



УКРАЇНА

(19) UA (11) 93767 (13) C2
(51) МПК
C12N 1/12 (2011.01)
C12P 21/04 (2011.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФІКОЕРИТРИНУ З ЧЕРВОНОЇ МІКРОВОДОРОСТІ

1

(21) a200907911

(22) 27.07.2009

(24) 10.03.2011

(46) 10.03.2011, Бюл.№ 5, 2011 р.

(72) ГУДВІЛОВИЧ ІРИНА МИКОЛАЇВНА, БОРОВ-
КОВ АНДРІЙ БОРИСОВИЧ, ТРЕНКЕНШУ РУ-
ДОЛЬФ ПАВЛОВИЧ(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРІВ ІМ.
О.О. КОВАЛЕВСЬКОГО НАН УКРАЇНИ

(56) RU C2 2315094, 27.02.2006

US 5358858, 25.10.1994

Jiri Kopecky, Markus Rlederer, Erhard Funde,
Porphyridium purpureum (formerly P. cruentum)
contains ?-carotene but no ?-carotene,
Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart
2002Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Фуряев Е.А., Ярун-
цов О.А. Ростовые и продукционные показатели
водоросли Porphyridium cruentum в плотных куль-
турах // Интенсивная светокультура растений. -
Красноярск: ИФСО, 1977. - С. 191 - 200Темных А.А., Сидько Ф.Я., Тренкеншу Р.П. Влия-
ние азота, фосфора и железа на рост Порфириди-

2

ума в накопительной культуре. - Красноярск, 1984.
- 20 с.

(57) Спосіб одержання В-фікоеритрину з червоної мікроводорості, що включає культивування водоростей, відбір і промивку біомаси, руйнування біомембран, екстрагування пігменту, який **відрізняється** тим, що для одержання В-фікоеритрину червону мікроводорість Porphyridium purpureum культують в умовах природного або штучного освітлення при барботуванні газоповітряною сумішшю з 3 % CO₂ із застосуванням поживного середовища Тренкеншу і квазібезперервного режиму культивування, відбір біомаси здійснюють при щоденному обміні, а для руйнування біомембран 6-9 разів проводять процедуру "заморожування-відтавання", після чого пігмент екстрагують водним буферним розчином з рН = 7-7,5 в співвідношенні 1:3 протягом 24 годин при 3-5 °С у відсутності світла, з подальшим центрифугуванням і додаванням етилового спирту до кінцевої концентрації 20 %.

Передбачуваний винахід відноситься до біотехнології і призначений для отримання натурально-го пігменту фікоеритрину з мікроводоростей в лабораторних і промислових умовах.

Останнім часом зростає інтерес до використання нетрадиційних джерел сировини для отримання натуральних фарбників, оскільки синтетичні фарбники токсичні. До перспективних харчових фарбників можна віднести і фікоеритрин, що міститься в червоних морських водоростях. Цей червоний пігмент абсолютно нетоксичний, має білкову природу і яскраво виражену оранжеву флуоресценцію, що відкриває широкі перспективи для його використання в харчовій, косметичній і медичній промисловості.

Можливо використовувати для отримання фікоеритрину морські червоні водорості, такі як філофору, грацилярію, лауренцію, гелідіум і ін., проте, в Чорному морі їх запаси обмежені і неухильно скорочуються. Вирощування в промисловій куль-

турі обмежується невисокими швидкостями росту макрофітів, а також сезонністю в динаміці біохімічного складу і накопичення біомаси.

Всі відомі способи виділення фікоеритрину з біомаси водоростей, як правило, включають комбінацію різних методів очищення, таких як: осадження сульфатом амонія, діаліз, іонообмінну хроматографію і на гідроксиапатіте, електрофорез на сульфополіакріламідному гелі і ін. Дані методи дозволяють отримати препарат дуже високої чистоти (яка не потрібна для цілей харчового використання фікоеритрину), але вони малопродуктивні, вимагають складного спеціального дорогого устаткування (промислові колонки, насоси, детектори, градієнтні змішувачі), що приводить до значного дорожчання продукту.

Відомо Спосіб отримання фікоеритрину з високою оптичною щільністю (див. Пат. №2315094, Російська Федерація, МПК C12N1/12). У способі пігмент фікоеритрин отримують екстрагуванням з

(13) C2

(11) 93767

(19) UA

водоростей, вибраних з групи *Galaxaura oblongata*, *Halymenia ceulanica*, *Helminthocladia australis*. Водорості вирощують до стадії утворення колоній, потім збирають і фільтрують. Профільтровані водорості сушать, подрібнюють в порошок, додають в розчин з рівнем рН в межах 5-10. Після центрифугування отримують розчин пігменту, а потім, шляхом додавання 20-30 % насиченого розчину $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ неочищений фікоеритрин. Для отримання неочищеного фікоеритрину з високою оптичною щільністю додають 60-65 % насичений розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Осаджений неочищений фікоеритрин додатково очищають методом гель-хроматографії або ультрафільтрації. До недоліків способу слід віднести трудомісткість і високу собівартість.

В основу винаходу Спосіб отримання фікоеритрину поставлено задачу шляхом максимального спрощення технологічного способу, забезпечити зниження собівартості готового продукту і отримання водного екстракту препарату як харчового фарбника.

Поставлена задача досягається тим, що в способі отримання фікоеритрину з мікроводоростей червону мікроводорість *Porphyridium purpureum* культивують в умовах природного або штучного освітлення, барботування газозовдушною сумішшю з 3% CO_2 , із застосуванням поживного середовища по Тренкеншу і квазібезперервного режиму культивування. Відбір біомаси здійснюють при щоденному обміні. Для руйнування біомембран 6-9 разів проводять процедуру «заморожування-відтавання». Потім екстрагують водним буферним розчином з рН=7-7,5 в співвідношенні 1:3 протягом 24 годин при 3-5 °C у відсутності світла. До отриманого водного розчину пігменту додають етиловий спирт до кінцевої концентрації 20 % для подальшого зберігання.

Передбачуваний винахід пояснюється ілюстрацією. На Фіг. 1 - Спектр поглинання В-фікоеритрину, виділеного з червоної мікроводорості *Porphyridium purpureum*.

Червона мікроводорість *Porphyridium purpureum* викликає великий інтерес у дослідників як джерело різноманітних біологічно цінних речовин. Біомаса *Porphyridium purpureum*, вирощена в інтенсивних умовах, є джерелом широкого спектру біологічно активних речовин, таких як: фотосинтетичні пігменти (хлорофіл-а, каротиноїди, В-фікоеритрин), позаклітинні сульфополісахариди і ненасичені жирні кислоти, зокрема арахідонова і ейкозапентаєнова кислоти. Фікоеритрин - білковий комплекс, що входить до складу фотосинтезуючих пігментних комплексів червоних водоростей. З червоної одноклітинної водорості *Porphyridium purpureum* виділені два ФЕ: В-ФЕ і b-ФЕ, останній відрізняється від попереднього меншою часткою короткохвильового поглинання. Кількість фікоеритрину у водорості *Porphyridium purpureum* може досягати 50 % від загальної суми ФБП. Співвідношення ФБП в *Porphyridium purpureum* (В-ФЕ – 84 %, R-ФЕ -11 %, АФЕ-25 %).

Винахід може бути реалізовано таким чином:

1. Інтенсивне культивування мікроводорості *Porphyridium purpureum* в умовах зростання, оптимальних для накопичення фікоеритрину

Культивування мікроводорості може проводитися в квазібезперервному і накопичувальному режимах, проте, в умовах, що виключають лімітацію по азоту і вуглецю. У разі накопичувального культивування відбір біомаси здійснюється на лінійній стадії зростання, а при квазібезперервному - щодня при здійсненні обміну середовища. У такому разі кількість позаклітинних полісахаридів, що перешкоджають руйнуванню клітинних стінок, мінімальна. Найбільш сприятливі умови для накопичення фікоеритрину при лабораторному культивуванні: температура - 26 °C, освітленість - 40Вт/м²·сек, барботаж газозовдушною сумішшю з 3% CO_2 , поживне середовище Тренкеншу; при промислового: температура - 18-28 °C, освітленість - природна, барботаж газозовдушною сумішшю з 3 % CO_2 , поживне середовище по Тренкеншу.

2. Відділення біомаси водоростей від культурального середовища

Відділення біомаси водоростей від культурального середовища здійснюється декількома способами: сепарацією, центрифугуванням або з використанням природних гравітаційних сил (відстоювання культури мікроводорості протягом 2 годин). Перші два методи достатньо енергоємні, але дають можливість ефективно відокремити біомасу від культурального середовища. Враховуючи, що клітки мікроводорості *Porphyridium purpureum* об'єднані в конгломерати і легко осідають при відстоюванні, можливо використовувати третій спосіб для зниження собівартості кінцевого продукту.

3. Промивання біомаси *Porphyridium purpureum*

Для видалення солей біомаса заливається водою в кількості, еквівалентній об'єму культуральної рідини, що зливається. Для видалення рідини використовуються методи, описані в п.2.

4. Руйнування клітинних стінок *Porphyridium purpureum*

Полнота екстракції В-фікоеритрину водним буфером залежить від ступеня деструкції клітинних оболонок. На сьогоднішній день існує велика кількість методів руйнування клітинних оболонок. Одним з найбільш простих є чергування циклів заморожування-розтавання. Проте, одноразовий цикл не дає повного руйнування клітинних оболонок червоної мікроводорості *Porphyridium purpureum*. При цьому тривалість знаходження в замороженому стані і об'єм розчинника не є визначальними. З іншого боку, велика кількість заморожувань є недоцільною з точки зору праці - і енерговитрат. При відборі біомаси на лінійній стадії зростання (або квазібезперервна культура) досить виконати шість циклів для руйнування основної кількості біомембран і подальшого витягання більшої частини фікоеритрину. Дев'ять циклів досить для руйнування всіх біомембран і для кількісного визначення фікоеритрину.

5. Екстрагування пігментів з біомаси клітин

Екстракція проводиться водним буферним розчином з рН=7-7,5 (у співвідношенні 1:3) протягом 24 годин на холоді в темноті. Дані умови сприяють стабілізації хімічної структури фікоеритрину.

6. Відділення екстракту від баластних речовин.

Відділення екстракту пігменту від домішок проводиться за допомогою центрифугування (1600g, 5 мин.).

7. Контроль якості одержаного продукту

Якісний і кількісний аналіз розчину В-фікоеритрину проводиться за допомогою методу спектрофотометрії, шляхом вимірювання спектра поглинання розчину в діапазоні довжин хвиль 400-800 нм.

Концентрацію пігменту у водному екстракті визначають згідно рівнянню, використовуючи значення оптичної щільності при довжинах хвиль: 650, 615, 545 нм:

$$B - PE = 0,023D_{650} - 0,063D_{615} + 0,100D_{545}$$

Чистота пігменту визначається відсутністю в розчині домішок інших пігментів або інших білків. Для обчислень використовуються значення оптичної щільності при довжинах хвиль: 620, 545, 495, 280 нм.

$$D_{545} / D_{280} \geq 5,0$$

Відношення D_{545}/d_{280} показує чистоту препарату щодо більшості форм забруднюючих білків. Величина поглинання на довжині хвилі 280 нм в екстракті фікоеритрину, головним чином, обумовлена ароматичними амінокислотами і вона приблизно пропорційна загальній концентрації білків в розчині, включаючи В-фікоеритрин. Величина поглинання на 545 нм відображає тільки концентрацію В-фікоеритрина.

$$D_{620} / D_{545} \leq 0,02$$

Відношення D_{620}/d_{545} приблизно показує рівень забруднення R-фікоціанином, не дивлячись на те, що В-фікоеритрина має незначне поглинання на 620 нм.

8. Зберігання розчину пігменту.

До отриманого водного розчину пігменту додається етиловий спирт до кінцевої концентрації 20% для подальшого зберігання (у темноті при $t = 3 - 5^{\circ}\text{C}$).

Приклад

Культивування мікроводорості *Porphyridium purpureum* проводили в 5л плоскопаралельних

скляних культиваторах в квазібезперервному режимі. За умов: поживне середовище Тренкеншу, температура - 26°C , цілодобове освітлення з освітленістю - $40 \text{ Вт/м}^2\cdot\text{сек}$, цілодобовий барботаж газоповітряною сумішшю з 3 % CO_2 . Відділення біомаси мікроводорості від культурального середовища здійснювали за допомогою центрифуги ОС-6М при 2500 об/хв і чиннику розділення 1600g. Отриманий осад ресуспендували у воді і повторно центрифугували в тих же умовах. Для руйнування клітинних стінок *Porphyridium purpureum* до 100 г сирової біомаси додавали 100 мл дистильованої води і поміщали в морозильну камеру з температурою -18°C . Після повного замерзання зволоженої біомаси виймали кристалізатор з морозильної камери і проводили відтавання при кімнатній температурі. Таких циклів було проведено шість.

Екстракцію фікоеритрину проводили 460 мл водного буферного розчину з рН=7,5 протягом 24 годин на холоді в темноті. Водний екстракт пігменту очищали від баластних речовин за допомогою центрифуги ОС-6М при 2500 об/мін і чиннику розділення 1600g протягом 5 хв. До отриманого водного екстракту фікоеритрину додавали етиловий спирт до кінцевої концентрації 20%. Отримували водно-спиртовий розчин фікоеритрину з кінцевою концентрацією пігменту 0,4 мг/мл, і консерванту (етанолу) 20 % (термін зберігання на холоді в темноті -1-1,5 місяця).

Склад водно-спиртового розчину екстракту фікоеритрину з червоної мікроводорості *Porphyridium purpureum*:

Вода дистильована	560 мл
Спирт етиловий	140 мл
<u>Фікоеритрин</u>	<u>0,4 мг/мл</u>
Загальний об'єм	700 мл

Кінцевий продукт - розчин пігменту фікоеритрин рожевого кольору з оранжевою флуоресценцією.

Основна перевага Способу отримання фікоеритрину з мікроводоростей *Porphyridium purpureum* полягає в простоті і надійності. Спосіб не вимагає дорогого устаткування, значних витрат матеріальних і тимчасових ресурсів і при цьому дозволяє отримувати препарат, що містить фікоеритрин, придатний для харчових цілей.

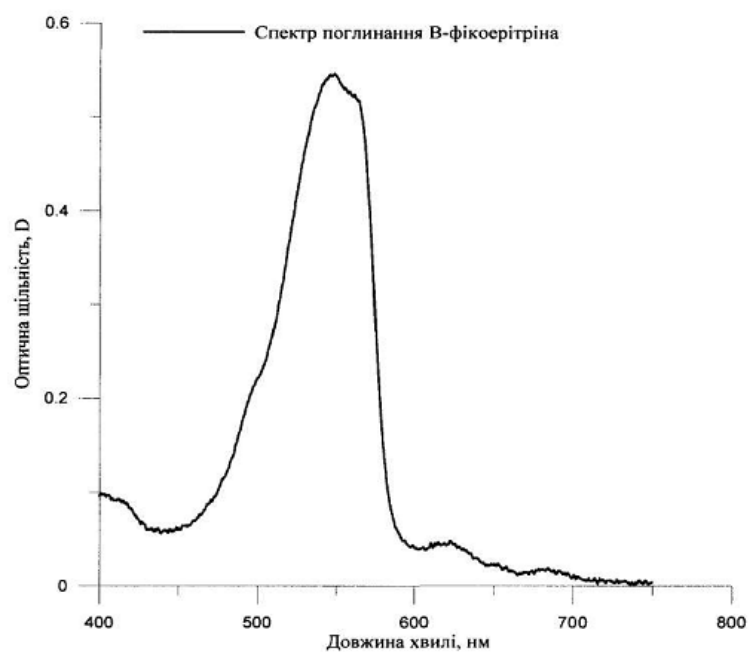


Fig. 1