



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2023 00117**

(22) Data de depozit: **10/03/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/09/2024 BOPI nr. **9/2024**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE
ASACHI" DIN IAȘI, STR. PROF. DR. DOC.
DIMITRIE MANGERON NR. 67, IAȘI, IS, RO**

(72) Inventatori:
• **BLAGA ALEXANDRA-CRISTINA,
STR.CERNA NR.5, BL.A 22, ET.1, AP.5,
IAȘI, IS, RO;**
• **TUCALIUC ALEXANDRA, STR.OANCEA,
NR.22, BL.352, SC.B, AP.4, IAȘI, IS, RO;**
• **CAȘCAVAL DAN, ȘOS.BĂRNOVA, NR.29,
C, IAȘI, IS, RO**

(54) **PROCEDEU DE SEPARARE A VITAMINEI B9**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de separare a vitaminei B9 din soluții apoase. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: extracția vitaminei B9 din faza apoasă rezultată din procesul de biosinteză sau sinteză chimică cu o soluție ionică de tip Cyphos IL 103 dizolvat în heptan și octanol, utilizând un sistem de agitare intensă, separarea emulsiei prin centrifugare timp de 10 min

la 4000 rpm, supunerea extractului rezultat la o re-extracție cu o soluție de NaOH, cu pH 9, sub o intensă amestecare a fazelor, rezultând vitamina B9 cu un randament de separare de 99%, simultan cu regenerarea solventului.

Revendicări: 1



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>a 2023 00117</u>
Data depozit <u>10-03-2023</u>

12

Procedeu de separare a vitaminei B9

Prezenta invenție *Procedeu de separare a vitaminei B9* se referă la un procedeu de separare a vitaminei B9 din soluții apoase diluate utilizând, ca faza organică un amestec de heptan și un lichid ionic (CYPHOS IL103).

Vitaminele sunt compuși chimici utilizați de toate ființele vii în procesele metabolice esențiale (indeplinesc rol de cofactori enzimatici) [1]. Vitamina B9, ajută organismul să mențină și să creeze noi celule, prevenind în același timp modificările ADN-ului, fiind esențială pentru buna funcționare a unui număr de procese fiziologice la om, cum ar fi: biosinteza nucleotidelor, diviziunea celulară și expresia genelor, dar mai ales datorită acțiunii de prevenire a: bolilor vasculare, a anemiei megaloblastice, sau a defectelor tubului neuronal la copiii în curs de dezvoltare [2-3]. Vitamina B9 are numeroase aplicații în industria farmaceutică, nutraceutică, alimentară și a băuturilor [4], dar stabilitatea sa scade atunci când este expusă la lumină, umiditate, medii puternice acide sau alcaline, oxigen și temperaturi ridicate.

Separarea și concentrarea eficientă a unui produs obținut prin fermentație joacă un rol cheie în succesul comercial al unui proces biochimic. Chiar atunci când procesul de fermentație oferă rezultate optime, recuperarea produsului poate constitui o limitare a acestuia. Unele procese, ca de exemplu schimbul ionic, sunt procedee discontinue, care necesită un tratament preliminar al lichidelor de fermentație. Alte tehnici, ca filtrarea și ultracentrifugarea pot fi utilizate în regim continuu, dar necesită pre-derivatizarea solutului, fapt ce limitează domeniile de aplicare și crește costurile. Separările prin cromatografie sunt foarte eficiente, dar necesită pregătire preliminară a lichidelor de fermentație, volum mare de muncă și costuri ridicate. Extracția reprezintă operația de separare a componentelor unui amestec lichid sau solid pe baza diferenței de solubilitate a acestora în unul sau mai mulți solvenți. Diferite substanțe biologice active, acizi carboxilici (acid galic [5,6], acid cetogluconic [7], acid pseudomonic [8], acid lactic [9]) și vitamine (vitamina C [10], vitamina B5 [11]) au fost separate cu succes prin această metodă. Extracția reactivă este o tehnică de separare consolidată în industria extractivă metalurgică, care a fost utilizată eficient în numeroase procese, însă nu și pentru separarea industrială a acizilor carboxilici. Pentru sustenabilitatea acestui proces, găsirea unui sistem de extracție (solvent și extractant) selectiv și accesibil, bazat pe eficiență maximă și toxicitate minimă, și determinarea condițiilor ideale de implementare sunt provocările cheie în utilizarea extracției reactive pentru recuperarea acizilor organici. Impulsionată de creșterea gradului de conștientizare privind siguranța în ingineria chimică, dar mai ales legat de durabilitate și sustenabilitate din punct de vedere al mediului, dar și de creșterea gradului de reglementare,

sunt necesare noi soluții pentru procese chimice mai ecologice. Utilizarea solvenților organici este unul dintre principalii factori care afectează riscul și impactul asupra mediului al unui proces chimic, deoarece acesta reprezintă de obicei mai mult de 50% din materialele utilizate în producția unui medicament sau a altor substanțe chimice fine. O clasă interesantă de compusi cu aplicabilitate în industria chimică sunt lichidele ionice, care în ultimele decenii, au numeroase aplicații de succes în acest domeniu datorită reactivității lor unice. Cu multiple posibilități obținute prin combinarea și modificarea structurii cationice și anionice, lichidele ionice pot îndeplini cerințele pentru diferite tipuri de reacție și configurații, atât din punct de vedere chimic și tehnic în laborator, cât și la scară industrială.

În prezent, separarea și purificarea vitaminei B9 din lichidele de fermentație implică filtrarea biomasei și sorbția vitaminei pe anioniți, după o purificare prealabilă a filtratului prin tratamente termice și chimice. În schimb, eluția acidului folic, cu soluții bazice (NaOH), trebuie să se realizeze în condiții blânde, deoarece stabilitatea acestuia este maximă doar în intervalul de pH = 4 -12, ceea ce constituie o limitare semnificativă a procesului de separare.

Scopul invenției îl reprezintă utilizarea unui procedeu original de separare a vitaminei B9 prin extracție utilizând ca fază organică, un amestec de lichid ionic (Cyphos IL103) și solvent organic (heptan).

Invenția are aplicabilitate în industria farmaceutică, alimentară și chimică.

Sistemul de extracție ales este unul inovativ, cu impact scazut asupra mediului [12], oferind o serie de avantaje superioare celorlalte sisteme clasice:

- ✓ Prin acest procedeu randamentul separării este de 99%
- ✓ Acest procedeu permite utilizarea echipamentelor deja existente
- ✓ Prin acest procedeu este posibilă reextracția vitaminei B9 din amestecul organic ceea ce realizează simultan și regenerarea acestuia
- ✓ Acest procedeu este ecologic, datorită toxicității scăzute a sistemului de extracție
- ✓ Prin acest procedeu se crește eficiența separării vitaminei B9
- ✓ Prin acest procedeu se reduce numărul etapelor necesare separării
- ✓ Acest procedeu reduce costurile procesului de separare

Procedeul, conform invenției, presupune parcurgerea următoarelor etape: în prima etapă are loc extracția vitaminei B9 din faza apoasă (obținută din procesul de biosinteză sau din sinteză chimică) cu o soluție de Cyphos IL103 dizolvat în heptan (heptan și octanol), iar în a doua etapă are loc reextracția vitaminei B9 din extract cu o soluție apoasă de NaOH.

Se dau următoarele exemple de realizare a invenției:

Exemplul I:

Se prepara 20 ml de soluție de vitamina B9 (0.04 g/l) căreia i se corectează pH-ul la valoarea 3 folosind o soluție de H₂SO₄ 4%. Extracția are loc prin amestecarea soluției apoase cu 20 ml heptan în care a fost dizolvat 120 g/l Cyphos IL103, pentru minim 10 minute, utilizând un sistem de agitare intensă (agitator vortex), care asigură o turație de minim 1200 rpm, la 25 °C. Emulsia rezultată se separă prin centrifugare, timp de 10 minute la 4000 rpm. Randamentul extracției este de 98%. Extractul obținut se supune reextracției cu o soluție apoasă de NaOH având pH 9 sub o intensă amestecare a fazelor (1200 rpm, timp de 15 minute), ceea ce asigură și regenerarea solventului și un randament de 96%.

Exemplul II:

Se prepara 20 ml de soluție de vitamina B9 careia i se corectează pH-ul la valoarea 3 folosind o soluție de H₂SO₄ 4%. Extracția are loc prin amestecarea acestei soluții cu 20 ml fază organică conținând 140 g/l lichidul ionic Cyphos IL103 dizolvat în heptan care conține 10% octanol, timp de minim 20 minute utilizând un sistem de agitare intensă, care asigură o turație de minim 1800 rpm, la 25 °C. Emulsia rezultată se separă prin centrifugare timp de 10 minute la 4000 rpm. Randamentul extracției este de 99.56%. Extractul obținut se supune reextracției cu o soluție apoasă de NaOH având pH 9 sub o intensă amestecare a fazelor (1800 rpm, timp de 25 minute), ceea ce asigură și regenerarea solventului și un randament de 97%.

BIBLIOGRAFIE

1. Yang, H.; Zhang, X.; Liu, Y.; Liu, L.; Li, J.; Du, G.; et al. Synthetic Biology-Driven Microbial Production of Folates: Advances and Perspectives. *Bioresour. Technol.* **2021**, *324*, 124624. doi:10.1016/j.biortech.2020.124624
2. Menezo, Y.; Elder, K.; Clement, A.; Clement, P. Folic Acid, Folinic Acid, 5 Methyl TetraHydroFolate Supplementation for Mutations That Affect Epigenesis through the Folate and One-Carbon Cycles. *Biomolecules* **2022**, *12*, 197. <https://doi.org/10.3390/biom12020197>
3. Wang, Y.; Liu, L.; Jin, Z.; Zhang, D. Microbial Cell Factories for Green Production of Vitamins. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, *9*, DOI=10.3389/fbioe.2021.661562
4. Quadintel - Global Folic Acid Market Size study, by Application (Dietary Supplements, Cosmetics, Pharmaceuticals, and Other Applications), and Regional Forecasts 2022-2028, 2022, Report ID: QI037
5. Aras, S.; Demir, Ö., Gök, A. et al. Reactive extraction of gallic acid by trioctylphosphine oxide in different kinds of solvents: equilibrium modeling and thermodynamic study. *Braz. J. Chem. Eng.* 2022. <https://doi.org/10.1007/s43153-022-00292-w>
6. Blaga, A.C.; Dragoi, E.N.; Munteanu, R.E.; Cascaval, D.; Galaction, A.I. Gallic Acid Reactive Extraction with and without 1-Octanol as Phase Modifier: Experimental and Modeling. *Fermentation* 2022, *8*, 633. <https://doi.org/10.3390/fermentation8110633>
7. Lazar, R.G.; Blaga, A.C.; Dragoi, E.N.; Galaction, A.I.; Cascaval, D. Application of reactive extraction for the separation of pseudomonic acids: Influencing factors, interfacial mechanism, and process modelling. *Can. J. Chem. Eng.* 2021, *100*, S246–S257.
8. Georgiana, L.R.; Cristina, B.A.; Niculina, D.E.; Irina, G.A.; Dan, C. Mechanism, influencing factors exploration and modelling on the reactive extraction of 2-ketogluconic acid in presence of a phase modifier. *Sep. Purif. Technol.* 2020, *255*, 117740
9. Demmelmayr, P.; Kienberger, M. Reactive extraction of lactic acid from sweet sorghum silage press juice, *Sep. Purif. Technol.* 2022, *282*, 120090
10. Blaga, A.C., Malutan, T. Selective Separation of Vitamin C by Reactive Extraction, *J. Chem. Eng. Data* 2012, *57*, 2, 431–435 <https://doi.org/10.1021/jc2010193>
11. Poștaru, M.; Bompă, A.S.; Galaction, A.I.; Blaga, A.C.; Cașcaval D. Comparative Study on Pantothenic Acid Separation by Reactive Extraction with Tri-n-octylamine and Di-(2-ethylhexyl) Phosphoric Acid. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2016, *30* (1) 81–92 doi: 10.15255/CABEQ.2015.2194
12. Jessop, P.G. Searching for green solvents. *Green Chem.* 2011, *13*, 1391–1398

REVENDICARE

Procedeu de separare a vitaminei B9 din solutia apoasa obtinuta prin biosinteza sau sinteza chimica, **caracterizat prin aceea ca** solutia apoasa care contine vitamina B9 se supune extractiei cu heptan și octanol (10%) in care a fost adaugat 120 g/L Cyphos IL103, sub agitare la 1200 rpm, timp de 10 minute și temperatura de 25 °C. Separarea celor doua faze se realizeaza prin centrifugare la 4000 rpm, iar reextractia se realizeaza cu o solutie apoasa de pH 9 sub o intensa amestecare a fazelor (minim 1200 rpm, timp de 15 minute).