



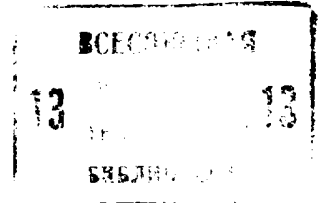
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1373728 A1

(5D) 4 C 12 N 1/12, A 01 H 13/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



(21) 3917690/30-13

(22) 27.06.86

(46) 15.02.88. Бюл. № 6

(71) Научно-производственное объединение по продуктам питания из картофеля и Институт фотобиологии АН БССР

(72) Т.П. Грищенко, И.Я. Овруцкая, Н.Д. Семенович, С.С. Мельников, Е.Е. Мананкина и Е.А. Будакова

(53) 576.8.093(088.8)

(56) Ляхнович Я.П., Колешко О.И. К вопросу использования соковых вод в смешанных культурах бактерий и хлореллы. - Физиолого-биологические исследования растений. Минск, Наука и техника, 1967, с. 21-26.

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ХЛОРЕЛЛЫ

(57) Изобретение относится к области промышленной микробиологии. Целью изобретения является повышение прироста биомассы хлореллы при одновре-

менном снижении энергозатрат на ее культивирование и удешевление биомассы. Способ состоит в том, что хлореллу выращивают на питательной среде, содержащей минеральные соли и жидкие отходы, образующиеся при варке и бланшировке картофеля на картофелеперерабатывающих предприятиях, с содержанием сухих веществ 1-1,5%, при следующем соотношении компонентов, г/л: азотно-кислый калий 0,2-0,5, однозамещенный фосфорно-кислый калий 0,06-0,12, фильтрат жидких отходов, образующихся при варке и бланшировке картофеля, остальное, а культивирование ведут при освещенности 4 - 5 тыс.лк. Способ позволяет получить суспензию хлореллы с плотностью 193,75 млн. клеток/мл (сухая биомасса 4,52 г/л) при освещенности 4 - 5 тыс.лк. 3 табл.

(19) SU (11) 1373728 A1

Изобретение относится к промышленной микробиологии и может быть применено для культивирования фотоавтотрофных водорослей, например хлореллы.

Цель изобретения - увеличение выхода и удешевление процесса.

Поставленная цель достигается тем, что питательная схема для культивирования хлореллы, содержащая азотно-кислый калий, однозамещенный фосфорно-кислый калий и картофельное сырье, в качестве картофельного сырья содержит фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля, при следующем соотношении компонентов, г/л:

Азотно-кислый калий 0,2-0,5

Однозамещенный фосфорно-кислый калий 0,06-0,12

Фильтрат жидких отходов, образуемых при

варке и бланшировке

картофеля

Остальное до 1 л

При этом фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля, содержит 1-1,5% сухих веществ.

Фильтрат указанных жидких отходов имеет следующий физико-химический состав: углеводы растворимые 0,016-0,024, крахмал 0,69-1,035, минеральные вещества 0,027-0,041, азотистые вещества 0,016-0,024, белок 0,18-0,27, клетчатка 0,033-0,006, жиры 0,004-0,006, прочие 0,016-0,024.

Культивирование осуществляют при освещенности 4-5 тыс. лк.

Предлагаемую питательную среду готовят следующим образом.

Для приготовления фильтрата жидкие отходы, образуемые при варке и бланшировке картофеля, направляют в емкости, отстаивают в течение 20-30 мин, после чего надосадочную жидкость отфильтровывают с получением фильтрата с концентрацией сухих веществ 1-1,5%.

В 100 мл полученного фильтрата вносят 0,2-0,5 г азотно-кислого калия и 0,06-0,12 г однозамещенного фосфорно-кислого калия и тщательно перемешивают, после чего доливают указанный фильтрат до общего объема 1 л и подвергают дробной стерилизации 3 раза через сутки при 0,2 атм в течение 30 мин.

Приготовленную таким образом питательную среду переливают в сосуды и засевают маточной культурой *Chlorella vulgaris* в таком количестве, чтобы исходная концентрация составляла $10 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии. Культивирование микроводоросли ведут при 22-24°C, освещенности 4-5 тыс. лк и чередовании светового и темного периодов 12:12 ч. В течение светового периода культуру перемешивают. Выход биомассы хлореллы составляет 4,22-4,52 г/л сухой биомассы или 186,0-193,7 млн. клеток/мл суспензии.

Пример 1. Для приготовления фильтрата жидкие отходы, образуемые при варке и бланшировке картофеля, направляют в емкости, отстаивают в течение 30 мин, после чего надосадочную жидкость сливают и пропускают через фильтр с получением фильтрата с концентрацией сухих веществ 1%.

В 100 мл полученного фильтрата жидких отходов вносят 0,5 г азотно-кислого калия и 0,06 г однозамещенного фосфорно-кислого калия и тщательно перемешивают, после чего доливают указанный фильтрат до общего объема 1 л и подвергают дробной стерилизации 3 раза через сутки при 0,2 атм в течение 30 мин.

Приготовленную таким образом питательную среду переливают в сосуды и засевают маточной культурой *Chlorella vulgaris* в таком количестве, чтобы исходная концентрация составляла $10 \cdot 10^6$ кл/мл суспензии. Культивирование микроводоросли ведут при 22°C, освещенности 4 тыс. лк и чередовании светового и темного периодов 12:12 ч. В течение светового периода культуру перемешивают воздухом. Выход биомассы составляет 4,22 г/л при 186,0 $\times 10^6$ клеток/мл суспензии.

Пример 2. Для приготовления фильтрата жидкие отходы, образуемые при варке и бланшировке картофеля, направляют в емкости, отстаивают в течение 25 мин, после чего надосадочную жидкость сливают и пропускают через фильтр с получением фильтрата с концентрацией сухих веществ 1,3%.

В 100 мл полученного фильтрата жидких отходов вносят 0,2 г азотно-кислого калия и 0,12 г однозамещенного фосфорно-кислого калия и тщательно перемешивают, после чего указанный фильтрат доливают до общего объема

1 л и подвергают дробной стерилизации 3 раза через сутки при 0,2 атм в течение 30 мин.

Приготовленную таким образом питательную среду переливают в сосуды и засевают маточной культурой *Chlorella vulgaris* в таком количестве, чтобы исходная концентрация составляла $10 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии. Культивирование микроводоросли ведут при 23°C, освещенности 4,5 тыс.лк и чередовании светового и темного периодов 12:12 ч. В течение светового периода культуру перемешивают. Выход биомассы составляет 4,39 г/л или $188,25 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии.

Пример 3. Для приготовления фильтрата жидкие отходы, образуемые при варке и бланшировке картофеля, направляют в емкости, отстаивают в течение 20 мин, после чего надосадочную жидкость сливают и пропускают через фильтр с получением фильтрата с концентрацией сухих веществ 1,5%.

В 100 мл полученного фильтрата жидких отходов вносят 0,3 г азотно-кислого калия и 0,08 г однозамещенного фосфорно-кислого калия и тщательно перемешивают, после чего доливают указанный фильтрат до общего объема 1 л и подвергают дробной стерилизации 3 раза через сутки при 0,2 атм в течение 30 мин.

Приготовленную таким образом питательную среду переливают в сосуды и засевают маточной культурой *Chlorella vulgaris* в таком количестве, чтобы исходная концентрация составляла $10 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии. Культивирование микроводоросли ведут при температуре 24°C, освещенности 5 тыс. лк. и чередовании светового и темного периодов 12:12 ч. В течение светового периода культуру перемешивают. Выход биомассы составляет 4,52 г/л или $193,75 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии.

Пример 4. В 100 мл полученного 1,5%-ного фильтрата жидких отходов вносят 0,1 г азотно-кислого калия и 0,12 г однозамещенного фосфорно-кислого калия и тщательно перемешивают, после чего доливают указанный фильтрат до общего объема 1 л и подвергают дробной стерилизации 3 раза через сутки при 0,2 атм в течение 30 мин.

Приготовленную таким образом питательную среду переливают в сосуды и засевают маточной культурой *Chlorella vulgaris* в таком количестве, чтобы исходная концентрация составляла $10 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии. Культивирование микроводоросли ведут по примеру 3. Выход биомассы составляет 3,97 г/л или $170,25 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии.

Пример 5. В 100 мл полученного 1,3%-ного фильтрата жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля, вносят 0,6 г азотно-кислого калия и 0,1 г однозамещенного фосфорно-кислого калия и тщательно перемешивают, после чего доливают указанный фильтрат до общего объема 1 л и подвергают дробной стерилизации 3 раза через сутки при 0,2 атм в течение 30 мин.

Приготовленную таким образом питательную среду переливают в сосуды и засевают маточной культурой *Chlorella vulgaris* в таком количестве, чтобы исходная концентрация составляла $10 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии. Культивирование микроводоросли ведут по примеру 3. Выход биомассы составляет 4,48 г/л или $192 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии.

Пример 6. В 100 мл 1,3%-ного фильтрата жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля, вносят 0,5 г азотно-кислого калия и 0,05 г однозамещенного фосфорно-кислого калия, тщательно перемешивают, после чего доливают указанный фильтрат до общего объема 1 л и подвергают дробной стерилизации 3 раза через сутки при 0,2 атм в течение 30 мин.

Засев маточной культуры *Chlorella vulgaris* на приготовленную питательную среду и культивирование микроводоросли осуществляют по примеру 2. Выход биомассы составляет 4,01 г/л или $172,0 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии.

Пример 7. В 100 мл 1,5%-ного фильтрата жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля, вносят 0,5 г азотно-кислого калия и 0,13 г однозамещенного фосфорно-кислого калия, тщательно перемешивают, после чего доливают указанный фильтрат до общего объема 1 л и подвергают дробной стерилизации 3 ра-

за через сутки при 0,2 атм в течение 30 мин.

Засев маточной культуры *Chlorella vulgaris* на приготовленную питательную среду и культивирование микродоросли осуществляют по примеру 3. Выход биомассы составляет 4,46 г/л или $191,25 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии.

Пример 8. В 100 мл 0,09%-ного фильтрата жидких отходов, образующихся при варке и бланшировке картофеля, вносят 0,5 г азотно-кислого калия и 0,12 г однозамещенного фосфорно-кислого калия, тщательно перемешивают, после чего доливают указанный фильтрат до общего объема 1 л и подвергают дробной стерилизации 3 раза через сутки при 0,2 атм в течение 30 мин.

Засев маточной культуры *Chlorella vulgaris* на приготовленную питательную среду и культивирование микродоросли осуществляют по примеру 1. Выход биомассы составляет 3,76 г/л или $161,12 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии.

Пример 9. В 100 мл 1,6%-ного фильтрата жидких отходов образующихся при варке и бланшировке картофеля, вносят 0,5 г азотно-кислого калия и 0,12 г однозамещенного фосфорно-кислого калия, тщательно перемешивают, после чего доливают указанный фильтрат до общего объема 1 л и подвергают дробной стерилизации 3 раза через сутки при 0,2 атм в течение 30 мин.

Засев маточной культуры *Chlorella vulgaris* на приготовленную питательную среду и культивирование микродоросли осуществляют по примеру 3. Выход биомассы составляет 4,08 г/л или $175,0 \cdot 10^6$ клеток/мл суспензии.

Фильтрат жидких отходов, образующихся при варке и бланшировке картофеля, представляет собой светлую полупрозрачную жидкость - суспензию, содержащую ряд ценных питательных веществ - источников углерода и азота, в том числе крахмал, белок, сахара, незаменимые аминокислоты, а также микроэлементы и биологически активные вещества. При этом осуществление процессов бланшировки и варки приводит к термическому гидролизу содержащихся в фильтрате органических веществ, что, как показали исследования, обуславливает их лучшую усвояемость хлореллой и тем самым способ-

ствует ее лучшему развитию и большему накоплению биомассы и хлорофилла.

Исследования показали, что фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля предлагаемой концентрации в сочетании с азотно-кислым и однозамещенных фосфорно-кислым калием, взятыми в предлагаемых количествах, является оптимально сбалансированным питательным субстратом для культивирования хлореллы.

Граничные значения каждого компонента, вводимого в предлагаемую питательную среду, определяли эмпирически путем подбора компонентов и испытания вариантов среды.

Данные по продуктивности культуры хлореллы, в том числе накоплению клеток и сухой биомассы на предлагаемой питательной среде в соответствии с примерами 1-9 (т.е. при заявляемых и запредельных количествах вносимых компонентов), а также на известной среде и среде Тамия, приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1 (примеры 1-3), предлагаемые пределы содержания компонентов являются оптимальными и обуславливают сбалансированность среды по питательному составу, что способствует активному накоплению биомассы хлореллы. Продуктивность хлореллы при ее культивировании на предлагаемой питательной среде увеличивается на 29-33% по сравнению с известной средой в 1,7-1,8 раза по сравнению со средой Тамия.

Введение в питательную среду азотно-кислого калия в количестве менее 0,2 г/л нежелательно, так как приводит к недостаточности азотного питания, что вызывает снижение продуктивности хлореллы (пример 4), а его введение в количестве более 0,5 г/л нецелесообразно, так как не приводит к улучшению достигаемого эффекта (пример 5).

Введение в питательную среду однозамещенного фосфорно-кислого калия в количестве менее 0,06 г/л приводит к нарушению сбалансированности среды по фосфору, что также вызывает снижение продуктивности хлореллы (пример 6), а его введение в количестве более 0,12 г/л нецелесообразно, так как приводит к излишнему расходу компонен-

та без повышения прироста биомассы хлореллы (пример 7).

Исследования показали, что при использовании фильтрата жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля, с концентрацией сухих веществ менее 1% не обеспечивается потребность хлореллы в углеродном и азотном питании, вследствие чего снижается ее продуктивность (пример 8), а использование фильтрата с концентрацией выше 1,5% нецелесообразно, так как приводит к снижению фотосинтетической активности хлореллы вследствие уменьшения светопроницаемости фильтрата.

Светлый цвет и полупрозрачность предлагаемой питательной среды по сравнению с известной средой в сочетании с более богатым и лучше усвояемым органическим составом обеспечивают повышение прироста биомассы и хлорофилла в условиях пониженной освещенности.

Данные, отражающие потребность в освещенности при культивировании хлореллы на предлагаемой питательной среде по сравнению с известной средой приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, обеспечение нормальной фотосинтетической активности хлореллы при культивировании ее на предлагаемой питательной среде достигается при освещенности в 2-4 раза меньшей по сравнению с известной средой, что обуславливает снижение энергозатрат соответственно на 226,5-453 кВт·ч электроэнергии на 1 т суспензии хлореллы.

Сравнительные данные по приросту клеток хлореллы и накоплению в них

хлорофилла на различных питательных средах представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, использование предлагаемой питательной среды стимулирует работу фотосинтетического аппарата водоросли вследствие большего накопления хлорофилла по сравнению с известной средой и средой Тамия, что в свою очередь обеспечивает больший прирост биомассы как сухой, так и по количеству клеток.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет повысить прирост биомассы хлореллы при одновременном снижении энергозатрат на ее культивирование и снизить затраты на производство биомассы, что обуславливает технико-экономическую эффективность.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ культивирования хлореллы, включающий культивирование ее на питательной среде, содержащей азотно-кислый калий, однозамещенный фосфорно-кислый калий и картофельное сырье при освещении в оптимальных условиях до максимального накопления биомассы, отличающийся тем, что, с целью увеличения выхода и удешевления процесса, в качестве картофельного сырья используют фильтрат жидких отходов, образующихся при варке и бланшировке картофеля, с концентрацией сухих веществ 1-1,5% при следующем соотношении компонентов, г/л:

Азотно-кислый калий	0,2-0,5
Однозамещенный фосфорно-кислый калий	0,06-0,12
Указанный фильтрат жидких отходов	Остальное
а культивирование осуществляют при освещенности 4-5 тыс.лк.	

Т а б л и ц а 1

Сос- тав	Питательная среда, г		Прирост биомассы хлореллы	
			Количество млн/клеток/мл суспензии	Сухая биомасса, г/л
1	Азотно-кислый калий	0,5	186,0	4,22
	Однозамещенный фосфорно- кислый калий	0,06		
	Фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля с концентрацией сухих ве- ществ 1%	Остальное до 1 л		
2	Азотно-кислый калий	0,2	188,25	4,39
	Однозамещенный фосфор- но-кислый калий	0,12		
	Фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля с концентрацией сухих ве- ществ 1,3%	Остальное до 1 л		
3	Азотно-кислый калий	0,3	193,75	4,52
	Однозамещенный фосфорно- кислый калий	0,08		
	Фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля с концентрацией сухих ве- ществ 1,5%	Остальное до 1 л		
4	Азотно-кислый калий	0,1	170,25	3,97
	Однозамещенный фосфорно- кислый калий	0,12		
	Фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля с концентрацией сухих ве- ществ 1,5%	Остальное до 1 л		
5	Азотно-кислый калий	0,6	192,0	4,48
	Однозамещенный фосфорно- кислый калий	0,1		
	Фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля с концентрацией сухих ве- ществ 1,5%	Остальное до 1 л		

Состав	Питательная среда, г		Прирост биомассы хлореллы	
			Количество млн/клеток/мл суспензии	Сухая биомасса, г/л
6	Азотно-кислый калий	0,5	172,0	4,01
	Однозамещенный фосфорно-кислый калий	0,05		
	Фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля с концентрацией сухих веществ 1,3%	Остальное до 1 л		
7	Азотно-кислый калий	0,5	191,25	4,46
	Однозамещенный фосфорно-кислый калий	0,13		
	Фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля с концентрацией сухих веществ 1,5%	Остальное до 1 л		
8	Азотно-кислый калий	0,5	161,12	3,76
	Однозамещенный фосфорно-кислый калий	0,12		
	Фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля с концентрацией сухих веществ 0,9%	Остальное до 1 л		
9	Азотно-кислый калий	0,5	175,0	4,08
	Однозамещенный фосфорно-кислый калий	0,12		
	Фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля с концентрацией сухих веществ 1,6%	Остальное до 1 л		
10	Известная среда			
	Среда Тамия	10%	145,0	3,35
	Соковые воды крахмального производства (бросовый картофельный сок)	Остальное		
11	Среда Тамия	100%	80,5	2,5

Т а б л и ц а 2

Сос- тав	Питательная среда, г	Освещенность, в тыс. лк	Прирост биомас- сы в млн.кл/мл
1	Известная		
	Среда Тамия 10%	16	145
	Соковые воды крахмального производства (бросовый кар- тофельный сок) Остальное		
2	То же	8	140
3	—	4	Роста не наблю- далось
4	Предлагаемая		
	Азотно-кислый калий 0,3		
	Однозамещенный фосфорно- кислый калий 0,08		
	Фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля с концентрацией сухих ве- ществ 1% Остальное до 1 л	4	186,0

Т а б л и ц а 3

Сос- тав	Питательная среда, г	Освещен- ность тыс. лк	Количес- тво млн кле- ток/мл сус- пензии	Хлорофилл (а+в), мг/л сuspензии
1	Среда Тамия 100%	8	90,5	88,15
2	Известная			
	Среда Тамия 10%		145,0	20,09
	Соковые воды крах- мального производства Остальное			
3	Предлагаемая			
	Азотно-кислый калий 0,3			
	Однозамещенный фосфорно- кислый калий 0,08		193,75	108,9
	Фильтрат жидких отходов, образуемых при варке и бланшировке картофеля с концентрацией сухих веществ 1,5% Остальное до 1 л			