea de 3,0...4,8 mii lx, temperatura de 30...35°C [2].

25 Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că, deși permite creșterea productivității spirulinei și sporirea conținutului de aminoacizi și peptide, nu asigură o acumulare în cantități maxim prognozate a zincului.

30 Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de obținere a biomasei de spirulină cu un conținut sporit de zinc.

35 Problema se soluționează prin aceea că procedeu 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: $NaHCO_3$ 16,8, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1,0, $NaNO_3$ 2,5, $NaCl$ 1,0, K_2SO_4 1,0, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,04, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,20, H_3BO_3 0,00286, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,00181, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,00008, MoO_3 0,000015, apă până la 1 L și cultivarea ei în decurs de 6 zile în regim de acumulare la o iluminare de 3,0...4,8 mii lx, temperatura de 30°C, pH-ul optim al mediului 9,5...10,0 și este caracterizat prin aceea că în calitate de sursă de zinc se utilizează compusul coordinațiv al zincului $[Zn(Gly\ L-Ser)]$ adăugat în cantitate de 0,015...0,03 g/L în rate: 1/3 în prima și 2/3 în a treia zi de cultivare.

40 Rezultatul obținut constă în sporirea substanțială a conținutului de zinc (de circa 200 ori în comparație cu cea mai apropiată soluție) în biomasă de spirulină, inclus eficient în fracțiile de aminoacizi liberi, peptide, proteine și proteide, glucide.

45 Rezultatul invenției se datorează următoarelor: acumularea zincului în biomasă de spirulină are loc în baza unui mecanism de absorbție ionică pe contul transportului activ, conjugat cu fotosinteza. Procesul dat este condiționat de mecanismele realizate de sistemele energetice fermentative și de absorbție, legate de membrane și biocioni. Pentru glicinat L-serinatul de Zn(II) acest mecanism, după cum rezultă, implică stereospecificitatea unor enzime membranare, activate de către ionii de Zn^{2+} (semnificativi pentru transportul membranal), manifestată față de un anumit tip de substrat și care, pentru cazul nostru, controlează transformarea substratului cu configurația L. Ulterior, cationul Zn^{2+} este supus aceleiași mecanism de complexare prin coordonarea cu grupele funcționale ale compușilor macromoleculari din celulele spirulinei (COO^- ; $^+NH_3^-$; SH-; -S-S-; OH-; grupele alcoolilor primari și secundari, cetogrupele), care devin liganzi intracelulari eficienți pentru ionul de Zn^{2+} . Includerea eficientă a zincului în diverse fracții bioactive componente ale biomasei se datorează și proceselor de sinteză care sunt influențate și de pH-ul mediului de cultivare. Astfel, zincul în celule poate fi sub formă de ioni de zinc, care joacă un rol important în preîntâmpinarea disocierii compușilor macromoleculari zincocomponenți prin existența unei relații de echilibru: $Zn^{2+} + proteina = proteina + 2H^+$. Odată cu majorarea pH-ului are loc deplasarea acestui echilibru spre $Zn^{2+} + proteina$. Pe parcursul procesului de cultivare a spirulinei conform procedurii propusă valorile pH-ului, înregistrate inițial între 8,4...8,9, ulterior cresc, majorându-se până la 9,4...10,0, valori suficiente de înalte pentru a asigura includerea bioelementului în compușii proteici.

60

MD 3171 F1 2006.10.31

4

Sinteza compusului coordinativ [Zn(Gly L-Ser)]

- 5 La 0,82 g (0,01 moli) ZnO se adaugă 1,5 g (0,02 moli) glicină și 100 mL H₂O, amestecul se încălzește pe baie de apă și se agită timp de 30 min. Precipitatul se îndalătură prin filtrare, iar filtratul se evaporă. Se depun cristale de culoare albă, care se spală cu apă și se usucă la aer. Se obțin 0,75 g de [Zn(Gly L-Ser)]. În mod analogic compusul poate fi sintetizat din Zn(OH)₂.

Exemplu de realizare a invenției

- 10 Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență, g/L: 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, CuSO₄·5H₂O 0,00008, MoO₃ 0,000015, apă. La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,4 g/L, apoi sursa de zinc [Zn(Gly L-Ser)] în cantitate de 0,01 g/L.

- 15 Câte 100 mL suspensie se introduc în baloane Erlenmayer a câte 250 mL, unde se efectuează cultivarea în următoarele condiții: 3 mii lx, temperatura de 32°C și pH-ul mediului de cultivare de 8...9 în primele două zile ale cultivării.

După 48 ore (începutul fazei exponențiale) de cultivare se adaugă restul cantității de [Zn(Gly L-Ser)] - 0,02 g/L, cultivarea este continuată pe parcursul a 96 ore cu respectarea parametrilor: 4,8 mii lx, la temperatura de 35°C, pH-ul mediului de 9...10.

- 20 După 144 ore 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 zinc.

Biomasa obținută conține circa 385 mg% zinc și poate fi utilizată drept sursă pentru obținerea unor produse farmaceutice, inclusiv forme medicamentoase imunostimulente.

- 25 Conținutul de zinc în biomasa de *Spirulina platensis* la cultivare conform procedurii propus în invenție și conform celei mai apropiate soluții

Procedul utilizat	Compusul	Concentrația, g/L	Conținutul zincului în biomasa de spirulină, mg%
Conform celei mai apropiate soluții	[Zn(CH ₂ ClCOO) ₂ ·4H ₂ O] (suplimentarea în a III-a zi de cultivare)	0,02	98,75±3,05
Conform procedurii propus	[Zn(Gly L-Ser)]	0,03	385,0±4,8

- 30 Datele din tabel demonstrează că utilizarea glicinato L-serinatului de Zn(II) și adăugarea lui 1/3 în prima zi și 2/3 în ziua a treia asigură un conținut al zincului de 1,2...3,9 ori mai mare (385 mg% zinc în biomasa) în procedura propusă față de cea mai apropiată soluție (98,75...316,10 mg%).

MD 3171 F1 2006.10.31

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: 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, CuSO₄·5H₂O 0,00008, MoO₃ 0,000015, o sursă de zinc și apă până la 1 L, cultivarea ei în regim de acumulare în decurs de 6 zile la o iluminare de 3000...4800 lx, temperatura de 30...35°C, pH 9,5...10,0, **caracterizat prin aceea că** în calitate de sursă de zinc se utilizează [Zn(Gly L-Ser)] în cantitate de 0,02...0,03 g/L, care se adaugă în rate: 1/3 în prima zi și 2/3 în a treia zi de cultivare.
- 10

15

(56) Referințe bibliografice:

1. Rudic Valeriu. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău, Știința, 1993, p. 8–11
2. MD 2409 B2 2004.03.31

Director Departament:

JOVMIR Tudor

Examinator:

GUȘAN Ala

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2006 0058		(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2006.02.17		(86) Cerere internațională PCT:
<p>Prioritatea invocată :</p> <p>(31) nr.: 32) data : 33) țara :</p> <p>(51) : Int.Cl: <i>C12N 1/12</i> (2006.01) <i>C07F 3/06</i> (2006.01) <i>C07C 229/76</i> (2006.01) <i>A61K 36/05</i> (2006.01) <i>C12R 1/89</i> (2006.01)</p> <p>Alți indici de clasificare:</p> <p>Titlul : Procedeu de obținere a biomasei cianobacteriei <i>Spirulina platensis</i> (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : <i>Spirulina platensis</i>, cultivare, glicinato-serinatul de zinc</p>		
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 „nerepublică”)		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	1. Rudic Valeriu. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău, Știința, 1993, p. 8...11	1
A	2. MD 2409 B2 2004.03.31	1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> 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 evidența 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		10.08.2006
Examinatorul		Gușan Ala