



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1740413 A1

(51)5 C 12 N 1 / 12

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4822056/13

(22) 08.05.90

(46) 15.06.92. Бюл. № 22

(71) Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева (SU) и Институт физиологии растений им. М.Попова Болгарской АН (BG)

(72) Н.А.Пронина, В.Е.Семененко (SU) и С.Т.Фурнаджиева (BG)

(53) 636.085:639.64(088.8)

(56) Аврамова С.Т., Пронина Н.А., Семененко В.Е., Георгиев Д. И., Пешева И.С. Хидробиология. - БАН, 1984, т. 20, с. 8-16.

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для интенсивного культивирования микроводорослей на средах, содержащих бикарбонатный ион в качестве источника биогенного питания.

Известен способ культивирования микроводорослей на бикарбонатсодержащей среде, включающий культивирование на питательной среде, содержащей компоненты биогенного питания и микроэлементы с корректированием pH за счет барботирования CO₂ до интервала определенных значений.

Недостатком этого способа является невысокая скорость прироста биомассы, связанная с условиями осуществления способа, не позволяющими микроводорослям проявить высокую фотосинтетическую активность.

Целью изобретения является повышение продуктивности процесса культивирования микроводорослей.

2

(57) Использование: промышленный фотосинтез при получении биомассы зеленых микроводорослей. Сущность способа: зеленые микроводоросли выращивают на питательной среде, содержащей минеральные соли, в том числе бикарбонаты, при pH среды не ниже 8,05 в присутствии ингибитора карбоангидразы. В качестве ингибитора карбоангидразы используют хлористый натрий, хлористый калий или их смесь в концентрации 0,2-0,6%, диакарб, ацетазоламид, этоксилазид в концентрации 0,7-1,2 мМ. При этом продуктивность зеленых микроводорослей (хлорелла, сценедесмус) повышается более чем в 2-3 раза против контроля (без ингибитора карбоангидразы). 1 з.п. ф-лы, 4 табл.

Поставленная цель достигается тем, что согласно способу культивирования зеленых микроводорослей на питательной среде в присутствии бикарбоната при pH не ниже 8,5 питательная среда дополнительно содержит ингибитор карбоангидразы.

В качестве ингибитора карбоангидразы используют соляную кислоту, хлористый натрий или хлористый калий, а также их смесь в концентрации 0,2-0,6%, диакарб, ацетазоламид, этоксилазид в концентрации 0,7-1,2 мМ.

Пример 1. Культуру микроводорослей *Chlorella vulgaris* C-3 или *Chlorella spk* засевают на питательную среду следующего состава, г/л воды: KNO₃ 2,5; mgSO₄·7H₂O 1,25; KH₂PO₄ 0,62; FeSO₄·7H₂O 0,09; EDTA 0,037; раствор микроэлементов 1 мл и бикарбонат натрия в количестве 3-5 г на 1 л воды, pH 9 (среда 1). Водоросли культивируют в течение 4-5 дней при непрерывном освещении

(19) SU (11) 1740413 A1

люминесцентными лампами (50 Вт/м²), температуре 36°C, непрерывном барботаже атмосферным воздухом, pH среды поддерживают 9,0-0,5 путем титрования HCl.

Продуктивность измеряют по сухой массе микроводорослей.

В качестве контроля используют процесс фотоавтотрофного культивирования микроводорослей на питательной среде того же состава в тех же самых условиях при коррективке pH с помощью периодического продувания чистой CO₂.

Пример 2. Культуру микроводорослей *Chlorella vulgaris* C-3 или *Chlorella spk* засевают на питательную среду следующего состава, г/л воды: KNO₃ 5,0; MgSO₄·7H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,24; FeSO₄·7H₂O 0,018; EDTA 0,037; раствор микроэлементов 1 мл и бикарбонат натрия в количестве 3-5 г на 1 л воды (среда 2). Водоросли культивируют в течение 4-5 дней при непрерывном освещении люминесцентными лампами (50 Вт/м²), температуре 36°C, непрерывном барботаже атмосферным воздухом, pH среды поддерживают 9,0-0,5 путем титрования HCl.

Продуктивность измеряют по сухой массе микроводорослей.

В качестве контроля используют процесс фотоавтотрофного культивирования микроводорослей на питательной среде того же состава в тех же самых условиях при коррективке pH с помощью периодического продувания чистой CO₂.

Результаты, представленные в табл.1, показывают, что достигаемый эффект не связан с изменением концентраций биогенных элементов.

Пример 3. Культуру микроводорослей *Chlorella vulgaris* C-3 или *Chlorella spk* засевают на питательную среду следующего состава, г/л воды: KNO₃ 2,5; MgSO₄·7H₂O 1,25; KH₂PO₄ 0,62; FeSO₄·7H₂O 0,09; EDTA 0,037; раствор микроэлементов 1 мл и бикарбонат натрия в количестве 3-5 г на 1 л воды (среда 1). Водоросли культивируют в течение 4-5 дней при непрерывном освещении люминесцентными лампами (50 Вт/м²), температуре 36°C, непрерывном барботаже атмосферным воздухом, pH среды поддерживают 9,0±0,5 путем титрования HCl. Среда дополнительно содержит ацетазоламид в концентрации 0,7 или 1,0, или 1,2 mM. Корректировка pH проводится периодически путем продувания суспензии углекислым газом как в опыте, так и в контроле. Продуктивность измеряют по сухой массе микроводорослей.

В качестве контроля используют процесс фотоавтотрофного культивирования микроводорослей на питательной среде того же состава в тех же самых условиях при

корректировке pH с помощью периодического продувания чистой CO₂.

Пример 4. Культуру микроводорослей *Chlorella vulgaris* C-3 или *Chlorella spk* засевают на питательную среду следующего состава, г/л воды: KNO₃ 2,5; MgSO₄·7H₂O 1,25; KH₂PO₄ 0,62; FeSO₄·7H₂O 0,09; EDTA 0,037; раствор микроэлементов 1 мл и бикарбонат натрия в количестве 3-5 г на 1 л воды (среда 1). Водоросли культивируют в течение 4-5 дней при непрерывном освещении люминесцентными лампами (50 Вт/м²), температуре 36°C, непрерывном барботаже атмосферным воздухом, pH среды поддерживают 9,0±0,5 путем титрования HCl. Среда дополнительно содержит диакарб в концентрации 0,7 или 1,0, или 1,2 mM. Продуктивность измеряют по сухой массе микроводорослей.

В качестве контроля используют процесс фотоавтотрофного культивирования микроводорослей на питательной среде того же состава в тех же самых условиях при коррективке pH с помощью периодического продувания чистой CO₂.

Результаты по примерам 1-4 представлены в табл.1.

Пример 5. Культуру микроводорослей *Chlorella vulgaris* C-3 или *Chlorella spk* засевают на питательную среду следующего состава, г/л воды: KNO₃ 5,0; MgSO₄·7H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,24; FeSO₄·7H₂O 0,018; EDTA 0,037; раствор микроэлементов 1 мл и бикарбонат натрия в количестве 3-5 г на 1 л воды (среда 2). Водоросли культивируют в течение 4-5 дней при непрерывном освещении люминесцентными лампами (50 Вт/м²), температуре 36°C, непрерывном барботаже атмосферным воздухом, pH среды поддерживают 6,5; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 путем титрования HCl. Продуктивность измеряют по сухой массе микроводорослей.

В качестве контроля используют процесс фотоавтотрофного культивирования микроводорослей на питательной среде того же состава в тех же самых условиях при коррективке pH с помощью периодического продувания чистой CO₂.

Как видно из табл.2, способ обеспечивает увеличение продуктивности.

Пример 6. Культуру микроводорослей *Scenedesmus acutus* штамми 8 засевают на питательную среду 2. Водоросли культивируют также как в примере 5. Продуктивность измеряют по сухой массе микроводорослей, полученных в опыте и контроле.

Результаты по примерам 5 и 6 представлены в табл.2.

Пример 7. Культуру микроводорослей *Scenedesmus acutus* штамми 8 или *Chlorella*

spk засевают на питательную среду 4. Водоросли культивируют также как в примерах 1 и 2. Продуктивность измеряют по сухой массе микроводорослей, полученных в опыте и контроле. Среда дополнительно содержит ацетазоламид в концентрации 1,0 мМ.

Пример 8. Культуру микроводорослей *Scenedesmus acutus* штамми 8 или *Chlorella* spk засевают на питательную среду 2. Водоросли культивируют также как в примерах 1 и 2. Продуктивность измеряют по сухой массе микроводорослей, полученных в опыте и контроле. Среда дополнительно содержит диакарб в концентрации 1,0 мМ.

Пример 9. Культуру микроводорослей *Scenedesmus acutus* штамми 8 или *Chlorella* spk засевают на питательную среду 1. Водоросли культивируют также как в примерах 1 и 2. Продуктивность измеряют по сухой массе микроводорослей, полученных в опыте и контроле. Среда дополнительно содержит этоксизоламид в концентрации 1,0 мМ.

Результаты по примерам 7-9 представлены в табл.3.

Пример 10. Культуру микроводорослей *Chlorella vulgaris* C-3, *Chlorella* spk или *Scenedesmus acutus* шт 8 засевают на питательную среду следующего состава, г/л воды: KNO_3 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5; KH_2PO_4 1,24; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,018; ЕДТА 0,037; раствор микроэлементов 1 мл и бикарбонат натрия в количестве 3-5 г на 1 л воды (среда 2). Водоросли культивируют в течение 4-5 дней при непрерывном освещении люминесцентными лампами (50 Вт/м^2), температуре 36°C , непрерывном барботаже атмосферным воздухом, pH среды поддерживают 6,5; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 путем титрования хлористым на-

трием, хлористым калием или их смесью в концентрации 0,2; 0,4; 0,6%.

Продуктивность измеряют по сухой массе микроводорослей.

В качестве контроля используют процесс фотоавтотрофного культивирования микроводорослей на питательной среде того же состава в тех же самых условиях при корректировке pH с помощью периодического продувания чистой CO_2 .

Результаты представлены в табл.4.

Как видно из табл.4, способ обеспечивает увеличение продуктивности.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет значительно повысить продуктивность различных микроводорослей при культивировании на бикарбонатсодержащих средах, которое в обычных условиях для них не используется, а также значительно упростить фотокультиваторы, их системы автоматического контроля и управления, снизить трудоемкость их обслуживания, что приводит к значительному снижению себестоимости полученной биомассы.

Формула изобретения

1. Способ культивирования зеленых микроводорослей на питательной среде в присутствии бикарбоната при pH не ниже 8,5, отличающийся тем, что, с целью повышения продуктивности, питательная среда дополнительно содержит ингибитор карбоангидразы.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве ингибитора карбоангидразы используют соляную кислоту, хлористый натрий или хлористый калий, а также их смесь в концентрации 0,2-0,6%, диакарб, ацетазоламид, этоксизоламид в концентрации 0,7-1,2 мМ.

45

50

55

Таблица 1

Влияние соляной кислоты, ацетазоламида и диакарба на продуктивность хлореллы в условиях поддержания pH продувкой CO₂ (контроль, варианты 3,4) или HCl (варианты 1,2).

Вариант по примеру	Clorella sp. K		Chlorella C-3	
	Продуктивность		Продуктивность	
	мг/мл в сутки	%	мг/мл в сутки	%
Контроль	0,63	100	0,92	100
1) HCl	0,94	149	1,14	124
2) HCl	0,95	152	1,14	124
3) АЗА				
0,7 мМ	0,71	113	1,00	109
1,0 мМ	0,93	148	1,21	132
1,2 мМ	0,80	127	1,00	109
4) Диакарб				
0,7 мМ	0,70	111	1,08	117
1,0 мМ	1,03	163	1,18	128
1,2 мМ	0,84	133	0,97	105

Таблица 2

Влияние pH и ионов хлора на продуктивность хлореллы и сценедесмуса при 0,03 % CO₂ в условиях поддержания pH продувкой CO₂ (контроль) или HCl

Вариант	pH 6,5		pH 8,5		pH 9,0		pH 9,5		pH 10	
	Продуктивность за 5 сут									
	мг/мл	%	мг/мл	%	мг/мл	%	мг/мл	%	мг/мл	%
Хлорелла										
Конт- роль	1,05	100	1.05	100	1,05	100	1,05	100	0.8	100
HCl	0,99	94	2.00	190	2,00	190	2,00	190	0.8	100
Сценедесмус										
Конт- роль	0.5	100	0.6	100	0,6	100	0.6	100	0.6	100
HCl	0.4	80	1.1	183	1.0	167	1,1	183	1.0	167

Т а б л и ц а 3

Влияние pH, ионов хлора, ацетазоламида, диакарба, этоксиазоламида в условиях поддержания pH продувкой CO₂ (контроль) или HCl

Вариант	рН 6,5		рН 8,5		рН 9,0		рН 9,5		рН 10,0	
	Продуктивность									
	мг/мл	%	мг/мл	%	мг/мл	%	мг/мл	%	мг/мл	%
Хлорелла										
Контроль	0,8	100	0,8	100	0,8	100	0,8	100	0,8	100
АЗА	0,6	75	2,1	263	2,1	263	1,68	210	0,8	100
Диакарб	0,4	50	1,9	238	1,9	238	1,6	200	0,9	113
ЭЗА	0,4	50	2,0	250	2,1	263	2,0	250	0,8	100
Сценедесмус										
Контроль	0,4	100	0,4	100	0,4	100	0,4	100	0,4	100
АЗА	0,32	80	1,3	325	1,4	350	1,45	363	1,4	350
Диакарб	0,3	75	1,3	325	1,0	250	1,4	350	1,0	250
ЭЗА	0,2	50	1,3	325	1,0	250	1,0	250	1,3	325

Т а б л и ц а 4

Влияние солей хлора на продуктивность микроводорослей

Вариант	Chlorella				Scenedesmus			
	Продуктивность							
	мг/мл на 2-е сутки	%	мг/мл на 5-е сутки	%	мг/мл на 2-е сутки	%	мг/мл на 5-е сутки	%
Контроль	0,8	100	1,05	100	0,4	100	0,6	100
NaCl 0,2%	1,0	125	1,6	152	0,45	113	0,85	142
0,4%	1,0	125	2,0	190	0,6	150	1,0	167
0,6%	1,0	125	2,0	190	0,6	150	1,0	167
KCl 0,2%	1,15	144	1,6	152	0,45	113	0,8	133
0,4%	1,15	144	2,15	205	0,65	163	0,95	158
0,6%	1,15	144	2,15	205	0,65	163	0,95	158
NaCl+KCl								
0,2%	1,2	150	1,6	152	0,5	125	0,8	133
0,4%	1,2	150	2,2	210	0,7	175	1,0	167
0,6%	1,2	150	2,2	210	0,7	175	1,0	167

Редактор Т.Лазоренко

Составитель Л.Лучкина

Техред М.Моргентал

Корректор О. Ципле

Заказ 2050

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101