



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **117275** (13) **C2**
(51) МПК (2018.01)
A61K 41/00
A61P 35/00
A61P 39/06 (2006.01)
G01N 27/76 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2016 08369</p> <p>(22) Дата подання заявки: 29.07.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.07.2018</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 12.02.2018, Бюл.№ 3</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2018, Бюл.№ 13</p>	<p>(72) Винахідник(и): Курейшевич Алефтіна Вікторівна (UA), Лошицький Павло Павлович (UA), Незбрицька Інна Миколаївна (UA), Васильченко Ольга Анатоліївна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ГІДРОБІОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, просп. Героїв Сталінграда, 12, м. Київ, 04210 (UA)</p> <p>(74) Представник: Сазонов Володимир Вікторович, реєстр. №183</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: ТИМОШЕНКО Л.С. Екстракція фікобіліпротеїнів з мікрowodоростей // ПОЛІТ. Сучасні проблеми науки. Екологічна безпека: тези доповідей XVI міжнародної науково-практичної конференції молодих учених і студентів, м. Київ, 6-8 квітня 2016р., Національний авіаційний університет/редкол. О.І. Запорожець. – К.: НАУ. – 2016. – С.46 SU 1790837 A1, 30.01.1993 UA 78738 U, 25.03.2013 UA 85219 U, 11.11.2013 CN 101830535 A, 15.09.2010 JP 3775855 B2, 17.05.2006 НЕЗБРИЦЬКА І.М., КУРЕЙШЕВИЧ А.В. Зміна вмісту фікобіліпротеїнів у клітинах <i>Suaurocaryota</i> за умов впливу підвищеної температури культурального середовища /Актуальні проблеми ботаніки та екології. Матеріали міжнародної конференції молодих учених. – Умань: Видавець «Сочінський». – 2014. – С. 133 VERÓNICA CRUZ de JESÚS et al. Methods for Extraction, Isolation and Purification of C-phycoyanin: 50 years of Research in Review / Verónica Cruz de Jesús, Gabriel Alfonso Gutiérrez-Rebolledo, Marcela Hernández-Ortega // International Journal of Food and Nutritional Science. – 2016. – № 3. – P. 1–10</p>
---	---

UA 117275 C2

(54) СПОСІБ ЗБІЛЬШЕННЯ ВИХОДУ ФІКОБІЛІПРОТЕЇНІВ З БІОМАСИ ЦІАНОБАКТЕРІЙ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу збільшення виходу фікобіліпротеїнів - С-фікоеритрину, С-фікоціаніну та алофікоціаніну з біомаси ціанобактерій полягає у застосуванні одноразового короткочасового впливу імпульсного магнітного поля або шумового височастотного електромагнітного випромінювання на ці мікроорганізми після нарощування їх біомаси в умовах, оптимальних для продуктивності та синтезу фікобіліпротеїнів.

Запропонований винахід належить до біотехнології, зокрема до технології отримання з біомаси ціанобактерій фікобіліпротеїнів (ФБ) - с-фікоеритрину, с-фікоціаніну та алофікоціаніну, що є водорозчинними пігментами білкової природи, та використовуються як природні барвники в харчовій промисловості, у медицині при діагностиці онкологічних захворювань, а також, завдяки їх сильним антиоксидантним властивостям, у фармакології для лікування злоякісних пухлин.

Вартість фікобіліпротеїнів на ринку дуже висока і становить в залежності від ступеня очистки від 3-25 доларів (для косметичних та харчових цілей) до 1500 доларів за мг - для високоочищених молекулярних маркерів (Anuja A. Kenekar et Manjushrs A. Deodhar// *Biotechnology*, 2013. Vol 12, Iss. 3,-P. 146-154, 2013). Тому розробка методів збільшення виходу фікобіліпротеїнів з біомаси ціанобактерій становить суттєвий практичний інтерес.

Як відомо, підвищення вмісту фікобіліпротеїнів у біомасі ціанобактерій досягають шляхом оптимізації фізико-хімічних параметрів їх вирощування, таких як інтенсивність освітлення, температура, вміст біогенних елементів (Anuja A. Kenekar, Manjushri A. Deodhar. *Effect of Varying Physicochemical Parameters on the Productivity and Phycobiliprotein Content of Indigenous Isolate Geitlerinema sulphureum* // *Biotechnology*, 2013. Vol 12, Iss. 3,-P. 146-154). Однак умови для максимального накопичення сухої маси ціанобактерій та вмісту фікобіліпротеїнів у ній, як правило, не співпадають. Так, оптимальною для росту культури *Geitlerinema sulphureum* була освітленість 1400 лк, в той час як для синтезу ФЦ - 700 лк. Оптимальною для росту культури була температура 30 °С, а для накопичення фікоціаніну - 20 °С

Це викликає необхідність розробки найбільш ефективних фізичних методів підвищення вмісту фікобіліпротеїнів у біомасі ціанобактерій перед її вилученням у біотехнологічному процесі для отримання з неї ФБ.

Відомий спосіб підвищення вмісту фікоціаніну (ФЦ) у біомасі ціанобактерії *Spirulina platensis* (*S. platensis*) шляхом вирощування її у магнітному полі з густиною магнітного потоку 100 Ге, в умовах якого вміст ФЦ на 6-ту добу збільшувався приблизно в 1,5 разу порівняно з показниками за 0,5 Ге (геомагнітне поле) (Morio Hirano, M., Akira Ohta, Katsuya Abe. *Magnetic field effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium Spirulina platensis* // *J. of Fermentation and Bioengineering*. - 1998, N3. - P. 313-316).

Основними недоліками цього способу є те що для отримання максимального ефекту необхідно вирощувати ціанобактерії у магнітному полі протягом як мінімум 6-и діб, що є незручним у біотехнологічному процесі. Крім того, в зазначеній роботі представлені дані щодо зміни вмісту в біомасі ціанобактерій лише одного з фікобіліпротеїнів - фікоціаніну.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб в якому ціанобактерію *Anabaena doliolum* експонували на двох полюсах (північний та південний) постійного магніту 0,3 Тесла протягом 1-6 годин 6 діб. Це що призводило до зміни величин низки біологічних показників, у тому числі до підвищення вмісту фікоціаніну, максимально в 1,7 разу порівняно з контролем на північному полюсі магніту (Singh S.S., Tiwari S.P., Abraham J., Rai S., Rai Ashwani K. *Magnetobiological effects on a cyanobacterium Anabaena doliolum* // *Electro-and Magnetobiology*. - 1994, 13(3). - P. 227-235).

Основними недоліками зазначеного способу є те, що для отримання ефекту збільшення вмісту ФЦ у біомасі ціанобактерій потрібно повторювати процедуру впливу магнітного поля на них декілька діб протягом 1-6 годин. Необхідність повторного впливу дуже часто неможлива або скрутна через технологічні особливості виробництва. Крім того, в зазначеній роботі також представлені дані щодо зміни вмісту в біомасі ціанобактерій лише одного з фікобіліпротеїнів - фікоціаніну.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалення способу підвищення вмісту фікобіліпротеїнів - с-фікоеритрину, с-фікоціаніну та алофікоціаніну у біомасі ціанобактерій за допомогою одноразового впливу фізичного чинника після попереднього накопичення біомаси за умов, оптимальних для продуктивності ціанобактерій і синтезу фікобіліпротеїнів.

Поставлена задача випішується завдяки тому, що вплив фізичного фактора здійснюють не на окремий організм, який потребує повторних зовнішніх впливів для регулювання його розвитку, а на популяцію багатоклітинних нитчастих трихомних ціанобактерій, для яких досить одноразового впливу для зміни програми розвитку всієї популяції.

У запропонованому винаході новим є застосування одноразового короткочасового впливу імпульсного магнітного поля або високочастотного електромагнітного випромінювання на ціанобактерії після накопичення їх біомаси за умов оптимальних для їх продуктивності і синтезу фікобіліпротеїнів.

Запропонований спосіб підвищення виходу ФБ, синтезованих ціанобактеріями, здійснюють наступним чином.

Спочатку нарощують біомасу ціанобактерій (*Phormidium autumnale* f. *uncinatum*) на стандартному поживному середовищі (Фітцджеральда у модифікації Дендера і Горхема) за температури 25 ± 2 °C та освітленості 2500 лк, після чого на них впливають фізичним чинником.

Як фізичні чинники використовують:

5 імпульсне магнітне поле (ІМП) з наступними параметрами:

форма імпульсу - меандр,

амплітуда - 50 мТл,

частота повторення - 50 Гц;

або високочастотне шумове електромагнітне випромінювання (ШЕМВ) з параметрами:

10 смуга робочих частот - 57-68 ГГц,

спектральна щільність потужності шуму - 10^{-19} Вт / Гц.

З біомаси ціанобактерій отримують екстракти, в них досліджують наявність фікобіліпротеїнів та за допомогою спектрофотокolorиметра визначають окремо вміст пігментів: алофікоціаніну (APC), с-фікоціаніну (C-PC); с-фікоеритрину (C-PE).

15 У таблиці 1 наведені значення вмісту фікобіліпротеїнів за впливу магнітного поля, а у таблиці 2 - за впливу високочастотного шумового електромагнітного випромінювання на культуру *Phormidium autumnale* f. *uncinatum*.

Таблиця 1

Вміст фікобіліпротеїнів у біомасі *Phormidium autumnale* f. *uncinatum* після впливу імпульсного магнітного поля (ІМП)

Фізичний чинник, час впливу	Фікобіліпротеїни, mg/g сухої маси		
	C-PE	C-PC	APC
Контроль	5,00±0,09	20,00±1,20	3,56±0,06
ІМП 3 хв.	8,14±0,35	34,65±2,12	5,49±0,22
ІМП 6 хв.	10,95±0,46	38,09±2,28	6,40±0,17
ІМП 9 хв.	10,00±0,30	40,36±2,05	8,14±0,37
ІМП 12 хв.	4,25±0,11	18,00±1,00	3,13±0,12
ІМП 15 хв.	3,68±0,16	13,16±0,59	2,50±0,12

20 Відповідно до даних таблиці 1, вплив імпульсного магнітного поля на культуру *Phormidium autumnale* f. *uncinatum* приводить до суттєвого збільшення вмісту фікобіліпротеїнів у біомасі ціанобактерії. За впливу магнітного поля протягом 9 хвилин це збільшення становило: с-фікоеритрину - 100 %, с-фікоціаніну - 101,8 %, алофікоціаніну - 127,4 %.

Таблиця 2

Вміст фікобіліпротеїнів у біомасі *Phormidium autumnale* f. *uncinatum* після впливу шумового високочастотного електромагнітного випромінювання (ШЕМВ)

Фізичний чинник, час впливу	Фікобіліпротеїни, mg/g сухої маси		
	C-PE	C-PC	APC
Контроль	5,00±0,09	20,00±1,20	3,56±0,06
ШЕМВ 5 хв.	5,19±0,24	22,11±1,35	4,09±0,08
ШЕМВ 10 хв.	11,74±0,43	53,26±2,00	8,70±0,23
ШЕМВ 15 хв.	7,80±0,22	38,29±1,68	5,93±0,14
ШЕМВ 20 хв.	3,33±0,14	14,91±0,81	2,11±0,10

25 Як видно з даних таблиці 2, за впливу шумового високочастотного електромагнітного випромінювання на досліджувану культуру, вміст фікобіліпротеїнів також суттєво збільшується. Позитивний ефект опромінення досягається за впливу тривалістю 10-15 хвилин. Максимальне збільшення вмісту пігментів у біомасі ціанобактерії відбувається за впливу шумового електромагнітного випромінювання протягом 10 хвилин, при цьому кількість с-фікоеритрину збільшилася на 134,8 % в порівнянні з контролем, с-фікоціаніну - на 166,3 %, алофікоціаніну - на 143,02 %.

30 Отже, застосування одноразового впливу як імпульсного магнітного поля, так і шумового високочастотного електромагнітного випромінювання, призводить до дуже суттєвого

збільшення виходу фікобіліпротеїнів з біомаси ціанобактерій. При цьому більший ефект досягається за дії шумового високочастотного електромагнітного випромінювання.

- 5 Таким чином, після етапу нарощування біомаси ціанобактерії в біотехнологічній процесі та одноразового впливу на них фізичних чинників - імпульсного магнітного поля або шумового високочастотного електромагнітного випромінювання, її можна зразу ж вилучати для отримання фікобіліпротеїнів.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 10 Спосіб збільшення виходу фікобіліпротеїнів з біомаси ціанобактерій, який полягає в культивуванні їх за умов, оптимальних для продуктивності і синтезу с-фікоеритрину, с-фікоціаніну та алофікоціаніну, і впливу фізичного чинника на мікроорганізми, який **відрізняється** тим, що біомасу ціанобактерій спочатку накопичують, а перед вилученням на них одноразово впливають:
- 15 протягом 6-10 хвилин імпульсним магнітним полем з параметрами:
 форма імпульсу - меандр,
 амплітуда - 50 мТл,
 частота повторення - 50 Гц;
- 20 протягом 10-15 хвилин шумовим електромагнітним випромінюванням з параметрами:
 смуга робочих частот - 57-68 ГГц,
 спектральна щільність потужності шуму - 10^{-19} Вт/Гц.

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601