

# REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3781** <sup>(13)</sup> **G2**  
(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)  
*C12N 9/02* (2006.01)  
*A61K 36/05* (2006.01)  
*A61K 38/44* (2006.01)  
*A61K 38/41* (2006.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2008 0079 (22) Data depozit: 2008.03.18	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2008.12.31, BOPI nr. 12/2008
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; BULIMAGA Valentina, MD; EFREMOVA Nadejda, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) **Procedeu de obținere a preparatului antioxidant termostabil din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis***

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de obținere a preparatului antioxidant din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*, utilizat în industria farmaceutică și cosmetologie.

Procedeul, conform invenției, include cultivarea biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* în reactoare de tip deschis pe un mediu de cultură Gromov cu adăugarea compusului coordinativ cu acidul tartric și imidazol  $[Mn(COO(CHOH)_2COO)(C_3N_2H_4)_2(H_2O)_2] \cdot nH_2O$  în concentrație de 20 mg/L la temperatura de 30...35°C, separarea biomasei de mediul de cultură, distrugerea celulelor prin congelare-decongelare

2

repetată, extragerea fracției proteice cu 0,1 M tampon fosfat de Na cu pH 7,8...8,0 cu adăugarea a 10 mM EDTA, fracționarea fracției proteice prin precipitare izoelectrică la pH 3,8...4,0, centrifugarea cu separarea ulterioară a precipitatului, concentrarea supernatantului ce conține superoxid-dismutază și ficocianină utilizând reagentul polietilenglicol Mr 40000 Da și congelarea.

Rezultatul constă în obținerea unui preparat termostabil cu activitate antioxidantă înaltă.

Revendicări: 1

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de obținere a preparatului anti-oxidant din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*, utilizat în industria farmaceutică și cosmetologie.

5 Este cunoscut faptul că superoxidismutaza (SOD) joacă un rol principal în sistemele de protecție a celulelor contra influenței negative a stresului oxidativ. SOD este o enzimă cu efect antioxidant, capabilă de a distruge radicalii liberi, protejând astfel organismul de acțiunea lor distrugătoare. Preparatele antioxidante pe baza enzimei SOD sunt utilizate cu succes la tratarea osteoartritei, alveolitei pulmonare, la profilaxia și combaterea cancerului, preîntâmpinarea îmbătrânirii pielii, protecția contra razelor UV etc.

10 Este cunoscut procedeu de producere și extragere a antioxidanților din cultura de microorganismele. Procedeu constă în cultivarea microalgelor într-un fotoreactor închis, suspensionarea microalgelor în mediul de cultură, colectarea oxigenului produs de microalge și reinjectarea în mediul de cultură, separarea de la mediul de cultură, diluarea microalgelor, distrugerea în ciclu presiune-vacuum în omogenizator ATV la presiunea  $2 \cdot 10^7$  Pa, adăugarea solvenților pentru obținerea antioxidanților lipofili și separarea fazelor lichide [1].

15 Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că necesită cultivatoare închise ermetic cu utilizarea colectorului și injectorului de  $O_2$ , distrugerea celulelor de microorganismele la presiune înaltă, precum și adăugarea solvenților organici, care pot influența asupra activității enzimei antioxidante SOD.

20 Mai este cunoscut procedeu de obținere a superoxidismutazei termostabile din celulele microorganismelor fotosintetizante. Procedeu constă în: a) cultivarea microorganismelor la temperatura de la 40 până la 80°C într-un fotoreactor închis din material transparent și termorezistent; b) separarea microorganismelor din mediul de cultură, distrugerea microorganismelor, extragerea din ele a lichidului ce conține SOD și alte proteine, concentrarea așa-numitului lichid, separarea selectivă a altor proteine de SOD prin precipitare cu sulfat de amoniu [2].

25 Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că necesită cultivatoare închise ermetic cu adăugarea de  $CO_2$  sau  $O_2$  și o temperatură înaltă de cultivare (40...80°C), distrugerea celulelor de microorganismele la presă industrială sub presiunea de  $2 \cdot 10^7$  Pa, precum și centrifugarea omogenatului la o viteză înaltă de rotație (10000...450000 g), timp de 1 oră, proces însoțit de consum de energie și care necesită aparat costisitor, nefiind economic avantajos. Un alt dezavantaj este că în cazul utilizării culturilor mezofile preparatul antioxidant, care conține SOD, este puțin termostabil, deoarece activitatea SOD obținută din aceste culturi (inclusiv SOD din cianobacteria *Cyanidium caldarium*) la temperatura de 60°C scade cu 50% peste 30 min.

35 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea preparatului antioxidant termostabil cu o capacitate antioxidantă înaltă din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*.

40 Procedeu, conform invenției, include cultivarea biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* în reactoare de tip deschis pe un mediu de cultură Gromov (Гороновский И.Е., Назаренко Ю.П., Некрич Е.Ф. Краткий справочник по химии. Киев, 1974, с. 424) cu adăugarea compusului coordinativ cu acidul tartric și imidazol  $[Mn(COO(CHOH)_2COO)(C_3N_2H_4)_2(H_2O)_2] \cdot nH_2O$  în concentrație de 20 mg/L la temperatura de 30...35°C, separarea biomasei de mediul de cultură, distrugerea celulelor prin congelare-decongelare repetată, extragerea fracției proteice cu 0,1 M tampon fosfat de Na cu pH 7,8...8,0 cu adăugarea a 10 mM EDTA, fracționarea fracției proteice prin precipitare izoelectrică la pH 3,8...4,0, centrifugarea cu separarea ulterioară a precipitatului, concentrarea supernatantului ce conține superoxidismutază și ficocianină utilizând reagentul polietilenglicol Mr 40000 Da și congelarea.

45 Avantajele procedurii propus constau în obținerea unui preparat antioxidant termostabil și cu capacitate antioxidantă înaltă (o activitate antioxidantă a enzimei SOD de 1,54 ori mai înaltă în comparație cu SOD conform soluției apropiate), dar și cu o capacitate antioxidantă suplimentară a ficocianinei – proteinei cu proprietăți antioxidante, precum și economisirea resurselor materiale și energetice (cultivarea la temperatura de 35°C față de 40...80°C, descrisă în cea mai apropiată soluție), distrugerea celulelor cianobacteriei se efectuează prin congelare-decongelare repetată față de distrugerea celulelor de microorganismele la presă industrială sub presiunea de  $2 \cdot 10^7$  Pa, descrisă în cea mai apropiată soluție, precum și centrifugarea omogenatului la o viteză de rotație de 6000...7000 g timp de 20 min față de centrifugarea omogenatului la o viteză înaltă de rotație de 10000...450000 g timp de 1 oră, descrisă în cea mai apropiată soluție.

55 Rezultatul constă în obținerea unui preparat termostabil cu activitate antioxidantă înaltă.

# MD 3781 G2 2008.12.31

4

5 Rezultatul obținut se datorează cultivării cianobacteriei *Spirulina platensis* în regim de iluminare permanentă și adăugării ca sursă suplimentară de C, N și Mn la mediul de cultivare a compusului coordinativ al Mn, ceea ce influențează asupra sintezei antioxidanților de natură proteică – ficocianină și SOD. Rezultatele determinării activității SOD și capacității antioxidante a ficocianinei din preparatul antioxidant obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* sunt prezentate în

10 tabelele 1-2.

Tabelul 1

10 Determinarea activității SOD la diferite etape de obținere a preparatului antioxidant

Etapele de obținere a preparatului antioxidant	Activitatea SOD, unități/ml	V, ml	Proteina, mg/ml	Unități/mg proteină
Extracția (Extractul inițial)	4,58	2100	2,5	1,83
Precipitarea izoelectrică (Supernatant)	4,16	2310	0,9	4,62
Concentrare	16,64	577,5	3,6	4,62

15 După cum se vede din tabelul 1, după precipitarea izoelectrică se păstrează 90% de activitate a SOD, care rămâne în supernatant și se înlătură 64% de proteine balast, deci are loc separarea selectivă a SOD de alte proteine. Activitatea SOD a fost determinată după reducerea colorației Tetrazolium Nitroblue (NBT) în prezența riboflavinei (Winterbourn, 1987).

Tabelul 2

20 Determinarea capacității antioxidante a ficocianinei din preparatul antioxidant obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*

Soluția cercetată	Volumul soluției de antioxidant titrate, mL	Volumul soluției de 2,6-diclorfenolindofenolat de sodiu 0,001 M, consumat la titrare, mL	Capacitatea antioxidantă, %
Acid ascorbic (0,05 mg/mL)	0,1	0,8	100
Ficocianină (0,05 mg/mL)	0,1	0,186	23,25

25 Datele din tabelul 2 demonstrează că, în comparație cu cea mai apropiată soluție, procedeul propus în invenție asigură o activitate antioxidantă mai înaltă datorită prezenței nu doar a enzimei SOD, ci și a proteinei cu capacitate antioxidantă – ficocianină, a cărei capacitate antioxidantă constituie 23,25% comparativ cu acidul ascorbic luat în calitate de oxidant standard, a cărui valoare este considerată 100%. Capacitatea antioxidantă a fost determinată după metoda titrării cu 2,6-diclorfenolindofenolat de sodiu (Grigorcea Pavel, Glijin Aliona. Biochimia tehnologică. Lucrări de laborator, 2003).

30 Studiul comparativ al activității și termostabilității SOD din preparatul antioxidant termostabil, obținut din cianobacteria *Spirulina platensis* conform invenției propuse și celui obținut din cianobacteria *Cyanidium caldarium* conform soluției apropiate este prezentat în tabelele 3-4.

35

Tabelul 3

Compararea activității enzimei SOD, obținute din cianobacterii

Preparatul antioxidant	Activitatea SOD, unități/mg	Majorarea activității SOD
SOD din cianobacteria <i>Cyanidium caldarium</i> (conform celei mai apropiate soluții)	3	-
SOD din cianobacteria <i>Spirulina platensis</i> (conform soluției propuse)	4,62	1,54

## MD 3781 G2 2008.12.31

5

- 5 Datele din tabelul 3 demonstrează că, în comparație cu cea mai apropiată soluție, procedeul propus în invenție asigură o activitate antioxidantă a enzimei SOD de 1,54 ori mai înaltă în comparație cu SOD, obținută din cianobacteria *Cyanidium caldarium* conform celei mai apropiate soluții. Astfel, capacitatea antioxidantă în preparatul obținut în invenția propusă este mai înaltă și se datorează prezenței nu doar a enzimei SOD, ci și a ficocianinei – proteinei cu proprietăți antioxidante și care pot avea acțiune antioxidantă sinergetică.

Tabelul 4

- 10 Compararea termostabilității enzimei SOD, obținute din cianobacterii

Preparatul antioxidant	Termostabilitatea preparatului antioxidant	
	la temperatura de 60°C 30 min	la temperatura de 60°C 60 min
Activitatea SOD din cianobacteria <i>Cyanidium caldarium</i> (conform celei mai apropiate soluții)	50% din activitatea inițială	-
Activitatea SOD din cianobacteria <i>Spirulina platensis</i> (conform soluției propuse)	100%	100%

- 15 Conform datelor din tabelul 4, după 60 și 30 min de încălzire la 60°C preparatul antioxidant din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* păstrează 100% din activitatea SOD, iar cel obținut din cianobacteria *Cyanidium caldarium* păstrează doar 50% din activitatea SOD după 30 min de încălzire la 60°C.

Exemplu de realizare a invenției în reactoare de tip deschis pe un mediu de cultură Gromov

- 20 Se prepară 60 L suspensie de spirulină cu concentrația de 0,4 g/L. Cultura de *Spirulina platensis* se cultivă timp de 48 ore la temperatura 35°C, pH 9...10, la iluminare permanentă de 4000 lx. După 48 ore se adaugă cu picătura soluție de  $[\text{Mn}(\text{COO}(\text{CHOH})_2\text{COO})(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$  în calitate de sursă suplimentară de mangan, carbon și azot cu concentrația finală de 20 mg/L, la agitare permanentă. Cultivarea este continuată până la ziua a 7-a, după care biomasa este separată de mediul de cultură prin filtrare. Biomasa obținută este suspensionată în apă, astfel ca concentrația finală să fie egală cu 20 mg/L. Suspensia este congelată-decongelată de 3 ori și se supune extracției în raport de 25 1:1 cu soluție 0,1 M tampon fosfat pH 7,8, ce conține EDTA (10 mM) timp de 1 oră, la temperatura de 4°C. Extractul obținut este supus centrifugării la 3,5 mii rot./min, timp de 20 min. Supernatantul obținut este supus precipitării izoelectrice cu adăugarea soluției de HCl 0,1N la pH 3,8...4,0. Se centrifughează la 30 3,5 mii rot./min, timp de 20 min pentru separarea precipitatului. Supernatantul obținut ce conține SOD și ficocianină este concentrat cu utilizarea agentului de concentrare polietilenglicol (Mr = 40000 Da) și soluția obținută este utilizată în calitate de preparat antioxidant. Soluția se congelează și se păstrează la frigider la -15°C.

## MD 3781 G2 2008.12.31

6

### (57) Revendicări:

5       Procedeu de obținere a preparatului antioxidant termostabil din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* care include cultivarea biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* în reactoare de tip deschis pe un mediu de cultură Gromov cu adăugarea compusului coordinativ cu acidul tartric și imidazol  $[\text{Mn}(\text{COO}(\text{CHOH})_2\text{COO})(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$  în concentrație de 20 mg/L, la temperatura de 30...35°C, separarea biomasei de mediul de cultură, distrugerea celulelor prin congelare-decongelare repetată, extragerea fracției proteice cu 0,1 M tampon fosfat de Na cu pH 7,8...8,0 cu  
10       adăugarea a 10 mM EDTA, fracționarea fracției proteice prin precipitare izoelectrică la pH 3,8...4,0, centrifugarea cu separarea ulterioară a precipitatului, concentrarea supernatantului cu conținut de superoxidismutază și ficocianină utilizând reagentul polietilenglicol Mr 40000 Da și congelarea.

15

### (56) Referințe bibliografice:

1. US 5179012 A 1993.12.12
2. US 5536654 A 1996.07.16