



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109645** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
C12R 1/00 (2006.01)
C12N 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2016 02935</p> <p>(22) Дата подання заявки: 22.03.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.08.2016</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.08.2016, Бюл.№ 16</p>	<p>(72) Винахідник(и): Курейшевич (Ліщук) Алефтіна Вікторівна (UA), Незбрицька Інна Миколаївна (UA), Васильченко Ольга Анатоліївна (UA), Миненко Анна Борисівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ГІДРОБІОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, пр. Героїв Сталінграда, 12, м. Київ, 04210 (UA)</p> <p>(74) Представник: Сазонов Володимир Вікторович, реєстр. №183</p>
--	--

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ВМІСТУ ФІКОБІЛІПРОТЕЇНІВ

(57) Реферат:

Спосіб підвищення вмісту фікобіліпротеїнів у біомасі ціанопротокаріотів полягає в накопичувальному культивуванні їх за умов, оптимальних для продуктивності і синтезу с-фікоеритрину, с-фікоціаніну та алофікоціаніну. Для збільшення концентрації фікобіліпротеїнів в біомасі за три дні до її вилучення застосовується комбінований вплив стресових чинників: зменшення освітленості у 5 разів, короткотривале підвищення температури культурального середовища на 8-10°C та додаткове внесення в нього джерела азоту у вигляді NaNO_3 .

UA 109645 U

Корисна модель належить до біотехнології, зокрема до технології отримання фікобіліпротеїнів - с-фікоеритрину, с-фікоціаніну та алофікоціаніну, що використовуються в харчовій промисловості, медицині, а також у фармакології.

Відомий спосіб підвищення вмісту фікобіліпротеїнів у біомасі представника ціанобактерій *Anabaena NCCU* полягає у впливі на неї різних стресових чинників. Ідеальні умови, що були підібрані для цього, наступні: температура 30 °С, біле світло - 25 мкмоль фотонів/м²/сек, рН - 8, співвідношення світлового і темного режимів - 16: 8 годин, середовище без азоту, містить 10 мМ хлориду натрію [Hemlata, Fatma T. Screening of cyanobacteria for phycobiliprotein and effect of different environmental stress on its yield // Bull. Environ. Contam. Toxicol. - 2009. - Vol. 83, N 4. - P.509-515].

Спільні риси з нашою корисною моделлю: мета - підвищення вмісту фікобіліпротеїнів у біомасі ціанобактерій шляхом впливу різних абіотичних чинників.

Недоліком цього способу є те, що не досліджено комбінований вплив стресових чинників на цей показник, а також не відокремлюється етап накопичувального культивування та етап стресового впливу чинників для підвищення вмісту фікобіліпротеїнів.

Відомий також спосіб підвищення вмісту фікобіліпротеїнів у біомасі ціанобактерії *Geitlerinema sulphureum*, який полягає у оптимізації фізико-хімічних параметрів її вирощування (інтенсивність освітлення, температура, вміст біогенних елементів, джерелом яких є нітрати і карбонати [Kenekar A.A., Deodhar M.A. Effect of varying physicochemical parameters on the productivity and phycobiliprotein content of indigenous isolate *Geitlerinema sulphureum* // Biotechnology. - 2013. - Vol. 12, N. 3, - P. 146-154].

Спільні риси з нашою корисною моделлю: мета - підвищення вмісту фікобіліпротеїнів у біомасі ціанобактерій методом варіювання фізико-хімічних параметрів вирощування, таких як освітленість, температура, вміст нітратів у поживному середовищі.

Недолік цього способу полягає в тому, що умови для максимального накопичення сухої маси ціанобактерії та вмісту фікобіліпротеїнів у ній не співпадають. Так, оптимальною для росту культури була освітленість 1400 лк, в той час як для синтезу с-фікоціаніну - 700 лк. Оптимальною для росту культури була температура 30 °С, а для накопичення с-фікоціаніну - 20 °С.

Тому задача корисної моделі направлена на розробку методу підвищення концентрації фікобіліпротеїнів у біомасі ціанобактерій перед її вилученням після закінчення етапу накопичувального культивування їх в оптимальних умовах для продуктивності та синтезу цих біологічно активних сполук.

Інтерес до дослідження фікобіліпротеїнів ціанобактерій (синьо-зелені водорості, ціанопрокаріоти): с-фікоеритрину, с-фікоціаніну та алофікоціаніну обумовлений їх практичним значенням. Вони, поряд з каротиноїдами, займають провідне місце на ринку природних барвників. Роль цих речовин зростає у зв'язку з використанням їх у медицині при діагностиці ракових захворювань, а також в фармакології завдяки їх сильним антиоксидантним, протизапальним, нейропротекторним і гепатопротекторним властивостям, а також у харчовій промисловості.

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 з антитілами та іншими флуоресцентними молекулами (Kenekar, Deodhar, 2013). Тому розробка методів підвищення вмісту фікобіліпротеїнів у біомасі ціанобактерій становить суттєвий практичний інтерес.

Суть корисної моделі полягає в тому, що після етапу накопичувального культивування ціанобактерій в оптимальних умовах для їх продуктивності та синтезу фікобіліпротеїнів, підвищення концентрації цих біологічно активних речовин у біомасі перед її вилученням для подальшого використання з метою виділення фікобіліпротеїнів можна досягти комбінованим впливом низки стресових чинників: зменшення освітленості у 4-5 разів, короткотривалого підвищення температури культурального середовища на 8-10 °С та додаткового внесення в нього джерела азоту у вигляді NaNO₃. Спосіб відрізняється від прототипів тим, що оптимальні умови для накопичення біомаси та синтезу фікобіліпротеїнів і умови культивування перед вилученням біомаси не ідентичні.

Перевагою нашої корисної моделі є те, що після етапу накопичувального культивування ціанобактерії в умовах, оптимальних для їх продуктивності та синтезу фікобіліпротеїнів, застосування комплексу стресових чинників перед вилученням біомаси дає можливість додатково підвищити в ній концентрацію с-фікоеритрину, с-фікоціаніну та алофікоціаніну в 2,5-3,5 разів.

Результати досліджень, що лягли в основу корисної моделі

Нитчаста ціанобактерія *Phormidium autumnale* (C. Agardh) Gomont f. *uncinata* (C. Agardh) N.V. Kondrat. HPDP-36 є хорошою моделлю для досліджень, оскільки швидко накопичує біомасу, що легко відділяється від культурального середовища.

5 Накопичувальне культивування проводили на стерильному середовищі Фітцджеральда №11 в модифікації Цендера і Горхема за освітленості 2500 лк та температури 25-27 °С. До складу середовища входять (г/л): NaNO_3 -0,496; K_2HPO_4 -0,039; MgSO_4 -0,075; CaCl_2 -0,036; Na_2SiO_3 -0,058; Na_2CO_3 -0,020; залізо лимоннокисле - 0,006; лимонна кислота - 0,006; трилон Б - 0,001; мікроелементи - 0,08. До мікроелементів належать: залізо, марганець, цинк, мідь, бор, кремній, молібден, хлор, ванадій і кобальт. рН середовища становила 7,2.

10 Колби об'ємом 250 мл засівали однаковою біомасою формідіума. Тривалість накопичувального культивування становила місяць.

Після накопичення біомаси культури на неї впливали стресовими чинниками, такими як низька інтенсивність освітлення (зменшення освітленості до 500 лк), тепловий шок (нагрівання колб з культурами до 35 °С протягом однієї години на добу), внесенням в культуру додаткового джерела азоту - NaNO_3 , враховуючи той факт, що азот входить до складу молекул фікобіліпротеїнів. З метою досягнення максимального виходу фікобіліпротеїнів з біомаси формідіума досліджували вплив як окремих чинників, так і їх комбіновану дію. Тривалість впливу перерахованих чинників на культуру ціанобактерії складала 3 доби.

Варіанти досліджень:

20 Варіант 1 - контроль: формідіум продовжували культивувати без впливу стресових чинників за освітленості 2500 лк та температури 25-27 °С.

Варіант 2: після накопичувального культивування формідіум витримували за освітленості 500 лк та температури 25-27 °С;

Варіант 3: внесення в культуру 1 г/л NaNO_3 , освітленість та температура такі, як у контролі;

25 Варіант 4: внесення в культуру 1 г/л NaNO_3 , освітленість 500 лк, температура така, як у контролі.

Варіант 5: внесення в культуру 2 г/л NaNO_3 , освітленість 500 лк, температура така, як у контролі;

Варіант 6: внесення в культуру 2 г/л NaNO_3 , освітленість та температура такі, як у контролі;

30 Варіант 7: тепловий шок (збільшення температури культурального середовища до 35 °С протягом 1 год./добу), освітленість така, як у контролі;

Варіант 8: внесення в культуру 1 г/л NaNO_3 , тепловий шок, освітленість така, як у контролі;

Варіант 9: внесення в культуру 1 г/л NaNO_3 , освітленість 500 лк та тепловий шок;

Варіант 10: внесення в культуру 2 г/л NaNO_3 , тепловий шок, освітленість така, як у контролі;

35 Варіант 11: внесення в культуру 2 г/л NaNO_3 , освітленість 500 лк та тепловий шок.

Отримані дані (таблиця) свідчать про те, що, знижуючи освітленість з 2500 до 500 лк, тобто в п'ять разів, вміст с-фікоеритрину (С-ФЕ) у сухій масі формідіума вдалося збільшити в 2,2, а с-фікоціаніну (С-ФЦ) та алофікаціаніну (АФЦ) - в 2,4 рази. Внесення до поживного середовища додаткового джерела азоту (1 г/л NaNO_3) та зменшення освітленості в п'ять разів призводить приблизно до такого ж підвищення вмісту фікобіліпротеїнів: С-ФЕ - у 2,3 рази, а ФЦ та АФЦ - в 2,5 рази. Найбільш суттєво вміст фікобіліпротеїнів у сухій масі формідіума збільшувався при стресовій дії трьох чинників: зменшенні освітленості в п'ять разів, нагріванні культури до 35 °С (1 год./добу) та додаванні до неї додаткового джерела азоту (1 г/л NaNO_3). В таких умовах вміст С-ФЕ збільшився в 2,8 рази, С-ФЦ - в 3,5 рази, а АФЦ - в 2,5 рази.

45 Важливо наголосити, що найбільш суттєво в таких умовах збільшився вміст фікоціанану, перспективного для діагностики та лікування пухлин.

Таблиця

Дія окремих чинників та їх сумісний вплив на вміст фікобіліпротеїнів у сухій масі *Phormidium autumnale* f. *Uncinata*

Варіанти досліду	Варіанти досліду		
	Варіант 1 (контроль)	5,0±0,48	7,3±0,59
Варіант 2	11,0±0,80	17,5±0,88	8,6±0,72
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів у порівнянні з контролем (рази)	2,2	2,4	2,4
	С-ФЕ	С-ФЦ	АФЦ

Продовження таблиці

Варіанти досліджу	Варіанти досліджу		
Варіант 3	6,5±0,41	9,5±0,74	4,5±0,22
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів	1,3	1,3	1,3
	С-ФЕ	С-ФЦ	АФЦ
Варіант 4	11,5±0,85	18,3±1,11	9,0±0,51
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів	2,3	2,5	2,5
	С-ФЕ	С-ФЦ	АФЦ
Варіант 5	4,2±0,40	6,1±0,37	3,0±0,25
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів	-	-	-
	С-ФЕ	С-ФЦ	АФЦ
Варіант 6	4,9±0,50	6,4±0,44	3,0±0,40
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів	-	-	-
	С-ФЕ	С-ФЦ	АФЦ
Варіант 7	4,7±0,39	6,6±0,43	2,8±0,18
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів	-	-	-
	С-ФЕ	С-ФЦ	АФЦ
Варіант 8	6,5±0,52	9,5±0,48	4,7±0,54
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів	1,3	1,3	1,3
	С-ФЕ	С-ФЦ	АФЦ
Варіант 9	14,0±0,73	25,6±1,43	9,0±0,78
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів	2,8	3,5	2,5
	С-ФЕ	С-ФЦ	АФЦ
Варіант 10	9,0±0,59	12,4±0,67	6,1±0,37
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів	1,8	1,7	1,7
	С-ФЕ	С-ФЦ	АФЦ
Варіант 11	3,8±0,21	6,2±0,30	3,3±0,25
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів	-	-	-

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб підвищення вмісту фікобіліпротеїнів у біомасі ціанопрокаріотів, який полягає в накопичувальному культивуванні їх за умов, оптимальних для продуктивності і синтезу с-фікоеритрину, с-фікоціаніну та алофікоціаніну, який **відрізняється** тим, що для збільшення концентрації фікобіліпротеїнів в біомасі за три дні до її вилучення застосовується комбінований вплив стресових чинників: зменшення освітленості у 5 разів, короткотривале підвищення температури культурального середовища на 8-10°C та додаткове внесення в нього джерела азоту у вигляді NaNO_3 .
- 10

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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