

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de extragere a ficocianinei din biomasa algei *Spirulina platensis* pentru utilizare în calitate de colorant cu proprietăți antioxidante.

Cererea crescândă de consum pentru aditivi alimentari și cosmetici, inclusiv și coloranți naturali, necesită dezvoltarea eficientă a unor resurse naturale și renovabile. Printre resursele naturale înalt eficiente, cianobacteria *Spirulina platensis* este explorată pe larg în ultimii ani în calitate de producător de ficobiliproteine, în special de ficocianină. Ficocianina este utilizată în calitate de colorant alimentar pentru prepararea unor astfel de produse ca gumele de mestecat, gelurile, înghețata, produsele lactate, precum și în cosmetică, în calitate de colorant, precum și ca agent de tratare a bolilor de piele. Nu mai puțin importante sunt și rezultatele studiilor care confirmă capacitatea antioxidantă, antibacteriană, anticancerigenă, efectele antiinflamatorii, neuroprotective și hepatoprotective ale ficocianinei. Obținerea și utilizarea ficocianinei în calitate de colorant cu proprietăți antiradicalice sunt limitate din cauza costului înalt de producere, ceea ce necesită elaborarea unor procedee mai simple și eficiente de extragere și separare a acestui pigment.

Este cunoscut un procedeu de extragere a ficocianinei din biomasa de spirulină care include următoarele etape: suspendarea biomasei algale (2-12 g/l) în sol de 10 g/l CaCl_2 și distrugerea pereților celulari cu adăugarea mărgelilor de sticlă cu diametrul de 0,8-1,0 mm, agitare la viteza de 1500 rpm (rot/min), și extragerea ficocianinei în sistemul de două faze apoase prin adăugarea polietilenglicolului (PEG) 1450 și fosfatului de potasiu în concentrații finale de 7 și 20%, respectiv, ajustarea pH-ului cu acid fosforic până la valoarea 6,5, urmată de centrifugarea și separarea fazelor. Procedul permite obținerea ficocianinei cu puritatea (A620/A280) egală cu 1,7 cu un randament de 7-14,4%, recalculat la biomasa uscată [1].

Dezavantajul procedurii constă în puritatea joasă (A620/A280 = 1,3-1,7 și randamentul diminuat (7-14,4%) al ficocianinei, precum și instabilitatea ei la păstrare în soluție de CaCl_2 .

Soluția cea mai apropiată de obiectul revendicat reprezintă procedul de extracție a ficocianinei din biomasa de spirulină care include etape de: demineralizare, suspendare în apă, agitare, congelare-decongelare în 2 repetiții cu scopul distrucției pereților celulari, centrifugare și extracția sedimentului prin utilizarea soluției etanolice [2].

Dezavantajul procedurii constă în obținerea unor indicatori mici ai purității, randamentului de obținere și duratei de păstrare a ficocianinei la întuneric.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de extragere a ficocianinei din biomasa de spirulină, care micșorează durata procesului și asigură o puritate și un randament înalt, precum și o stabilitate de lungă durată a ficocianinei la păstrare în condiții de întuneric la temperaturile de 0-4°C și 10-15°C.

Esența invenției constă în faptul, că se propune un procedeu de extragere a ficocianinei din biomasa de spirulină care include etapele: separarea biomasei de lichid cultural, suspendarea biomasei în soluție, dezagregarea celulelor și extragerea ficocianinei la agitare suspensiei, urmată de separarea extractului prin centrifugare, caracterizat prin aceea că biomasa, înainte de extragere, este demineralizată și trecută în suspensie apoasă, după care urmează dezagregarea celulelor prin congelare-decongelare și extragerea ficocianinei cu soluție alcoolică de 10%-20%, ce conține CaCl_2 în concentrație de 5-10 g/l.

Rezultatul tehnic obținut constă în majorarea purității ficocianinei extrase de 1,7-2,4 ori și a randamentului de 1,6-3,2 ori (în comparație cu soluția cea mai apropiată), precum și a duratei de păstrare la întuneric până la 30 și 185 zile la temperaturile de 10-15°C și 0-4°C, respectiv.

Rezultatul tehnic se datorează extragerii selective și complete a ficocianinei în cazul utilizării în calitate de extragenți a CaCl_2 și soluției alcoolice, care posedă și efect sinergetic de conservare.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Biomasa de spirulină cultivată în decurs de 12 zile se separă de lichidul cultural prin filtrare, se spală consecutiv cu soluție de 1,5% acetat de amoniu și apă distilată în raport de (1:1), se suspendă în apă distilată (20mg/ml) și se supune congelării – decongelării de 2 ori. La suspensie se adaugă 3 volume de soluție alcoolică de 13,3%, ce conține 10 g/l CaCl_2 și se agită periodic în decurs de 45 min. Se centrifughează la 6 mii rotații/min timp de 20 minute și se examinează supernatantul obținut. Se măsoară absorbanta la 620, 650 și la 280 nm. Se determină puritatea ficocianinei prin raportul A620/A280. Cantitatea de ficocianină (mg/ml) se determină după formula: $(A620 - 0,474A650)/5,34$ și randamentul ei în % prin recalcul la biomasa uscată.

Exemplul 2

Biomasa de spirulină cultivată în decurs de 12 zile se separă de lichidul cultural prin filtrare, se spală consecutiv cu soluție de 1,5% acetat de amoniu și apă distilată în raport de (1:1), se suspendă în apă distilată (20mg/ml) și se supune congelării – decongelării de 2 ori. La suspensie se adaugă 2 volume de soluție alcoolică de 15%, ce conține 10 g/l CaCl_2 și se agită în decurs de 45 min. Se centrifughează la 6 mii rotații/min timp de 20 minute și se examinează supernatantul obținut. Se măsoară absorbanta la 620, 650 și la 280 nm. Se determină puritatea ficocianinei prin raportul A620/A280. Cantitatea de ficocianină (mg/ml) se determină după formula: $(A620 - 0,474A650)/5,34$ și randamentul ei în % prin recalcul la biomasa uscată.

Exemplul 3

Biomasa de spirulină cultivată în decurs de 12 zile se separă de lichidul cultural prin filtrare, se spală consecutiv cu soluție 1,5% acetat de amoniu și apă distilată în raport de (1:1), se suspendă în apă distilată (20mg/ml) și se supune congelării – decongelării de 2 ori. La suspensie se adaugă 1 volum de soluție alcoolică de 20%, ce conține 10 g/l CaCl_2 și se agită în decurs de 45 min. Se centrifughează la 6 mii rotații/min timp de 20 minute și se examinează supernatantul obținut. Se măsoară absorbanta la 620, 650 și la 280 nm. Se determină puritatea ficocianinei prin

raportul A620/A280. Cantitatea de ficocianină (mg/ml) se determină după formula: $(A620-0,474A650)/5,34$ și randamentul ei în % prin recalcul la biomasa uscată.

Rezultatele obținute privind puritatea și randamentul ficocianinei extrase din biomasa de spirulină sunt prezentate în tabel.

Tabel

Puritatea și randamentul ficocianinei extrase din biomasa de spirulină

Procedeul utilizat	Concentrația biomasei, g/l	Puritatea ficocianinei A620/A280	Randamentul ficocianinei, %	Durata de păstrare la întuneric, zile	
				0-4°C	10-15°C
Conform soluției cele mai apropiate: Extragerea ficocianinei din biomasa de <i>Sp. platensis</i>	2,0	1,35	15,4	7	2
	6,0	1,38	8,7	7	2
	12,0	1,75	8,0	7	2
Conform soluției propuse în invenție: Extragerea ficocianinei din biomasa de <i>Sp.platensis</i>	5,0	3,17	24,8	185	30
	6,7	2,98	25,0	185	30
	10,0	2,90	25,9	185	30

Astfel, în comparație cu soluția cea mai apropiată, rezultatele obținute conform soluției propuse de invenție, demonstrează majorarea purității ficocianinei extrase de 1,7-2,4 ori și a randamentului de 1,6-3,2 ori, precum și creșterea duratei de păstrare la întuneric până la 30 și 185 zile la temperaturile de 10-15°C și 0-4°C, respectiv.

Mai jos sunt prezentate exemple de extragere a ficocianinei din biomasa *Spirulina platensis*, realizate conform soluției celei mai apropiate.

Exemplul 1

Biomasa de *Spirulina platensis*, cultivată în decurs de 12 zile, este separată de lichidul cultural și suspendată în sol de 10 g/l CaCl₂ (2 g/l), după care se efectuează distrugerea pereților celulari cu adăugarea mărgelilor de sticlă cu diametrul de 0,8-1,0mm, agitare la viteza de 1500 rpm (rot/min), și extragerea ficocianinei în sistemul de 2 faze apoase prin adăugarea polietilenglicolului (PEG) 1450 și fosfatului de potasiu în concentrații finale de 7 și 20%, respectiv, ajustarea pH-ului cu acid fosforic până la valoarea 6,5, urmată de centrifugare și separarea fazelor. Procedeul permite obținerea ficocianinei cu puritatea (A620/A280) egală cu 1,35 și un randament de 15,4%, recalculat la biomasa uscată.

Exemplul 2

Biomasa de *Spirulina platensis*, cultivată în decurs de 12 zile, este separată de lichidul cultural și suspendată în sol de 10 g/l CaCl₂ (6 g/l), după care se efectuează distrugerea pereților celulari cu adăugarea mărgelilor de sticlă cu diametrul de 0,8-1,0 mm, agitare la viteza de 1500 rpm (rot/min), și extragerea ficocianinei în sistemul de 2 faze apoase prin adăugarea polietilenglicolului (PEG) 1450 și fosfatului de potasiu în concentrații finale de 7 și 20%, respectiv, ajustarea pH-ului cu acid fosforic până la valoarea de 6,5, urmată de centrifugare și separarea fazelor. Procedeul permite obținerea ficocianinei cu puritatea (A620/A280) egală cu 1,38 și un randament de 8,7%, recalculat la biomasa uscată.

Exemplul 3

Biomasa de *Spirulina platensis*, cultivată în decurs de 12 zile, este separată de lichidul cultural și suspendată în sol de 10 g/l CaCl₂ (12 g/l), după care se efectuează distrugerea pereților celulari cu adăugarea mărgelilor de sticlă cu diametrul de 0,8-1,0 mm, agitare la viteza de 1500 rpm (rot/min), și extragerea ficocianinei în sistemul de 2 faze apoase prin adăugarea polietilenglicolului (PEG) 1450 și fosfatului de potasiu în concentrații finale de 7 și 20%, respectiv, ajustarea pH-ului cu acid fosforic până la valoarea 6,5, urmată de centrifugare și separarea fazelor. Procedeul permite obținerea ficocianinei cu puritatea (A620/A280) egală cu 1,75 și un randament de 8%, recalculat la biomasa uscată.