



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/02 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023112610, 16.05.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.05.2023

Дата регистрации:
30.01.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.05.2023

(45) Опубликовано: 30.01.2024 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Токтарева Татьяна Михайловна

(72) Автор(ы):

Соляникова Инна Петровна (RU),
Ляховченко Никита Сергеевич (RU),
Сенченков Владислав Юрьевич (RU),
Чепурина Анна Андреевна (RU),
Никишин Илья Андреевич (RU),
Абашина Татьяна Николаевна (RU),
Поливцева Валентина Николаевна (RU),
Сузина Наталья Егоровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2580105 C2, 10.04.2016. СОН
ЕЛЬ ЧОЙ, и др., Виолацеин: свойства и
производство универсального бактериального
пигмента, Биомед Res Int. 2015. NELSON
DURÁN; et al, Violacein: properties and
biological activities, 2007, 48(3), 127-0. doi:10.1042/
ba20070115.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСТРАКТА ВИОЛАЦЕИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
JANTHINOBACTERIUM LIVIDIUM ВКМ В-3705D

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой способ получения экстракта виолацеина с использованием *Janthinobacterium lividium* ВКМ В-3705D, относится к микробиологии, в частности – к биотехнологии. Способ включает смешивание при комнатной температуре порошка *Janthinobacterium lividium* ВКМ В-3705D с изопропиловым спиртом с получением 1% коллоидного раствора и перемешиванием 150 об/мин в течение 3 часов. Затем полученную смесь пропускают под вакуумом через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм, процедуру фильтрации

повторяют до получения обесцвеченного осадка на фильтре и все порции фильтрата объединяют в одной емкости. Фильтрат, полученный на предыдущем этапе, упаривают с помощью роторного испарителя с уменьшением объема в два раза, очищают полученный экстракт от примесей путем растворения в дистиллированной воде в соотношении 1:10 с последующим отстаиванием до образования взвеси. Полученную взвесь фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм, после чего экстрагируют виолацеин из фильтра посредством 99%-ного диметилсульфоксида. При этом порошок

Janthinobacterium lividum ВКМ В-3705D получают путем выращивания чистой культуры *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D на агаризованной питательной среде содержащей 3% пептон, 2% агар и 95% воды, в течение 24 часа при 25°C. Полученную культуру суспендируют в стерильной воде. Получают 1%-ный инокулят путем внесения полученной суспензии *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D в жидкую питательную среду, содержащую 1% пептона и осуществляют инкубацию инокулята в течение 2 суток при температуре 25°C и постоянном

перемешивании со скоростью 150 об/мин. После чего инокулят переносят в емкость со свежей питательной средой содержащей 1% пептон и культивируют 3 суток с аэрацией при перемешивании 400 об/мин при 25°C с обеспечением поддержания содержания растворенного кислорода 80%. Затем полученную культуральную жидкость замораживают при минус 40°C после чего лиофильно высушивают. Предложенный способ расширяет ассортимент штаммов, пригодных к использованию в качестве продуцента виолацеина. 2 ил.

RU 2 8 1 2 4 6 1 C 1

RU 2 8 1 2 4 6 1 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 812 461** (13) **C1**(51) Int. Cl.
C12N 1/02 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(52) CPC
C12N 1/02 (2023.08)(21)(22) Application: **2023112610, 16.05.2023**(24) Effective date for property rights:
16.05.2023Registration date:
30.01.2024

Priority:

(22) Date of filing: **16.05.2023**(45) Date of publication: **30.01.2024** Bull. № 4

Mail address:

**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Toktareva Tatyana Mikhajlovna**

(72) Inventor(s):

**Solianikova Inna Petrovna (RU),
Liakhovchenko Nikita Sergeevich (RU),
Senchenkov Vladislav Iurevich (RU),
Chepurina Anna Andreevna (RU),
Nikishin Iliia Andreevich (RU),
Abashina Tatiana Nikolaevna (RU),
Polivtseva Valentina Nikolaevna (RU),
Suzina Natalia Egorovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD OF OBTAINING VIOLACEIN EXTRACT USING JANTHINOBACTERIUM LIVIDIUM VKM B-3705D**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention is a method of producing violacein extract using *Janthinobacterium lividium* "BKM" B-3705D, relates to microbiology, in particular to biotechnology. The method involves mixing *Janthinobacterium lividium* "BKM" B-3705D powder with isopropyl alcohol at room temperature to obtain a 1% colloidal solution and stirring at 150 rpm for 3 hours. Then the resulting mixture is passed under vacuum through a filter with a pore diameter of 0.1 mcm, the filtration procedure is repeated until a discolored precipitate is obtained on the filter, and all the portions of the filtrate are combined in one container. The filtrate obtained at the previous stage is evaporated using a rotary evaporator, reducing the volume by half, and the resulting extract is purified from impurities by dissolving in distilled water in a ratio of 1:10, followed by settling until a suspension is formed. The resulting suspension is filtered through a filter with a pore diameter of 0.1 mcm, after which violacein is extracted from the filter using 99% dimethyl

sulfoxide. *Janthinobacterium lividium* "BKM" B-3705D powder is obtained by growing a pure culture of *Janthinobacterium lividium* "BKM" B-3705D on an agar nutrient medium containing 3% of peptone, 2% of agar and 95% of water, for 24 hours at 25°C. The resulting culture is suspended in sterile water. A 1% inoculum is obtained by adding the resulting suspension of *Janthinobacterium lividium* "BKM" B-3705D into a liquid nutrient medium containing 1% peptone and incubating the inoculum for 2 days at a temperature of 25°C and constant stirring at a speed of 150 rpm. After which the inoculum is transferred to a container with fresh nutrient medium containing 1% peptone and cultivated for 3 days with aeration with stirring at 400 rpm at 25°C ensuring that the dissolved oxygen content is maintained at 80%. Then the resulting culture liquid is frozen at minus 40°C after which it is freeze-dried.

EFFECT: proposed method expands the range of strains suitable for use as a violacein producer.

1 cl, 2 dwg

RU 2 812 461 C1

RU 2 812 461 C1

Предполагаемое изобретение относится к микробиологии, в частности - к биотехнологии, а именно к получению экстракта пигмента виолацеина посредством использования как продуцента виолацеина штамма *Janthinobacterium lividium* ВКМ В-3705D.

5 Виолацеин - это природный бис-индольный пигмент, обладающий антибиотическими (антибактериальными, противовирусными, противогрибковыми и противоопухолевыми) свойствами [Сон Ель Чой, Кен Хе Юн, 2 Джин Иль Ли, , Роберт Дж. Митчелл, Виолацеин: свойства и производство универсального бактериального пигмента, Биомед Res Int. 2015; 2015] Виолацеин вырабатывается несколькими видами бактерий, включая
10 *Chromobacterium violaceum*, и придает этим организмам поразительные фиолетовые оттенки. Виолацеин находит все более интересное с коммерческой точки зрения применение, особенно для промышленного применения в косметике, лекарствах и тканях.

Виолацеин обладает умеренной микостатической активностью в отношении
15 плесневого гриба *Alternaria brassicicola* F-1864 и может быть использован для разработки средств защиты растений (Lyakhovchenko et al., 2021).

Согласно литературным данным, виолацеин обладает множеством биотехнологически важных свойств, а именно, противоопухолевой, противовирусной, антибактериальной, антимикозной, антипротозойной и противопаразитарной активностью (Durán et al.,
20 2007).

Имеются данные о цитотоксичности пигмента в отношении клеточных линий колоректального рака человека (виолацеин вызывал окислительный стресс, который является ключевым медиатором апоптоза), клеток рака толстой кишки (пигмент нарушал ход клеточного цикла). Согласно литературным данным, исследование с
25 использованием внутрибрюшной инокуляции виолацеина в течение 12 дней подряд показало, что время жизни мышей с опухолями значительно увеличивалась. В том же источнике описаны антибактериальные и антимикозные свойства: виолацеин проявлял антимикробную активность в отношении 21 штамма бактерий, среди которых менее восприимчивыми оказались пять граммотрицательных штаммов и один штамм *Bacillus subtilis*;
30 пигмент проявлял эффективность в отношении такого фитопатогенного гриба, как *Rosellina necatrix*, который является возбудителем белой корневой гнили шелковицы; антимикобактериальные свойства виолацеина в отношении *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (возбудителя туберкулеза) были сопоставимы с эффективностью химиотерапевтического противотуберкулезного средства. Кроме того, имеются сведения
35 о противомаларийной активности. Показана противовирусная активность в отношении вируса простого герпеса и полиовируса с использованием клеток HeLa (Bromberg et al., 2005).

Среди биоактивных свойств виолацеина - эффективность контроля клеточного цикла и увеличение продукции рекомбинантного иммуноглобулина G (IgG) в клетках яичника
40 китайского хомячка (СНО) которые используются в качестве клеток-хозяев для получения промышленных моноклональных антител (mAb). Контроль клеточного цикла - это эффективный подход к увеличению продукции mAb в культуре клеток. По сравнению с контролем 0,9 мкМ виолацеина в 14-дневной культуре с подпиткой увеличивало максимальную концентрацию IgG на 37,6% за счет увеличения удельной
45 скорости продукции и продолжительности жизни клеток. Анализ клеточного цикла показал, что виолацеин индуцировал остановку фазы G1 и G2 / M. Однако арест G1 наблюдался только в первый день, в то время как задержка G2 / M длилась более 3 дней, что позволяет предположить, что задержка G2 / M опосредует индуцированное

виолацеином усиленное производство IgG. Более того, в соответствии с повышенной экспрессией белка, уровни экспрессии мРНК IgG и скорость метаболизма питательных веществ также были увеличены. На профили N- связанного гликозилирования и вариантов заряда обработка виолацеином практически не влияла. Результаты исследования показывают, что виолацеин влияет на клеточный цикл клеток CHO и увеличивает выработку IgG без изменения качества продукта, показывая перспективу в качестве усилителя продукции mAb в клетках CHO. Исследование дает представление об использовании виолацеина в промышленном производстве mAb и может помочь в разработке передовых эффективных технологий производства mAb с использованием культур клеток CHO (Kido et al., 2020).

В работе Da-ae Gwon с соавторами, приводятся сведения о том, что при использовании поверхностно-активных соединений (твин 80 и тритон X-100) выход виолацеина составил 47,64 мг/л и 48,12 мг/л, или 0,047 г/л и 0,048 г/л, соответственно [Gwon, Da., Seo, E. & Lee, J.W. Construction of Synthetic Microbial Consortium for Violacein Production. *Biotechnol Bioproc E* (2023). <https://doi.org/10.1007/s12257-022-0284-5>]. Авторами был смоделирован консорциум штаммов, где в одной композиции находился продуцент L-триптофана и виолацеина. В результате удалось увеличить выход пигмента до 0,083 г/л. В свою очередь, согласно результатам культивирования, приведенным у Mendes A.S. с соавторами, было получено 0,43 г/л, тогда как сухой вес биомассы составил 21 г/л [Mendes, A.S., de Carvalho, J.E., Duarte, M.C. et al. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *Biotechnology Letters* 23, 1963-1969 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1013734315525>]. При этом, авторы использовали различные ростовые субстраты и их комбинации:

Имеются сведения о том, что получен продуцент виолацеина, путем внедрения плазмиды pHSX-vioABCDE в *Escherichia coli* K12DH5 α , который оказался способен к образованию пигмента концентрацией 0,017 г/л [Duran, M., Ponezi, A.N., Faljoni-Alario, A. et al. Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Med Chem Res* 21, 1524-1532 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9654-9>]. В работе N. Duran с соавторами приводится результат культивирования штамма *Pseudoalteromonas* sp. (DSM 13623), согласно которым был получен неочищенный экстракт пигмента в концентрации 1,1 г/л из 30 литрового биореактора [Nelson Durán; Giselle Z. Justo; Carmen V. Ferreira; Patrícia S. Melo; Livia Cordi; Dorival Martins (2007). *Violacein: properties and biological activities*, 48 (3), 127-0. doi:10.1042/ba20070115].

В патенте RU 2580105 (опубликован 10.12.2014) описан штамм- *Chromobacterium violaceum*, являющийся грамотрицательным сапрофитом, содержащимся в почве и воде. Обычно считается, что эта бактерия является непатогенной для человека, но так как она является условно-патогенным микроорганизмом, то может вызывать септицемию и фатальные инфекции у человека и животных. *Chromobacterium violaceum* - продуцент виолацеина, который по приведенным в патенте данным представляет собой высокоактивный инсектицид с оценочным значением LC50, составляющим 7 \times 10⁻⁶ микрограммов на лунку в *in vitro* исследовании введения с кормом личинкам совки.

Способ получения виолацеина по изобретению включает очистку соединений, экстрагированных из культуры *Chromobacterium substugae*, для чего: культуральный бульон, полученный в результате ферментации *C.substugae* в 10 л бульона, экстрагировали на смоле Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) путем встряхивания клеточной суспензии со смолой с частотой 225 раз/мин, в течение двух часов при комнатной температуре. Смолу и клеточную массу собирали путем фильтрования через марлю и промывали деионизованной водой для удаления солей. Смолу, клеточную

массу и марлю затем вымачивали в течение 2 часов в смеси ацетон/метанол (50/50), после чего смесь ацетон/метанол фильтровали и сушили в вакууме на роторном испарителе с получением неочищенного экстракта. Неочищенный экстракт затем фракционировали путем эксклюзионной хроматографии на Sephadex LH20 (CH₂Cl₂/CH₃OH; 50/50) с получением 7 фракций. Виолацеин и дезоксивиолацеин выделяли из фракции 5 путем хроматографии на Sephadex LH20. Активные фракции затем подвергали обращенно-фазовой ВЭЖХ (Spectra System P4000, Thermo Scientific) с получением чистых соединений, после чего проводили скрининг при помощи вышеуказанных биоисследований для определения/идентификации активных соединений. Для подтверждения структуры соединения получали дополнительные спектроскопические данные, такие как спектры ЖХ/МС и ЯМР.

Недостатком этого способа является условная патогенность штамма- *Chromobacterium violaceum*, а также низкая эффективность за счет продуцирования одновременно 7 различных фракций, из которых виолацеин можно выделить только из пятой фракции. Задачей изобретения является создание способа получения экстракта виолацеина путем его синтеза с использованием штамма микроорганизма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D.

Технический результат заключается в том, что предлагаемый способ расширяет ассортимент штаммов, пригодных к использованию в качестве продуцента виолацеина. Указанный штамм *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D ранее не описан. Он был выделен из прибрежной зоны реки Везёлки в городе Белгороде путем высева на питательную агаризованную среду состава: 3% пептон, 2% агар микробиологический, остальное вода, с последующим селективным пересевом изолированных пигментированных колоний в отдельные чашки Петри с той же питательной средой для получения чистой культуры штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D. Штамм хранится во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН, дата депонирования 07.04.2023 года.

Культуральные и морфологические свойства штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D.

На вторые сутки культивирования на питательной агаризованной среде состава: 3% пептон, 2% агар микробиологический, остальное вода, появляется слабая пигментация. На третьи сутки культивирования заметна сине-фиолетовая пигментация. При этом, колонии зернистые с фестончатым краем. На третьи сутки культивирования пигментация колоний становится интенсивнее, структура зернистая с неровным краем. В просвете стереомикроскопа видны накопления кристаллов вторичных метаболитов. На седьмой день пигментация культуры штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D ярко-выраженная сине-фиолетовая, колонии шероховатые, крупнозернистые, матовые, круглые с волнистым валиком по краю.

Штамм *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D растут в диапазоне температур 4-28°C с оптимумом при 20°C.

Janthinobacterium lividum ВКМ В-3705D способен расти в присутствии в среде NaCl в концентрации до 2%.

Штамм *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D представлен аэробными грамотрицательными подвижными палочками, располагающиеся одиночно, в парах или в коротких цепочках.

Физиолого-биохимические свойства штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D

Каталазоположительные клетки, образуют цитохромоксидазу, гидролизуют казеин. На питательной среде с 3% пептоном не образуют индол, но выделяют аммиак.

Сероводород не выделяется. Уреаза, липазу и лецитиназу не синтезирует, гидролизует казеин, но не крахмал. Штамм не способен разжижать желатин, но способен утилизировать цитраты. В ходе анализа не обнаружено активности β -галактозидазы, аргининдигидролазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы и

5 триптофандеаминазы. Не образуют ацетоин.

Штамм способен утилизировать широкий ряд субстратов, а именно, глицерин, L-арабинозу, D-рибозу, D-ксилозу, D-галактозу, D-глюкозу, D-фруктозу, D-маннозу, инозит, D-маннит, D-сорбит, N-глюкозамин, эскулин, D-мальтозу, D-сахарозу, ксилит, D-ликсозу, D-арабит и калия 2-кетоглюконат.

10 В свою очередь, не утилизирует эритритол, D-арабинозу, L-ксилозу, D-адонитол, метил- β D-ксилопиранозид, D-сорбозу, L-рамнозу, дульцитол, метил- α D-маннопиранозид, метил- α D-глюкопиранозид, амигдалин, арбутин, салицин, D-целлобиозу, D-лактозу (бычью), D-мелибиозу, D-трегалозу, инулин, D-мелецитозу, D-раффинозу, амидон, гликоген, гентиобиозу, D-туранозу, D-тагатозу, D-фукозу, L-фукозу,

15 L-арабит, калий глюконат и калий 5-кетоглюконат.

Молекулярно-генетическая идентификация штамма-продуцента.

Молекулярно-генетическая идентификация штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D по 16S рРНК показала, что он с 95%-ной достоверностью относится к виду *Janthinobacterium lividum*. Последовательность 16S рРНК выделенного штамма была

20 депонирована в GenBank *Janthinobacterium* sp. JF4 MW244020. [Lyakhovchenko, N.S.; Abashina, T.N.; Polivtseva, V.N.; Senchenkov, V.Y.; Pribylov, D.A.; Chepurina, A.A.; Nikishin, I.A.; Avakova, A.A.; Goyanov, M.A.; Gubina, E.D.; et al. A Blue-Purple Pigment-Producing Bacterium Isolated from the Vezelka River in the City of Belgorod. *Microorganisms* 2021, 9, 102. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010102>].

25 Способ характеризуют следующие графические материалы.

Фигура 1. Зависимость величины оптической плотности (OD) экстракта виолацеина в диметилсульфоксиде от длины волны света, полученной с использованием спектрофотометра Nabi NB1-D-210108, Micro Digital, Корея.

30 Фигура 2. Иллюстрация результатов оценки чистоты полученного экстракта методом тонкослойной хроматографии при излучении в ультрафиолетовой области спектра, полученного с использованием трансиллюминатора WUV-L50, DAIHAN Scientific Co., Ltd, Корея, где фиг.2а - очищенный экстракт, фиг. 2б - неочищенный экстракт.

Поставленную задачу решает предложенный способ получения экстракта виолацеина, включающий смешивание при комнатной температуре порошка *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D с изопропиловым спиртом с получением 1% коллоидного раствора и

35 перемешиванием 150 об/мин в течение 3 часов, затем полученную смесь пропускают под вакуумом через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм, процедуру фильтрации повторяют до получения обесцвеченного осадка на фильтре и все порции фильтрата объединяют в одной емкости; фильтрат, полученный на предыдущем этапе упаривают с помощью роторного испарителя с уменьшением объема в два раза, полученный экстракт очищают

40 от примесей путем растворения в дистиллированной воде в соотношении 1:10 с последующим отстаиванием до образования взвеси, и фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм, после чего экстрагируют виолацеин из фильтра посредством 99%-ного диметилсульфоксида, при этом порошок *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D получают путем выращивания чистой культуры *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D на агаризованной питательной среде содержащей 3% пептон, 2% агар и 95% воды, в течении 24 часа при 25°C; полученную культуру суспендируют в стерильной воде; получают 1%-ный инокулят путем внесения полученной суспензии *Janthinobacterium*

lividum ВКМ В-3705D в жидкую питательную среду, содержащую 1% пептона; осуществляют инкубацию инокулята в течение 2 суток при температуре 25°C и постоянном перемешивании со скоростью 150 об/мин, после чего его переносят в емкость со свежей питательной средой содержащей 1% пептон и культивируют 3 суток с аэрацией при перемешивании 400 об/мин при 25°C с обеспечением поддержания содержания растворенного кислорода 80%; затем полученную культуральную жидкость замораживают при минус 40°C после чего лиофильно высушивают.

Примеры осуществления заявленного способа

Пример 1. Получение биомассы *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D в виде порошка.

1. Чистую культуру штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D выращивают на агаризованной питательной среде, содержащей 3% пептон, 2% агар и 95% воды в чашке Петри в течении 24 часа при 25°C;

2. Собирают полученную культуру микробиологической петлёй и получают суспензию *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D путем смешения культуры с 4 мл стерильной воды;

3. Подготавливают инокулят внесением 1 мл суспензии *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D в 100 мл жидкой питательной среды, содержащей 1% пептона;

4. Осуществляют инкубацию в течение 2 суток при температуре 25°C и постоянном перемешивании со скоростью 150 об/мин;

5. Полученный инокулят переносят в емкость с 900 мл свежей питательной среды, содержащей 1% пептона, и культивируют 3 суток с аэрацией при перемешивании 400 об/мин при 25°C с обеспечением поддержания содержания растворенного кислорода 80%;

6. Полученную культуральную жидкость замораживают при минус 40°C и затем лиофильно высушивают в течение 17 часов, получая *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D в виде порошка;

Пример 2. Получение экстракта виолацеина.

1. Порошок *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D полученный по примеру 1 в количестве 1 г смешивают со 100 мл изопропилового спирта, перемешивают в течение 3 часов со скоростью 150 об/мин и пропускают под вакуумом через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм, полученный осадок вновь смешивают со 100 мл изопропилового спирта, перемешивают в течение 3 часов со скоростью 150 об/мин и пропускают под вакуумом через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм. При этом, в случае необходимости процедуру повторяют до получения обесцвеченного осадка. Так как на фильтре был получен обесцвеченный осадок за две процедуры, далее ее не повторяют, а все порции фильтрата в количестве 200 мл объединяют в одной емкости;

2. Фильтрат, полученный на предыдущем этапе упаривают с помощью роторного испарителя до объема 100 мл и проводят процедуру очистки от примесей, для чего полученный экстракт растворяют в дистиллированной воде в соотношении 1:10 и отстаивают до образования взвеси;

3. Полученный водный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм и для исключения потерь готового продукта экстрагируют полученный виолацеин из фильтра посредством 99%-ного диметилсульфоксида в количестве 100 мл.

В результате получают экстракт пигмента-виолацеина в диметилсульфоксиде, при этом при пересчете концентрации с использованием закона Бугера-Ламберта-Бера получается концентрация пигмента-виолацеина в диметилсульфоксиде 28,4 г/л.

Экстракт спектрофотометрировали с использованием спектрофотометра Nabi NB1-

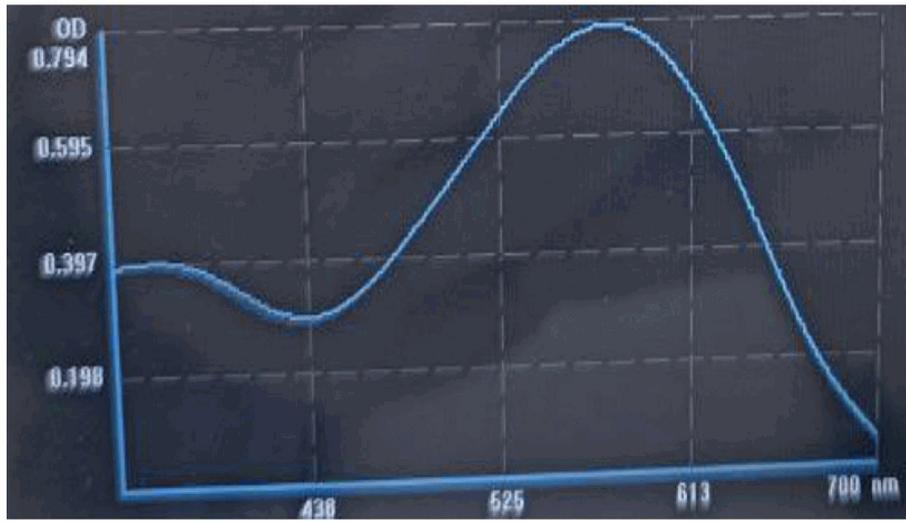
D-210108, Micro Digital, (Корея) в диапазоне длин волн $\lambda = 350-700$ нм. Выявлен максимум поглощения раствора пигмента в диметилсульфоксиде при длине волны $\lambda = 575$ нм, что соответствует данным из источника [Durán, N., Justo, G.Z., Ferreira, C.V., Melo, P.S., Cordi, L. and Martins, D. (2007), Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 48: 127-133. doi:10.1042/BA20070115].

Чистоту полученного экстракта оценивали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах (Sorbfil (100×100 мм), Краснодар (Россия) с использованием трансиллюминатора WUV-L50, DAIHAN Scientific Co., Ltd, (Корея). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетона с этилацетатом в соотношении 1:1. По результатам анализа установлено, что содержание примесей на линии старта могут быть остатком диметилсульфоксида (фиг.2а). Для сравнения на фиг. 2б представлено изображение неочищенного от примесей экстракта .

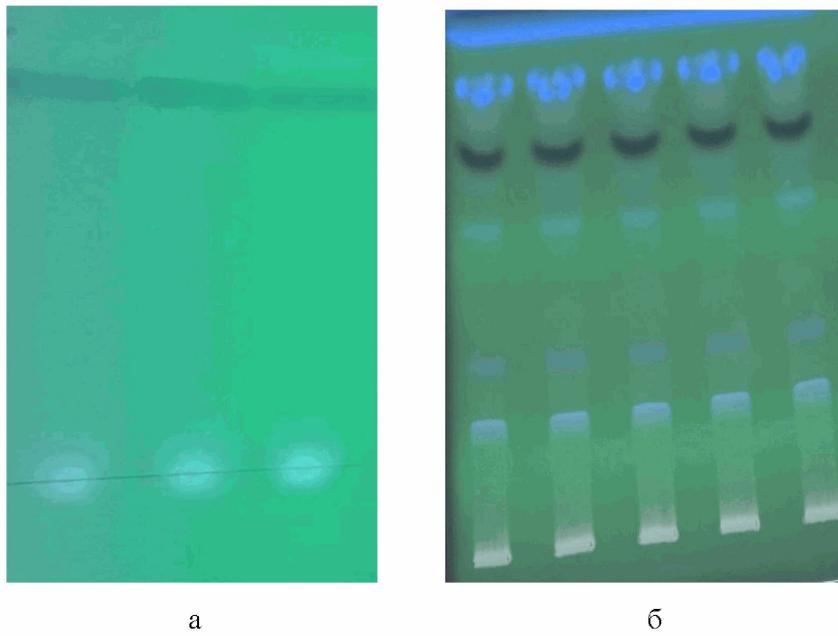
Таким образом, поставленная задача по созданию способа получения экстракта виолацеина путем его синтеза с использованием штамма микроорганизма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D решена.

(57) Формула изобретения

Способ получения экстракта виолацеина, включающий смешивание при комнатной температуре порошка *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D с изопропиловым спиртом с получением 1% коллоидного раствора и перемешиванием 150 об/мин в течение 3 часов, затем полученную смесь пропускают под вакуумом через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм, процедуру фильтрации повторяют до получения обесцвеченного осадка на фильтре и все порции фильтрата объединяют в одной емкости; фильтрат, полученный на предыдущем этапе упаривают с помощью роторного испарителя с уменьшением объема в два раза, полученный экстракт очищают от примесей путем растворения в дистиллированной воде в соотношении 1:10 с последующим отстаиванием до образования взвеси, и фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм, после чего экстрагируют виолацеин из фильтра посредством 99%-ного диметилсульфоксида, при этом порошок *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D получают путем выращивания чистой культуры *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D на агаризованной питательной среде содержащей 3% пептон, 2% агар и 95% воды, в течении 24 часа при 25°C; полученную культуру суспендируют в стерильной воде; получают 1%-ный инокулят путем внесения полученной суспензии *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D в жидкую питательную среду, содержащую 1% пептона; осуществляют инкубацию инокулята в течение 2 суток при температуре 25°C и постоянном перемешивании со скоростью 150 об/мин, после чего его переносят в емкость со свежей питательной средой содержащей 1% пептон и культивируют 3 суток с аэрацией при перемешивании 400 об/мин при 25°C с обеспечением поддержания содержания растворенного кислорода 80%; затем полученную культуральную жидкость замораживают при минус 40°C после чего лиофильно высушивают.



Фиг.1



Фиг.2