

(19)



(10) **LT 5924 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5924**

(51) Int. Cl. (2011.01): **A23K 1/00**

(21) Paraiškos numeris: **2011 050**

(22) Paraiškos padavimo data: **2011 06 01**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2012 12 27**

(45) Patent paskelbimo data: **2013 04 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Almantas ŠIMKUS, LT
Aldona ŠIMKIENĖ, LT
Česlovas MAZŪRAS, LT
Linas MAZŪRAS, LT

(73) Patent savininkas:

Almantas ŠIMKUS, Panerių g. 27-2, Kaunas, LT
Aldona ŠIMKIENĖ, Panerių g. 27-2, Kaunas, LT
Česlovas MAZŪRAS, Braškių g. 13, Vilnius, LT
Linas MAZŪRAS, Braškių g. 13, Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

—

(54) Pavadinimas:

C-fikocianino ekstrakto gavimo būdas iš cianobakterijų *Spirulina platensis* biomasės ir kitas biomasės panaudojimas

(57) Referatas:

Išradimas priklauso maisto ir pašarų papildų gamybos sričiai, papildams iš cianobakterijų gaminti. Cianobakterijos *Spirulina platensis* užauginamos jūros vandenį imituojančioje terpėje, praturtintoje mikroelementais. Gauta cianobakterijų biomasė panaudojama C-fikocianinui gauti, o nepanaudota likusi dalis gali būti užkonservuojama cukrais. C-fikocianinas ekstrahuojamas iš demineralizuotos cianobakterijų biomasės, šalčiu dezintegruotų cianobakterijų ląstelių, vykdant ekstrakciją distiliuotu vandeniu 24 valandas prie 2-5 °C

temperatūros, tamsoje. Gautų pigmento kokybę įvertinama spektrofotometru matuojant optinį tankį prie 620 ir 280 nm bangų ilgių. Papildžius gyvūnų racioną gautu preparatu sustiprėja jų imuninė sistema, pagerėja maisto medžiagų virškinamumas ir konversija. Papildo paros dozė yra 1-100 g.

Išradimas priklauso maisto ir pašarų papildų gamybos sričiai, papildų iš cianobakterijų gamybai.

Pastaruoju metu auga susidomėjimas kai kurioms mikroorganizmų rūšimis, ypač cianobakterijomis ir mikrodumbliais, kurie yra įvairių biologiškai aktyvių medžiagų šaltinis ir yra vertingi objektai biotechnologijoje. Prie mikrodumblių biologiškai aktyvių medžiagų yra priskiriami baltymai, polisacharidai, riebalų rūgštys, vitaminai, pigmentai, enzimai, mikroelementai. Šios fotocheminės medžiagos pasižymi antiuždegiminėmis, antivežinėmis, antigrybelinėmis, imunomoduliuojančiomis, antioksidacinėmis ir kitomis savybėmis.

Cianobakterijų *Spirulina platensis* sudėtyje yra eilė bioprotektorių, biokorektorių ir biostimuliatorių, kurių daugiau nesutinkama jokiame natūralios kilmės produkte. Tai sąlygoja platų ir fenomenalų *Spirulina platensis* galimybių panaudojimo spektrą. Iš *Spirulinos platensis* biomasėje esančių fitocheminių medžiagų antioksidantams galime priskirti nesočiąsias ir pusiau nesočiąsias riebalų rūgštis (linoleno, γ – linoleno, arahidinę), tokoferolius (vitaminas E), karotinoidus (β – karotinas, miksoksantofilas, zeaksantinas), fikobiliproteinus (fikocianinas), fermentus (superoksidismutazė, gliutationperoksidazė), polifenolius ir kt. Greta dažnai naudojamo antioksidanto β – karotino, dar platesnį panaudojimą gali turėti kitas *Spirulina platensis* pigmentas C–fikocianinas. Šis pigmentas yra baltyminės kilmės, pasižymi antioksidacinėmis savybėmis ir yra priskiriamas fikobiliproteinų grupei. *Spirulinos platensis* biomasėje būna iki 60 – 70 % baltymų ir iki 10 – 14 % C–fikocianino. Teigiamas C–fikocianino poveikis, gydant onkologinius ir AIDS susirgimus, jį daro labai patraukliu objektu moksliniuose ir praktiniuose tyrimuose. Paskutiniaisiais tyrimais nustatyta, kad fikocianinas pasižymi priešuždegiminėmis, neuro– ir hepatoprotektorinėmis savybėmis ir tai tampriai surišta su pigmento antioksidaciniu aktyvumu ir jo kiekiu cianobakterijose.

Lipidų peroksidacija yra laikoma viena iš pagrindinių priežasčių naikinti ląstelių membranas. Įrodyta, kad fikocianinas šį procesą stabdo. Yra įrodytas ir inhibuojantis fikocianino efektas į organizmo alergines reakcijas. Yra duomenų, kurie rodo, kad C–fikocianinas gali iššaukti vėžinių ląstelių apoptozę. Šie ir daugelis kitų įrodymų preparatus iš C–fikocianino daro perspektyviais preparatais prieš daugelį sunkių ligų gydymo ir profilaktikos tikslu.

Išradimo tikslas yra užauginti C-fikocianinu praturtintą cianobakterijų *Spirulina platensis* biomasę, gautą biomasę panaudoti pigmento C-fikocianino ekstrakto gamybai arba užkonservuoti, o konservuotą biomasę, kaip maistinį papildą ar pašarinį priedą, pateikti vartotojams. Šis tikslas pasiekiamas imituojančią jūros vandenį dumblių auginimo terpę papildžius mikroelementų tirpalu, bei iš gautos praturtintos mikrodumblių biomasės ekstrakcijos būdu gaunamas C-fikocianinas arba ji konservuojama arba fruktoze, arba gliukoze, arba sorbitu, arba cukringomis cukraus perdirbimo atliekomis arba visomis kartu (toliau cukrūs).

Nurodytas tikslas pasiekiamas pagal 1-oje figūroje pateiktą kompleksinę C-fikocianino ekstrakto išgavimo schemą.

Cianobakterijos *Spirulina platensis* auginimas. Cianobakterijoms auginti yra naudojama mūsų modifikuota Zaruko, imituojanti jūros vandenį, terpė. Terpė pagaminta iš nudruskinto vandens, kuriame yra ištirpinti šie cheminiai junginiai g/l: NaHCO_3 – 12,0–18,0, K_2HPO_4 – 0,4–1,5, NaNO_3 – 1,5–3,0, K_2SO_4 – 0,5–2,5, NaCl – 0,5–2,5, EDTA – 0,01–0,5, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01–0,1, CaCl_2 – 0,01–0,08, MgSO_4 – 0,1–1,0. Į gautą tirpalo litrą yra įpilama 1–5 ml mikroelementų komplekso. Mikroelementų kompleksas yra gautas iš nudruskinto vandens, kuriame yra ištirpinti šie cheminiai junginiai g/l: H_3BO_3 – 2,0–4,0, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,81, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,222, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,01–0,1, MoO_3 – 0,015, NH_4VO – 0,02296, CoCl_2 – 0,044, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{SO}_4$ – 0,01–0,1.

Nuo *Spirulina platensis* auginimo sąlygų labai priklauso fikocianino kiekis biomasėje. Pasirinkus atitinkamą auginimo schemą, užtikrinančią auginimo terpės savalaikį aprūpinimą mineralais bei užtikrinant fotosintezės procesą, galima *Spirulina platensis* biomasėje užtikrinti norimą fikobiliproteino kiekį. Šviesos srautas turi būti nemažesnis nei 650 lm.

Terpės pavyzdys 1. Nudruskintame vandenyje ištirpinami šie cheminiai komponentai g/l: NaHCO_3 – 14,0, K_2HPO_4 – 0,6, NaNO_3 – 2,5, K_2SO_4 – 1,0, NaCl – 1,0, EDTA – 0,5, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,09, CaCl_2 – 0,04, MgSO_4 – 0,2. Į gautą tirpalo litrą yra įpilama 1,1 ml mikroelementų komplekso. Mikroelementų kompleksas yra gautas iš nudruskinto vandens, kuriame yra ištirpinti šie cheminiai junginiai g/l: H_3BO_3 – 2,6, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,81, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,222, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,06, MoO_3 – 0,015, NH_4VO – 0,02296, CoCl_2 – 0,044, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{SO}_4$ – 0,05.

Terpės pavyzdys 2. Nudruskintame vandenyje ištirpinami šie cheminiai komponentai g/l: NaHCO_3 – 17,0, K_2HPO_4 – 0,5, NaNO_3 – 3,0, K_2SO_4 – 1,1, NaCl – 2,3, EDTA – 0,05, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, CaCl_2 – 0,06, MgSO_4 – 0,5. Į gautą tirpalo litrą yra įpilama 5 ml mikroelementų komplekso. Mikroelementų kompleksas yra gautas iš nudruskinto vandens, kuriame yra ištirpinti šie cheminiai junginiai g/l: H_3BO_3 – 4,0, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,81, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,222, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, MoO_3 – 0,015, NH_4VO – 0,02296, CoCl_2 – 0,044, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{SO}_4$ – 0,1.

Cianobakterijos *Spirulina platensis* atskyrimas nuo auginimo terpės. Mikrodumblio biomasė nuo auginimo terpės atskiriama filtracijos arba centrifugavimo būdu.

***Spirulina platensis* biomasės praplovimas vandeniu.** Biomasės demineralizacija vykdoma geriamu vandeniu. Vandens kiekis reikalingas druskoms nuo biomasės nuplauti yra lygus nupiltos terpės kiekiui.

Jeigu šviežios biomasės negalima iš karto panaudoti, ją galima saugoti užšaldytą arba išdžiovintą. Tačiau reikia prisiminti, kad iš sausos biomasės yra atitinkamai gaunama 50 % C-fikocianino mažiau negu iš sausos biomasės. Norint sausoje biomasėje išsaugoti maksimalų pigmento kiekį, biomasę rekomenduojama džiovinti prie 50 - 60 °C temperatūros.

Šviežią biomasę galima saugoti neilgiau kaip 48 valandas prie 4 – 9 °C temperatūros. Laikant ilgiau baltyminės kilmės medžiagos pradeda irti.

Jeigu gauta dumblių biomasė nepanaudojama C-fikocianino gamybai, ją galima konservuoti cukrais. Dumbliai konservuojami cukrais esant tokiam komponentų santykiui (masės %): dumblių biomasė 5–35, o likusi dalis – cukrai. Prieš konservavimą dumblių biomasė vakuumuojama iki 85 – 55 % drėgmės. Cukrūs pakaitinami iki 40–60 °C temperatūros. Į pakaitintus cukrus maišant supilama vakuumuota dumblių biomasė. Kaitinama prie 44–60 °C temperatūros maišant 25–30 minučių. Konservuota cukrais ir išpilstyta į sandarius indus dumblių biomasė aktyvi išlieka iki 36 mėn. Gautas maistinis ar pašarinis papildas naudojamas gyvūnų mityboje.

Papildžius gyvūnų racioną gautu dumblių preparatu sustiprėja jų imuninė sistema, pagerėja maisto medžiagų virškinamumas ir konversija, gyvūnai tampa gyvybingesni, suaktyvėja jų gyvybiniai procesai ir visos organizmo apsauginės sistemos. Vienam gyvūnui per dieną vidutiniškai su racionu galima sušerti 1–100 g papildo. Teigiamas preparato poveikis gyvūnams yra iliustruotas šiuose mūsų moksliniuose darbuose:

- 1) Shimkus A., Shimkiene A., Juozaitiene V., Zavodnik L., Juozaitis A., Muzikevicius A. Influence of blue algae *Spirulina Platensis* on the productivity of sows. ISSN: 1310-1331. Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences. 2009. Vol. 62. No. 3. P. 405–410.
- 2) Kistanova E., Kacheva D., Shumkov K., Abadjieva D., Borjaev G., Nevitov M., Shimkus A. Effect of Biological Active Substances on the Mouse Embryo Production in vivo. ISSN: 1310-1331. Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences. 2009. T. 62. No. 4. P. 499–506.
- 3) Kistanova E., Marchev Y., Nedeva R., Kacheva D., Shumkov K., Georgiev B., Shimkus A. Effect of the *Spirulina paltensis* included in the main diet on the boar sperma quality. ISSN: 1450-9156. Biotechnology in Animal Husbandry. 2009. Vol. 25. No. 5-6. P. 547–557

Cianobakterijos *Spirulina platensis* ląstelių sienelių dezintegracija. C-fikocianino ekstrakcija priklauso nuo ląstelių sienelių destrukcijos laipsnio. Yra žinomi sekantys ląstelių

sienelių destrukcijos būdai: aukšto slėgimo homogenizatoriumi, ultragarsu, daugkartiniu užšaldymu ir atšildymu, šarmine hidrolizacija.

Vienas paprasčiausias ląstelių dezintegracijos metodų yra daugkartinis užšaldymo-atšildymo ciklas. Vienkartinio ciklo pilnai cianobakterijų *Spirulina platensis* ląstelių sienelių dezintegracijai nepakanka. Pilnavertei ekstrakcijai dažniausiai reikia 3 – 4 užšaldymo –atšildymo ciklų. Procese užšaldymo ciklo ilgumas ir skiediklio kiekis neturi reikšmės.

C-fikocianino iš cianobakterijų *Spirulina platensis* biomasės ekstrakcija. C-fikocianinas yra vandenyje tirpus baltymas ir ekstrahuojams iš dumblio biomasės vandeniui esant pažemintai temperatūrai. Ekstrakcija vykdoma distiliuotu vandeniui 24 valandas prie 2–5 °C temperatūros tamsoje. Pastarosios sąlygos teigiamai veikia fikocianino cheminės struktūros stabilizavimo procesą.

Vandeninio C-fikocianino ekstrakto atskyrimas nuo *Spirulina platensis* biomasės. Pigmento vandeninio ekstrakto atskyrimas nuo biomasės vyksta centrifugavimo būdu.

Identifikavimas ir gauto produkto kokybės kontrolė. Vienas patikimiausių fikobilinproteinų identifikavimo metodų yra ekstraktų spektrofotometrija. Apie išskirto pigmento grynumą sprendžiama iš regimosios šviesos absorbcijos maksimumo, ultravioletinio ir regimojo spektro absorbcijos intensyvumo santykio. Pigmentinio tirpalo grynumui nustatyti neturi įtakos kitų pigmentų ir baltymų priemaišos. Pigmentui fikocianinui nustatyti yra naudojamas 620, 280 nm spektrofotometro optinio tankio verčių bangos.

$$D_{620} / D_{280} \geq 5,0$$

Vandeninį C-fikocianino ekstraktą, gautą pagal 1 figūroje pateiktą schemą, galima naudoti kaip maisto ar pašarinį papildą, maistinių dažiklį, kosmetologijoje. Preparatai, pagaminti iš cianobakterijų *Spirulina platensis* biomasės, yra naudojami daugelio ligų gydymui ir profilaktikai.

Naudota literatūra:

1. Amsler D. Ch. Algal Chemical Ecology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. 313 p.
2. Andersen R. A. Algal culturing techniques. Elsevier, 2005. 578 p.
3. Gershwin M. E., Belay A. Spirulina in Human Nutrition and Health. CRS Press, 2008. 312 p.
4. Richmond A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science Ltd, 2004. 566 p.

Išradimo apibrėžtis

1. Maistinis ar pašarinis papildas į kurio sudėtį įeina cianobakterijos, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra demineralizuota cianobakterijų biomasė ir papildomai įeina arba fruktozė, arba gliukozė, arba sorbitas arba cukringos cukraus perdirbimo atliekos, esant tokiame komponentų santykiui (masės %): dumblių biomasė 5–35, o likusi dalis – cukrai.

2. Maistinio ar pašarinio papildas pagal 1 punktą gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad cianobakterijų biomasė auginama Zaruko terpėje, kuri modifikuojama į jos 1 litrą papildomai įmaišant 1–5 ml mikroelementų komplekso, pagaminto iš nudruskinto vandens, kuriame yra ištirpinti šie cheminiai junginiai g/l: H_3BO_3 – 2,0–4,0, $MnCl_2 \cdot xH_2O$ – 1,81, $ZnSO_4 \cdot xH_2O$ – 0,222, $CuSO_4 \cdot xH_2O$ – 0,01–0,1, MoO_3 – 0,015, NH_4VO_3 – 0,02296, $CoCl_2$ – 0,044, $K_2Cr_2SO_4$ – 0,01–0,1.

3. Maistinio ar pašarinio papildas pagal 1 punktą gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad cianobakterijų biomasė vakuumuojama iki 85–55 % drėgmės, demineralizuojama, supilama į iki 44–60 °C įkaitintus cukrus ir toliau kaitinama 44–60 °C temperatūroje maišant 25–30 minučių.

4. Vandeninio C-fikocianino gavimo iš cianobakterijų biomasės būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad demineralizuota cianobakterijų biomasė, panaudojant šaltį, yra dezintegruojama, vykdoma C-fikocianino ekstrakcija distiliuotu vandeniu 24 valandas prie 2–5 °C temperatūros tamsoje ir gauto pigmento kokybė įvertinama spektrometru, matuojant optinį tankį prie 620 ir 280 nm bangos ilgių.