



MD 4360 C1 2016.02.29

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4360** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12P 23/00* (2006.01)
B01D 11/00 (2006.01)
A61K 36/02 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2013 0066 (22) Data depozit: 2013.09.23 (41) Data publicării cererii: 2015.05.31	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.07.31, BOPI nr. 7/2015
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: BULIMAGA Valentina, MD; RUDIC Valeriu, MD; PISOV Maria, MD; DENCICOV Lidia, MD; GONȚA Maria, MD; DUCA Gheorghe, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de obținere a mixoxantoflei din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de obținere a pigmentului carotenoidic mixoxantofila din biomasa de *Spirulina platensis* pentru utilizare în industria alimentară sau în medicină.

Conform invenției, procedeu constă în aceea că se efectuează extragerea repetată a mixoxantoflei din biomasa cu soluție hidroetanolică de 70...96% cu separarea biomasei prin centrifugare și unificarea extractelor obținute, la care se adaugă hidroxid

2
de kalium de 40%, în raport de 3:1 față de cantitatea de biomasa supusă extracției, se menține 4...6 ore și se adaugă hexan, după care prin decantare se separă fracția etanolică cu conținut de mixoxantofilă, care se diluează cu apă până la concentrația alcoolului etilic de 45...50%, se centrifughează la 6000 rot/min, iar cristalele obținute se spală cu soluție de etanol de 45...50% și se usucă.

Revendicări: 1

MD 4360 C1 2016.02.29

(54) Process for producing myxoxanthophyll from *Spirulina platensis* cyanobacterium biomass

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, particularly to a process for producing the myxoxanthophyll carotenoid pigment from *Spirulina platensis* biomass for use in the food industry or medicine.

According to the invention, the process consists in that it is carried out re-extraction of myxoxanthophyll from the biomass with 70...96% water-ethanol solution with separation of biomass by centrifugation and unification of produced extracts, to which is added 40% potassium hydroxide in a ratio of

2
3:1 to the amount of the extracted biomass, is maintained for 4...6 hours and is added hexane, afterwards by decantation is separated the myxoxanthophyll-containing ethyl fraction, which is diluted with water to the ethyl alcohol concentration of 45...50%, is centrifuged at 6000 rev/min, and the resulting crystals are washed with 45...50% ethanol solution and dried.

Claims: 1

(54) Способ получения миксоксантофилла из биомассы *Spirulina platensis*

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу получения каротиноидного пигмента миксоксантофилла из биомассы *Spirulina platensis* для использования в пищевой промышленности или в медицине.

Согласно изобретению, способ состоит в том что осуществляют повторную экстракцию миксоксантофилла из биомассы 70...96%-ным водноэтанольным раствором с отделением биомассы центрифугированием и унифицированием полученных экстрактов, к которым добавляют 40%-ный гидроксид калия, в

2
соотношении 3:1 к количеству экстрагированной биомассы, выдерживают 4...6 часов и добавляют гексан, после чего путём декантирования отделяют этиловую фракцию с содержанием миксоксантофилла, которую разбавляют водой до концентрации этилового спирта 45...50%, центрифугируют при 6000 об/мин, а полученные кристаллы промывают раствором 45...50%-ного этанола и высушивают.

П. формулы: 1

Descriere:

5 Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de obținere a pigmentului carotenoidic mixoxantofila din biomasă de *Spirulina platensis* pentru utilizare în industria alimentară sau în medicină.

Mixoxantofila este un carotenoid glicozidic. Interesul sporit față de carotenoizi, inclusiv față de mixoxantofilă, este legat de capacitatea lor antioxidantă, ceea ce pune în fața cercetătorilor sarcina de a elabora tehnologii de separare și purificare a carotenoizilor pentru producerea lor în cantități industriale.

10 Este cunoscut un procedeu de obținere a mixoxantofilei din biomasa cianobacteriei *Synechocystis* PCC 680, care include următoarele etape: separarea în faza staționară (în a 4-a zi de cultivare) a biomasei de lichidul de cultură prin centrifugare, obținerea extractului de mixoxantofilă prin adăugarea acetonei de 50% într-un mojar cu bile de sticlă, centrifugarea și eliminarea precipitatului. În supernatantul portocaliu se conțin 15 95% din conținutul total de mixoxantofilă și doar cantități mici de alți pigmenti. Purificarea ulterioară se efectuează supunând extractul acetonic obținut la extracție ulterioară în faza lichid-lichid în conformitate cu următoarele proporții (volumul total de aproximativ 1 litru): extract de mixoxantofilă - 1 parte, 1 parte acetonă, 1 parte de hexan + 1 parte de apă, se toarnă treptat una după alta într-o pâlnie și se agită, după care se 20 adaugă 10 g NaCl. La etapa ulterioară de separare, mixoxantofila se află în faza hexanică. Extractul hexanic este evaporat într-un evaporator rotativ la 25°C în întuneric, în decurs de 30 min. Precipitatul de mixoxantofilă se usucă. Purificarea ulterioară se efectuează prin cromatografie preparativă cu faze inverse pe coloană de Biocard (250 x 25 mm) la presiunea de 10...15 bar. Pentru separarea și eluția pigmentului de 25 mixoxantofilă se utilizează soluțiile A și B cu concentrația inițială în raport de 80:20 și cea finală de 0:100. Soluția A: amestec de acetonă-metanol cu 10% soluție tampon fosfat, soluția B - etilacetat. Detectia pigmentilor se efectuează la 405 nm. Se recomandă utilizarea mixoxantofilei sau echinenonei pentru tratamentul profilactic și/sau terapeutic în condiții determinate sau favorizate de procese oxidative la oameni și 30 animale [1].

Dezavantajele acestui procedeu constau în utilizarea unor solvenți toxici ca acetona și metanolul, precum și purificarea suplimentară pe coloană de Biocard, ceea ce majorează costul și diminuează randamentul.

35 Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de obținere a mixoxantofilei din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*, care asigură excluderea unor astfel de solvenți toxici ca acetona și metanolul, majorarea randamentului și obținerea mixoxantofilei în formă de cristale cu o puritate înaltă.

40 Esența invenției constă în faptul că se efectuează extragerea repetată a mixoxantofilei din biomasă cu soluție hidroetanolică de 70...96% cu separarea biomasei prin centrifugare și unificarea extractelor obținute, la care se adaugă hidroxid de kalium de 40%, în raport de 3:1 față de cantitatea de biomasă supusă extracției, se menține 4...6 ore și se adaugă hexan, după care prin decantare se separă fracția etanolică cu conținut de mixoxantofilă, care se diluează cu apă până la concentrația alcoolului etilic de 45...50%, se centrifughează la 6000 rot/min, iar cristalele obținute se spală cu soluție 45 de etanol de 45...50% și se usucă.

Rezultatul tehnic obținut constă în utilizarea alcoolului etilic în calitate de extragent al mixoxantofilei și excluderea unor astfel de solvenți volatili și toxici ca acetona și metanolul, ceea ce facilitează etapele ulterioare de purificare (saponificarea și precipitarea mixoxantofilei prin diminuarea concentrației alcoolului la valorile de 50 45...50%) și asigură obținerea mixoxantofilei sub formă de cristale, ce determină o puritate înaltă (99,9%) și un randament de 99,0%.

Rezultatul tehnic obținut se datorează insolubilității mixoxantofilei în soluții alcoolice de 45...50%, ceea ce reprezintă o noutate și permite separarea ei de alți pigmenti, care rămân în soluție.

55

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

5 5 g de biomasă de spirulina se suspendă în 25 ml de apă purificată și 175 ml de alcool etilic de 80% și se agită în decurs de 60 min. Se centrifughează la 6000 rot/min pentru a separa extractul de restul de biomasă, la care se adaugă 100 ml alcool etilic de 70% și se agită timp de 30 min pentru extracția repetată a pigmentilor. La extractele reunite se adaugă 15 ml KOH de 40%, se lasă pentru 4...6 ore pentru saponificare, apoi se adaugă 100 ml hexan pentru înlăturarea beta-carotenului și a fracției lipidice. În până de decantare se separă fracția de clorofilă saponificată, apoi fracția etanolică ce conține mixoxantofilă se diluează cu apă până la atingerea concentrației alcoolului de 50%, după care se supune centrifugării la 6000 rot/min. Cristalele obținute se spală cu soluție de C₂H₅OH de 50% și se usucă.

Exemplul 2

15 10 g de biomasă de spirulină se suspendă în 75 ml de apă purificată și 200 ml de alcool etilic de 96% și se agită în decurs de 60 min. Se centrifughează la 6000 rot/min și se separă extractul de restul de biomasă. La precipitatul obținut se adaugă 140 ml alcool etilic de 96% și se agită timp de 30 min pentru extracția repetată a pigmentilor. La extractele reunite se adaugă 30 ml de KOH de 40%, se lasă pe 4...6 ore pentru saponificare, apoi se mai adaugă 100 ml hexan pentru înlăturarea carotenoizilor și a fracției lipidice și se agită. În până de decantare se separă fracția de clorofilă saponificată, apoi fracția etanolică ce conține mixoxantofilă se diluează cu apă până la atingerea concentrației alcoolului de 45%, după care se supune centrifugării la 6000 rot/min. Cristalele obținute se spală cu soluție de C₂H₅OH de 45% și se usucă.

25

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. WO 2002024183 A1 2002.03.28

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a mixoxantofilei din biomasă de *Spirulina platensis*, care constă în aceea că se efectuează extragerea repetată a mixoxantofilei din biomasă cu soluție hidroetanolică de 70...96% cu separarea biomasei prin centrifugare și unificarea extractelor obținute, la care se adaugă hidroxid de kalium de 40%, în raport de 3:1 față de cantitatea de biomasă supusă extracției, se menține 4...6 ore și se adaugă hexan, după care prin decantare se separă fracția etanolică cu conținut de mixoxantofilă, care se diluează cu apă până la concentrația alcoolului etilic de 45...50%, se centrifughează la 6000 rot/min, iar cristalele obținute se spală cu soluție de etanol de 45...50% și se usucă.

Șef Direcție Brevete:

GUȘAN Ala

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

LUPAȘCU Lucian