



MD 3101 F1 2006.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 3101 (13) F1
(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

Table with 2 columns and 2 rows containing patent details: Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării; (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
inocularea suspensiei de Spirulina platensis in cantitate de 0,4 g/L și cultivarea ei în decurs de 6 zile in regim de acumulare la iluminarea de 3000...4800 lx, temperatura de 30...35°C și pH de 9,5...10,0. In 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

MD 3101 F1 2006.07.31

# MD 3101 F1 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.

10 Este cunoscut un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de ficobiliproteine și carotenoizi, care include inocularea și cultivarea acesteia pe un mediu nutritiv, 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 coordinați: azotat de hexa-?-glicinato(O,O')-?-3-oxo-triacvotri(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-triacvotri(III)-  $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Tre})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3$  sau hexa-?-alaninato(O,O')-?-3-oxo-triacvotri(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 mediul 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].

20 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 permite obținerea unei biomase de spirulină cu un conținut sporit de fier. Compusul coordinațiv 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.

25 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 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 coordinațiv  $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{THF})_3]$ , în concentrație de 0,040 - 0,050 g/L în rate: ? în prima zi de cultivare și ½ în a treia zi de cultivare.

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

40 Rezultatul obținut se datorează faptului că ligandul utilizat din compusul coordinațiv al Fe este 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 ( $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{SH}^-$ ,  $\text{S-S}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ), 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 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  $\text{Fe}^{3+}$ , 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 coordinațiv  $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{THF})_3]$  s-a efectuat conform C. Turtă, S. Shova, D. Prodius, V. Mereacre, M. Gdaniec, Yu. Simonov and Ja. Lipkowski „Novel heteronuclear ( $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mg}$ )- $\mu_3$ -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*

60 Se prepară mediul nutritiv cu următoarea compoziție, g/L:  $\text{NaHCO}_3 - 16,8$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 1,0$ ;  $\text{NaNO}_3 - 2,5$ ;  $\text{NaCl} - 1,0$ ;  $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$ ;  $\text{MoO}_3 - 0,000015$ . La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40 g/L, apoi ? (0,025 g/L) de  $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\text{CCl}_3\text{COO})_6(\text{THF})_3]$ .

# MD 3101 F1 2006.07.31

4

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

5

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.

10

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.

Tabel

Conținutul fierului în biomasa *Spirulina platensis*

15

Procedul 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.

20

## (57) Revendicare:

Procedul de obținere a biomasei de *Spirulina platensis*, care include prepararea mediului nutritiv, care conține, 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 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.

30

35

## (56) Referințe bibliografice:

1. MD 2386 C2 2004.02.29

**Șef Secție:** GUȘAN Ala

**Examinator:** BAZARENCO Tatiana

**Redactor:** LOZOVANU Maria