



MD 3128 G2 2006.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3128** <sup>(13)</sup> **G2**  
(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)  
*C07F 15/02* (2006.01)  
*C07F 3/02* (2006.01)  
*C07C 53/16* (2006.01)  
*A61K 36/05* (2006.01)  
*C12N 9/02* (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2006 0042 (22) Data depozit: 2006.01.31</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2006.08.31, BOPI nr. 8/2006</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BULIMAGA Valentina, MD; RUDIC Valeriu, MD; ZOSIM Liliana, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; TURTĂ Constantin, MD; PRODIUS Denis, MD; ȘOVA Sergiu, MD; MEREACRE Valeriu, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p>	

(54) Procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis*

(57) Rezumat:

1 Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis*, care poate fi utilizată în industria farmaceutică, precum și în medicina clinică și experimentală.

Procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* include prepararea mediului nutritiv, care conține, g/L de apă: NaHCO<sub>3</sub> - 16,8; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -1,0; KNO<sub>3</sub> - 3,75; NaCl - 1,0; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 3,75; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O - 0,04; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,70; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 0,00286; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O - 0,00181; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,00022; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O - 0,00008; MoO<sub>3</sub> - 0,000015, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,024; Fe-EDTA - 0,025, inocularea

2  
5 suspensiei de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 g/L și cultivarea ei în decurs de 6 zile în regim de acumulare la iluminarea de 3400...4800 lx, la temperatura de 31...36°C și pH de 9,5...10,0.

10 Noutatea invenției constă în aceea că în prima zi de cultivare în mediu se adaugă suplimentar compusul coordinativ [Fe<sub>2</sub>Mg(CCl<sub>3</sub>COO)<sub>6</sub>(CH<sub>3</sub>OH)<sub>3</sub>] în cantitate de 0,005...0,025 g/L.

15 Revendicări: 1

MD 3128 G2 2006.08.31

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis*, care poate fi utilizată în industria farmaceutică, medicina clinică și experimentală.

5 Se știe că superoxidismutaza (SOD) este o enzimă cu efect antioxidant, capabilă de a distruge radicalii liberi, protejând astfel organismul de acțiunea lor distrugătoare. De aceea este foarte actuală problema obținerii unor produse cu un conținut înalt de SOD, care ar putea fi utilizate atât ca supliment cu efect de lichidare a radicalilor liberi din organismul uman, cât și pentru obținerea unor preparate cu efect antioxidant și antiradicalic pentru profilaxia și combaterea cancerului, preîntâmpinarea îmbătrânirii pielii, protecția la iradiere etc.

10 Este cunoscut procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* în prezența citratului de Fe(III) și glicinatului de Mn(II) la realizarea căruia are loc majorarea activității SOD în biomasă. Dezavantajul constă în utilizarea compușilor în concentrații înalte – 60 și 40 mg/L, respectiv, ceea ce duce la diminuarea productivității spirulinei [1].

15 Mai este cunoscut procedeu de obținere a biomasei de spirulină [2] în care se utilizează mediul nutritiv modificat Zarrouk cu următoarea compoziție, g/L: NaHCO<sub>3</sub> – 16,8; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,1; KNO<sub>3</sub> – 3,75; NaCl – 1,0; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3,75; CaCl<sub>2</sub> – 0,04; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,7; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,00286; MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O – 0,00181; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,00022; MoO<sub>3</sub> – 0,000015, ce conține FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,024; Fe-EDTA – 0,025 în calitate de sursă de Fe, apă – până la 1L; cultivarea are loc în regim de acumulare timp de 6 zile, iluminarea de 15...24 mii ergi/cm<sup>2</sup> · s, temperatura de 35<sup>o</sup>±1<sup>o</sup>C, pH-ul optim al mediului fiind 9,5...10,0.

20 Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că mediul utilizat nu asigură o activitate suficient de înaltă a SOD în biomasa de spirulină.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de obținere a biomasei cianobacteriei de *Spirulina platensis* care ar asigura sporirea activității superoxidismutazei în biomasa de spirulină.

25 Procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* include prepararea mediului nutritiv, care conține, g/L de apă: NaHCO<sub>3</sub> – 16,8; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0; KNO<sub>3</sub> – 3,75; NaCl – 1,0; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3,75; CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O – 0,04; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,70; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,00286; MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O – 0,00181; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,00022; CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O – 0,00008; MoO<sub>3</sub> – 0,000015, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,024; Fe-EDTA – 0,025, inocularea suspensiei de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 g/L și cultivarea ei în decurs de 6 zile în regim de acumulare la iluminarea de 3400...4800 lx, la temperatura de 31...36<sup>o</sup>C și pH de 9,5...10,0. În prima zi de cultivare în mediu se adaugă suplimentar compusul coordinativ [Fe<sub>2</sub>Mg(CCl<sub>3</sub>COO)<sub>6</sub>(CH<sub>3</sub>OH)<sub>3</sub>] în cantitate de 0,005...0,025 g/L.

30 Rezultatul invenției în comparație cu cea mai apropiată soluție constă în obținerea biomasei de spirulină cu o activitate a SOD de 2,2 mai sporită.

35 Rezultatul obținut se datorează faptului că compusul coordinativ utilizat [FeMgO(CCl<sub>3</sub>COO)<sub>6</sub>(CH<sub>3</sub>OH)<sub>3</sub>] provoacă stresul oxidativ în celulele de spirulină; datorită componenței chimice a liganzilor din sfera internă, care sunt reprezentanți de câte 6 resturi de tricloracetat și 3 molecule de metanol. Nu poate fi exclus și aportul fierului în procesul de formare a radicalilor liberi, ceea ce poate contribui la creșterea activității SOD.

40 Sinteza complexului [Fe<sub>2</sub>MgO(CCl<sub>3</sub>COO)<sub>6</sub>(CH<sub>3</sub>OH)<sub>3</sub>] trimetanol-hexakis S-N-tricloracetato(O,O')- $\eta^3$ -oxo-difier (III)magneziu (II).

45 2,4 g (0,06 moli) NaOH s-au dizolvat în 7 ml de apă. La soluția obținută s-au adăugat 9,81 g (0,06 moli) CCl<sub>3</sub>COOH. Aparte, în 30 ml apă s-au dizolvat 10,0 g (0,025 moli) Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O și 26,8 g (0,125 moli) Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O. Soluțiile obținute s-au amestecat împreună. Amestecul obținut s-a încălzit timp de 2 ore la temperatura de 60±5<sup>o</sup>C cu agitare permanentă. La răcirea soluției se sedimentează un praf cristalin de culoare roșie-violet. Sedimentul format s-a filtrat și s-a dizolvat în amestec de metanol, acetonitril și toluen în raport volumetric de 0,5 : 1,0 : 25,0 (ml). Soluția obținută a fost păstrată la aer pentru cristalizare.

50 Peste 2 zile s-au depus monocristale prismatice de culoare roșie, care au fost filtrate, spălate o dată cu metanol, apoi de trei ori cu toluen și uscate la aer. Randamentul după fier este de 4,55 g (57%). Substanța este bine solubilă în metanol, acetonitril, insolubilă în eter, toluen.

Pentru	C	H	Fe	Mg
C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>18</sub> O <sub>16</sub> Fe <sub>2</sub> Mg				
găsit, %:	14,69	1,10	9,12	1,92
calculat, %:	14,74	0,99	9,14	1,99

55 Frecvențe analitice pentru liganzii carboxilici în spectrele IR sunt oscilațiile de valență  $\nu_{as}$  și  $\nu_s$  ale grupelor COO<sup>-</sup>. Pentru clusterul sintetizat aceste două benzi sunt prezente în regiunea 1580 cm<sup>-1</sup> și 1450 cm<sup>-1</sup>, respectiv, pentru oscilațiile asimetrice și simetrice ale grupei COO<sup>-</sup>.

# MD 3128 G2 2006.08.31

4

## Exemple de realizare a invenției

### Exemplul 1

5 Se prepară mediul nutritiv cu următoarea compoziție, g/L: NaHCO<sub>3</sub> – 16,8, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,1, KNO<sub>3</sub> – 3,75, NaCl – 1,0, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3,75, CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O – 0,04, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,7, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,00286, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O – 0,00181, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,00022, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O – 0,00008, MoO<sub>3</sub> – 0,000015, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,024, Fe-EDTA – 0,025, apă – până la 1L. Se introduce suspensia de spirulină în cantitate de 0,4 g/L. În prima zi de cultivare la mediul nutritiv se adaugă [Fe<sub>2</sub>MgO(CCl<sub>3</sub>COO)<sub>6</sub>(CH<sub>3</sub>OH)<sub>3</sub>] în cantitate de 0,025 g/L. Cultivarea se desfășoară timp de 6 zile, respectând parametrii: temperatura de 32°C, pH-ul – 8...9, iluminarea de 3600 lx, în primele 2 zile ale cultivării. Pentru următoarele zile ale cultivării se menține

10

temperatura de 34°C, pH-ul 9,5...10, iluminarea 4800 lx.  
La ziua a 6-a se determină activitatea SOD. Productivitatea spirulinei la ziua a șasea este de 1,86 g/L biomasă absolut uscată.

Activitatea SOD în biomasă de spirulină este de 2,2 ori mai sporită față de soluția cea mai apropiată.

15

Tabel

Activitatea SOD în biomasă de *Spirulina platensis* obținută conform procedurii propus în invenție și celui din soluția cea mai apropiată

Procedul utilizat	Compusul	Concentrația, g/L	Activitatea SOD, unități convenționale	%
Conform celei mai apropiate soluții	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O Fe-EDTA	0,024 0,025	0,42±0,24	100
Conform invenției	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O Fe-EDTA [Fe <sub>2</sub> MgO(CCl <sub>3</sub> COO) <sub>6</sub> (CH <sub>3</sub> OH) <sub>3</sub> ]	0,024 0,025 0,025	1,29±0,13	222,3

20

# MD 3128 G2 2006.08.31

5

## (57) Revendicare:

5       Procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis*, care include prepararea mediului nutritiv, care  
conține, g/L de apă: NaHCO<sub>3</sub> - 16,8; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -1,0; KNO<sub>3</sub> - 3,75; NaCl - 1,0; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 3,75; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O -  
0,04; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,70; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 0,00286; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O - 0,00181; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,00022;  
10       CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O - 0,00008; MoO<sub>3</sub> - 0,000015, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,024; Fe-EDTA - 0,025, inocularea suspensiei  
de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,40...0,45 g/L și cultivarea ei în decurs de 6 zile în regim de  
acumulare la iluminarea de 3400...4800 lx, la temperatura de 31...36°C și pH de 9,5...10,0, **caracterizat**  
**prin aceea că** în prima zi de cultivare în mediu se adaugă suplimentar compusul coordinativ  
[Fe<sub>2</sub>Mg(CCl<sub>3</sub>COO)<sub>6</sub>(CH<sub>3</sub>OH)<sub>3</sub>] în cantitate de 0,005...0,025 g/L.

15

## (56) Referințe bibliografice:

1. Ефремова Н. Изучение влияния цитрата Fe (III) и комплексных соединений Mn (II) на содержание супероксиддисмутазы в биомасе цианобактерии *Spirulina platensis*. Резюме работы. Конференция Международная а Тинерилор Церчетători, 11 noiembrie, 2005, p. 37
2. Rudic Valeriu. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău, Știința, 1993 p. 8-11

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria