



MD 4278 C1 2014.10.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4278** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07F 15/06* (2006.01)
C07C 251/70 (2006.01)
C07D 213/88 (2006.01)
C07D 401/02 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2013 0026 (22) Data depozit: 2013.04.30	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2014.03.31, BOPI nr. 3/2014
<p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p> <p>(72) Inventatori: CIOBĂNICĂ Olga, MD; RUDIC Valeriu, MD; BULHAC Ion, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDI Liudmila, MD; BOUROȘ Polina, MD; MISCU Vera, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; SADOVNIC Daniela, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) **Compusul bis{bis(dimetilglioximato)cloro}-μ-3-formilpiridinizonicotinoilhidrazonă-di-cobalt(III) și procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și biotehnologie, în special la un compus coordinativ al cobaltului(III) și la un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia.

Conform invenției, se revendică un compus coordinativ - bis{bis(dimetilglioximato)cloro}-μ-3-formilpiridinizonicotinoilhidrazonă-di-cobalt(III), ce sporește sinteza lipidelor și acidului eicosapentaenoic.

De asemenea, se revendică un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum*, care constă în aceea că se cultivă microalga pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaNO₃ - 5,0;

NaCl - 7,0; KCl - 7,5; MgSO₄·7H₂O - 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K₂HPO₄ - 0,2; FeCl₃·6H₂O - 0,0027; ZnSO₄·5H₂O - 0,00002; CuSO₄·5H₂O - 0,00005; MnSO₄·5H₂O - 0,0003; H₃BO₃ - 0,0006; MoO₃ - 0,00002; NaVO₃ - 0,00005; compusul bis{bis(dimetilglioximato)cloro}-μ-3-formilpiridinizonicotinoilhidrazonă-di-cobalt(III) - 0,008...0,012 și apă distilată până la 1 L, având pH-ul 6,8...7,2; la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare lentă periodică.

Revendicări: 2

MD 4278 C1 2014.10.31

(54) Compound bis{bis(dimethylglyoximato)chloro}- μ -3-formylpyridineisonicotinoylhydrazone-di-cobalt(III) and process for cultivation of microalga *Porphyridium cruentum* with its use

(57) Abstract:

1

The invention relates to chemistry and biotechnology, namely to a coordinative compound of cobalt(III) and a process for cultivation of microalga *Porphyridium cruentum* with its use.

According to the invention, a coordinative compound - bis{bis(dimethylglyoximato)chloro}- μ -3-formylpyridineisonicotinoylhydrazone-di-cobalt(III) is claimed, which increases lipid and eicosapentaenoic acid synthesis.

It is also claimed a process for cultivation of microalga *Porphyridium cruentum*, which consists in that microalga is cultivated on a nutrient medium containing, g/L: NaNO_3 -

2

5.0; NaCl - 7.0; KCl - 7.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1.8; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0.15; KBr - 0.05; KI - 0.05; K_2HPO_4 - 0.2; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.0027; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.00002; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.00005; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.0003; H_3BO_3 - 0.0006; MoO_3 - 0.00002; NaVO_3 - 0.00005; the compound bis{bis(dimethylglyoximato)chloro}- μ -3-formylpyridineisonicotinoylhydrazone-di-cobalt(III) - 0.008...0.012 and distilled water up to 1 L, having pH 6.8...7.2; at the temperature of 23...25°C, the light of 2000...3000 lx/cm², with slow periodical agitation.

Claims: 2

(54) Соединение бис{бис(диметилглиоксимато)хлор}- μ -3-формилпиридинизоникотиноилгидразон-ди-кобальт(III) и способ культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum* с его использованием

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии и биотехнологии, в частности к координационному соединению кобальта(III) и к способу культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum* с его использованием.

Согласно изобретению, заявляется координационное соединение - бис{бис(диметилглиоксимато)хлор}- μ -3-формилпиридинизоникотиноилгидразон-ди-кобальт(III), которое повышает синтез липидов и эйкосапентаеновой кислоты.

Также, заявляется способ культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum*, который состоит в том, что культивируют микроводоросль на питательной среде, которая содержит, г/л:

2

NaNO_3 - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,8; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K_2HPO_4 - 0,2; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,0027; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,00002; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,00005; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0003; H_3BO_3 - 0,0006; MoO_3 - 0,00002; NaVO_3 - 0,00005; соединение бис{бис(диметилглиоксимато)хлор}- μ -3-формилпиридинизоникотиноилгидразон-ди-кобальт(III) - 0,008...0,012 и дистиллированную воду до 1 л, имея pH 6,8...7,2; при температуре 23...25°C, освещении 2000...3000 лк/см², с медленным периодическим перемешиванием.

П. формулы: 2

Descriere:

Invenția se referă la chimie și biotehnologie, în special la un compus coordinativ al cobaltului(III) și la un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia.

Este cunoscut că concentrațiile relativ mici de cobalt în mediu nutritiv induc unele modificări ale reacțiilor enzimaticе, ca rezultat are loc intensificarea proceselor metabolice. S-a determinat că ionii de Co^{2+} în concentrații mici intensifică reacțiile de fosforilare și posedă efect antioxidant, inhibând peroxidarea lipidelor membranice [1].

Este cunoscut procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* pe mediul nutritiv mineral ce conține, g/L: NaNO_3 - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,8; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K_2HPO_4 - 0,2; 1,0 ml soluție de microelemente care conține, în g/L: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,0027; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,00002; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,00005; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0003; H_3BO_3 - 0,0006; MoO_3 - 0,00002; NaVO_3 - 0,00005 și apă distilată până la 1L; pH-ul 6,8...7,2, temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm². În calitate de stimulator mediul mineral conține compusul coordinativ cu formula generală $1,2[\text{Co}(\text{NH}_3)\text{Bren}_2]\text{S}_2\text{O}_6$ în concentrație de 1,5 mg/L. Biomasa obținută conține 10,8% lipide. Conținutul acidului eicosapentaenoic este de 0,4% BAU (biomasa absolut uscată), iar cantitatea acidului arahidonic este de 0,5% BAU [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în conținutul redus al acidului eicosapentaenoic în biomasa de *Porphyridium cruentum* (0,4% BAU).

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu eficient și reproductibil de sporire a conținutului de lipide și acid eicosapentaenoic în biomasa de *Porphyridium cruentum*.

Conform invenției, se revendică compusul coordinativ bis{bis(dimetilgloximato)cloro}- μ -3-formilpiridinizonicotinoilhidrazonă-di-cobalt(III), ce sporește sinteza lipidelor și a acidului eicosapentaenoic.

De asemenea, se revendică un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum*, care constă în aceea că se cultivă microalga pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaNO_3 - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,8; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K_2HPO_4 - 0,2; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,0027; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,00002; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,00005; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0003; H_3BO_3 - 0,0006; MoO_3 - 0,00002; NaVO_3 - 0,00005; compusul bis{bis(dimetilgloximato)cloro}- μ -3-formilpiridinizonicotinoilhidrazonă-di-cobalt(III) - 0,008...0,012 și apă distilată până la 1 L, având pH-ul 6,8...7,2; la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare lentă periodică.

Compusul revendicat, proprietățile lui și procedeu de obținere nu sunt descrise în literatura de specialitate.

Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea biomasei de *Porphyridium cruentum* cu un conținut de lipide mai mare cu 23,6...25% și a cantității acidului eicosapentaenoic de 5,15...5,2 ori mai mare față de cea mai apropiată soluție. Administrarea compusului din prima zi de cultivare stimulează acumularea lipidelor și a acidului eicosapentaenoic în biomasa microalgei.

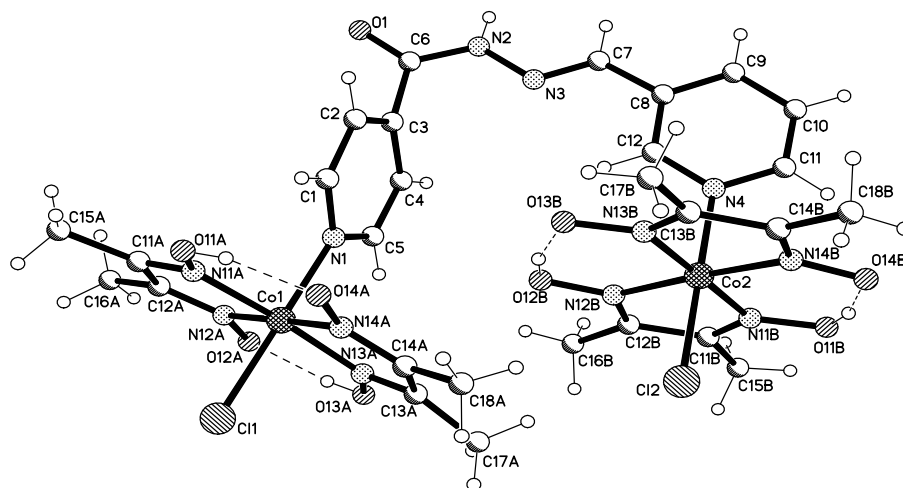
Rezultatul invenției este condiționat de aplicarea, pentru prima dată, a compusului bis{bis(dimetilgloximato)cloro}- μ -3-formilpiridinizonicotinoilhidrazonă-di-cobalt(III) în calitate de stimulator al acumulării lipidelor și a biosintezei acidului gras eicosapentaenoic în biomasa de *Porphyridium cruentum*. Compusul dat în concentrația propusă se manifestă în calitate de stimulator al lipidogenezei la *Porphyridium cruentum*, fapt confirmat prin lipsa unui efect inhibitor asupra producerii de biomasă.

Procedeu de obținere a compusului este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 75% față de cel teoretic calculat. Compusul revendicat este stabil în contact cu aerul, solubil în alcoolii, bine solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxid, puțin solubil în apă, practic insolubil în eter dietilic.

Exemplu de obținere a bis{bis(dimetilgloximato)cloro}- μ -3-formilpiridinizonicotinoilhidrazonă-di-cobalt(III)

La suspensia metanolică, care conține 0,08 g de $[\text{CoCl}(\text{DmgH})_2(\text{H}_2\text{O})]$, unde $(\text{DmgH})_2$ – dimetilglioximă în 15 mL metanol, încălzită și amestecată în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic, se adaugă 10 mL de soluție metanolică ce conține 0,03 g de 3-piridincarbaldahidaizonicotinoilhidrazonă (HL). În continuare, amestecul reactant se refluxează timp de o oră, utilizând un refrigerent ascendent. La răcire și evaporare lentă în soluție se depun cristale rombice de culoare cafenie deschisă, care se filtrează și se usucă la aer.

S-a determinat, %: Co-13,09; C-38,12; H-3,99; N-19,02. Pentru $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{Co}_2\text{N}_{12}\text{O}_9\text{Cl}_2$: s-a calculat, %: Co-13,46; C-38,41; H-4,38; N-19,20. Structura moleculară și cristalină a $[\text{Co}_2\text{Cl}_2(\text{DmgH})_4(\text{HL})]$ a fost determinată, aplicând metoda difracției razelor X și este prezentată mai jos.



MD 4278 C1 2014.10.31

5

avand pH-ul 6,8...7,2, la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare lentă periodică. Conținutul de lipide în biomasa obținută constituie 13,35±0,28%, față de 10,8% BAU în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Conținutul acidului eicosapentaenoic este de 2,06% BAU față de 0,4% BAU în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul).

Exemplul 2

Se prepară mediul nutritiv mineral cu următorul conținut al componentelor, g/L: NaNO₃ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; MgSO₄·7H₂O - 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K₂HPO₄ - 0,2; 1,0 ml soluție microelemente, care conține, în g/L: FeCl₃·6H₂O - 0,0027; ZnSO₄·5H₂O - 0,00002; CuSO₄·5H₂O - 0,00005; MnSO₄·5H₂O - 0,0003; H₃BO₃ - 0,0006; MoO₃ - 0,00002; NaVO₃ - 0,00005 și apă distilată până la 1L. În prima zi de cultivare în calitate de stimulator al activității antioxidante se adaugă bis{bis(dimetilgliximato)cloro}-μ-3-formilpiridinizonicotinoilhidrazonă-di-cobalt(III) în concentrație de 0,012 g/L.

Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 100 mL cu 50 mL de suspensie, avand pH-ul 6,8...7,2, la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare lentă periodică. Conținutul de lipide în biomasa obținută constituie 13,5±0,66%, față de 10,8% BAU în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Conținutul acidului eicosapentaenoic este de 2,1% BAU față de 0,4% BAU în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul).

Tabel

Conținutul de lipide și acid eicosapentaenoic în biomasa de *Porphyridium cruentum* obținută la cultivarea conform procedurii revendicat și celei mai apropiate soluții

Procedeele aplicate	Concentrația compusului revendicat, g/L	Conținutul de lipide, % BAU/conținutul acidului eicosapentaenoic, % BAU
Conform celei mai apropiate soluții	0,0015	10,8/0,4
Conform soluției revendicate	0,008	13,35±0,28 / 2,06±1,14
	0,012	13,5±0,66% / 2,1±1,22

Datele din tabel demonstrează creșterea conținutului de lipide în biomasa de *Porphyridium cruentum* cu 23,6...25% conform procedurii revendicat față de procedeele celei mai apropiate soluții și sporul de 5,15...5,25 ori a conținutului acidului eicosapentaenoic. Biomasa microalgei *Porphyridium cruentum* reprezintă o sursă de acid gras omega-3 și acid eicosapentaenoic, iată de ce posibilitatea sporirii biosintezei acidului eicosapentaenoic în biomasa de *Porfiridium* prezintă un interes pentru ficobiotehnologie.

Proprietățile compusului bis{bis(dimetilgliximato)cloro}-μ-3-formilpiridinizonicotinoilhidrazonă-di-cobalt(III) prezintă interes pentru aplicare în biotehnologie în calitate de stimulator al lipidogenezei la microalga *Porphyridium cruentum*.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Traviesto L., Pellon A., Benitez F. Et all. BIOALGA reactor: preliminary studies for heavy metals removal. Biochemical Engineering Journal, 2002, v. 12, p.87-91
2. Rudi L., Cepoi L., Cojocari A., Miscu V., Ițco Iu., Rudic V. Acumularea acizilor arahidonic și eicosapentaenoic de către *Porphyridium cruentum* CNM AR-01 sub influența cobaltului. Buletinul AȘM, seria Științele vieții, nr. 1(304), 2008, p. 126-132

(57) Revendicări:

1. Compusul bis{bis(dimetilglioximato)cloro}- μ -3-formilpiridinizonicotinoilhidrazonă-di-cobalt(III) ce sporește sinteza lipidelor și acidului eicosapentaenoic.
2. Procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum*, care constă în aceea că se cultivă microalga pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaNO₃ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; MgSO₄·7H₂O - 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K₂HPO₄ - 0,2; FeCl₃·6H₂O - 0,0027; ZnSO₄·5H₂O - 0,00002; CuSO₄·5H₂O - 0,00005; MnSO₄·5H₂O - 0,0003; H₃BO₃ - 0,0006; MoO₃ - 0,00002; NaVO₃ - 0,00005 și apă distilată până la 1 L, având pH-ul 6,8...7,2; la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare lentă periodică, **caracterizat prin aceea că** mediul conține suplimentar compusul bis{bis(dimetilglioximato)cloro}- μ -3-formilpiridinizonicotinoilhidrazonă-di-cobalt(III) în concentrație de 0,008...0,012 g/L.

Director Departament:

GUSAN Ala

Examinator:

IUSTIN Viorel

Redactor:

LOZOVANU Maria