

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU<sup>(11)</sup> 2 541 446<sup>(13)</sup> C1

(51) МПК  
A01G 33/00 (2006.01)  
C12N 1/12 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Государственная регистрация изобретения осуществлена по заявлению о признании действия исключительного права на территории Российской Федерации на основании статьи 13<sup>1</sup> Федерального закона от 18 декабря 2006 года № 231-ФЗ «О введении в действие части четвертой Гражданского кодекса Российской Федерации»

(21)(22) Заявка: 2014149873/93, 26.09.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
26.04.2011

Приоритет(ы):  
Дата приоритета: 26.04.2011  
Патент № 102272 (UA)

(45) Опубликовано: 10.02.2015 Бюл. № 4

Адрес для переписки:  
299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,  
Институт биологии южных морей  
им. А.О. Ковалевского

(72) Автор(ы):  
Лях Антон Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):  
Институт биологии южных морей им. А.О.  
Ковалевского (RU)

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЗЕЛЕНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ DUNALIELLA SALINA ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ

(57) Реферат:

Способ культивирования одноклеточной зеленой микроводоросли Dunaliella salina для получения биомассы с использованием квазинепрерывного режима культивирования. Культуру, выращенную на модифицированной питательной среде Тренкеншу методом накопительных культур до плотности 1,5-3 г ОР·л<sup>-1</sup> переводят в квазинепрерывный режим культивирования. Дальнейшее выращивание осуществляют при удельной скорости протока среды около 0,3 сут<sup>-1</sup>, при круглогодичном

освещении с поверхностной освещенностью 80 Вт·м<sup>-2</sup>, непрерывной продувке газовоздушной смесью со скоростью 1 л смеси·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> культуры, которая содержит 3 % CO<sub>2</sub>, и температуре 26-28°C, на модифицированной питательной среде Тренкеншу. Полученная биомасса составляла около 0,5 г ОВ с 1 л культуры в сутки при относительном содержании каротиноидов в биомассе не менее 0,9 % ОВ, хлорофилла а - 2,8% ОВ и белка - 55% ОВ.

C 1  
C 6  
C 4  
C 4  
C 1  
C 5  
C 2  
R U

R U  
2 5 4 1 4 4 6 C 1

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 541 446<sup>(13)</sup> C1

(51) Int. Cl.  
A01G 33/00 (2006.01)  
C12N 1/12 (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

*State registration of the invention has been provided following a request to recognize the exclusive rights on the territory of the Russian Federation as provided for in the Article 13<sup>1</sup> of the Federal Law of December 18, 2006 № 231-ФЗ «On enactment of part four of the Civil Code of the Russian Federation»*

(21)(22) Application: 2014149873/93, 26.09.2014

(24) Effective date for property rights:  
26.04.2011

Priority:  
Priority date: 26.04.2011  
Patent No. 102272 (UA)

(45) Date of publication: 10.02.2015 Bull. № 4

Mail address:  
299011, g. Sevastopol', pr. Nakhimova, 2, Institut  
biologii juzhnykh morej  
im. A.O. Kovalevskogo

(72) Inventor(s):  
Ljakh Anton Mikhailevich (RU)

(73) Proprietor(s):  
Institut biologii juzhnykh morej im. A.O.  
Kovalevskogo (RU)

## (54) METHOD FOR CULTURING UNICELLULAR GREEN MICROALGAE DUNALIELLA SALINA FOR BIOMASS PRODUCTION

### (57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: culture grown on the modified nutrient Trenkenshu medium by enrichment culture procedure to the density of 1.5-3 g OR·l<sup>-1</sup> is transformed into a quasi-continuous culture process. The following growth procedure is performed at a specific medium flow rate of approximately 0.3 days<sup>-1</sup> under continuous light at a superficial lighting of 80 Wt·m<sup>-2</sup>, with continuous blow of air-gas mixture at 1 l of the mixture-

min<sup>-1</sup>·l<sup>-1</sup> of the culture, which contains 3 % CO<sub>2</sub>, and a temperature of 26-28°C on the modified nutrient Trenkenshu medium. The biomass production rate has been shown at approximately 0.5 g of O.M. with 1 l of the culture a day at the relative carotinoid content in the biomass of not less than 0.9 % O.M., chlorophyll A - 2.8% O.M. and protein - 55 % O.M.

EFFECT: producing the biomass with using the quasi-continuous culture process.

R U 2 5 4 1 4 4 6 C 1

R U 2 5 4 1 4 4 6 C 1

Изобретение относится к биотехнологии микроводорослей и может быть использовано при промышленном получении биомассы микроводоросли *Dunaliella salina*.

Зеленая одноклеточная водоросль *Dunaliella salina* - объект массового промышленного 5 культивирования для получения витаминов, липидов, спиртов (в частности, этанола) и антибиотиков. Биомасса активно растущей микроводоросли *D. salina*, по данным многих авторов, имеет сбалансированный биохимический состав (содержание белка до 60%, углеводов - 8,40 - 12,70%, липидов - 7,70 - 10,80%). Содержание ценного пигмента хлорофилла а может достигать свыше 5% на абсолютно сухую массу. Кроме того, 10 биомасса зеленой микроводоросли *D. salina* является источником биоактивных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, таких как липиды (полиненасыщенные жирные кислоты), каротиноиды ( $\beta$ -каротин, лютеин, зеаксантин и др.), витамины (токоферол) и др. В отличие от других водорослей, клетки *D. salina* лишены целлюлозной 15 или пектиновой оболочки и окружены лишь тонкой эластичной протоплазматической мембраной (плазмалеммой), что существенно облегчает усвоение биомассы водоросли. Благодаря этим ценным качествам биомасса *D. salina* широко применяется в мировой практике в качестве кормовой добавки.

Промышленные технологии, использующиеся в настоящее время, ориентированы 20 на получение биомассы *D. salina*, обогащённой  $\beta$ -каротином путем использования обеднённых сред, так как именно в таких условиях происходит накопление вторичных каротиноидов. Состав среды Тренкеншу позволяет получать плотную культуру дуналиеллы, характеризующуюся высокими производственными характеристиками.

На практике применяются следующие методы культивирования *D. salina*: 25 накопительный, непрерывный, непропорционально-проточный, квазинепрерывный. Однако чаще всего для выращивания *D. salina* используют накопительный режим культивирования, который является наиболее разработанным и изученным. Возможности квазинепрерывной культуры (особенно плотной) реализованы слабо.

Известен способ квазинепрерывного культивирования *D. salina*, при котором выращивание микроводоросли происходит в открытых резервуарах [см. Garcia-Gonzalez 30 M., Moreno J., Canavate J.P., Anguis V., Prieto A., Manzano C, Florencio F.G., Guerrero M.G. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain // J Appl. Phycol. - 2003. - 15. - P. 177-184]. Культивирование осуществляют при естественной освещённости и температуре. В способе водоросль выращивают методом квазинепрерывной культуры на питательной среде с содержанием 5 mM NaNO<sub>3</sub> и 2 M NaCl при естественном 35 освещении, добавление свежей среды проводят каждые 2 суток до первоначальной плотности культуры  $0,7 - 0,9 \cdot 10^6$  кл·мл<sup>-1</sup>. Водоросли выращивают в овальных пластиковых бассейнах с площадью поверхности 3 м<sup>2</sup> и глубиной 0,3 м при естественном уровне освещённости и температуре. При таком режиме культивирования средняя 40 продуктивность составляет 1,65 г сухого вещества (СВ), а  $\beta$ -каротина - 0,1 г с 1 м<sup>2</sup> в сутки.

Указанная работа имеет принципиальное значение, так как подтверждает 45 возможность получения биомассы *D. salina* при выращивании в квазинепрерывном режиме. Однако предложенный режим культивирования имеет некоторые ограничения для использования в промышленных масштабах. Наиболее важными из них являются:

- а) сложность в регулировке степени разбавления до первоначальной плотности культуры;
- б) более низкая продуктивность с единицы объёма по сравнению с предлагаемым

способом;

В основу изобретения Способ культивирования одноклеточной зеленой микроводоросли *Dunaliella salina* поставлена задача повышения эффективности способа путем увеличения продуктивности культуры при использовании концентрированной питательной среды и квазинепрерывного режима выращивания.

Способ культивирования одноклеточной зеленой микроводоросли *Dunaliella salina* для получения биомассы основан на использовании квазинепрерывного режима, а подбор условий культивирования, способствующих накоплению в клетках пигментов и белка, были выполнены авторами в лабораторных экспериментах.

Поставленная задача достигается тем, что культуру, выращенную на модифицированной питательной среде Тренкеншу (Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // Биология моря. - 1979. - № 51. - С. 41 - 46.) методом накопительных культур до плотности 1,5 - 3 г ОВ·л<sup>-1</sup> (грамм органического вещества на 1 литр) переводят на квазинепрерывный режим культивирования. Квазинепрерывную культуру получают путем периодической (с интервалом в 24 ч) замены части суспензии микроводоросли равноценным объемом свежеприготовленной среды. Каждые 24 часа из культиваторов отбирают 12, 14, 32 и 42% объема культуры ( $\omega = 0,12\text{-}0,42 \text{ сут}^{-1}$ ) и заменяют его равноценным объемом свежей среды. Выращивание *D. salina* осуществляют с удельной скоростью протока около 0,1 - 0,4 сут<sup>-1</sup>, при круглосуточном освещении люминесцентными лампами дневного света, обеспечивающими поверхностную освещенность 80 Вт·м<sup>-2</sup>, непрерывной продувке газовоздушной смесью: на 1 литр культуры микроводоросли - 1 литр газовоздушной смеси в 1 минуту (1 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> культуры), содержащей 3% CO<sub>2</sub> (по объему) и температуре 26-28°C.

Общим для прототипа и заявляемого способа является применение квазинепрерывного режима культивирования. Основное отличие от прототипа заключается в том, что в заявлении способе при культивировании используется метод квазинепрерывной культуры со скоростью протока около 0,3 сут<sup>-1</sup>.

Изобретение поясняется иллюстрациями. Фиг. 1 - Динамика плотности накопительной и квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina* при различной скорости протока среды (пунктирная линия - граница накопительного и квазинепрерывного культивирования).

Фиг. 2 - Зависимость относительного содержания пигментов в клетках *Dunaliella salina* от удельной скорости протока среды в квазинепрерывной культуре. Фиг. 3 - Зависимость относительного содержания белка в клетках *Dunaliella salina* от удельной скорости протока среды в квазинепрерывной культуре.

Способ культивирования одноклеточной зеленой водоросли *Dunaliella salina* реализуется следующим образом:

Для культивирования может быть использован любой штамм *Dunaliella salina*, например IBSS-1, IBSS-2, IBSS-3, их коллекционное хранение осуществляют на питательной среде Ben-Amotz, и температуре 15-18°C с пересевом каждые 1,5-2 месяца.

Таблица 1.

**Состав модифицированной питательной среды Тренкеншу  
для квазинепрерывного культивирования *Dunaliella salina***

5

Компонент	Навеска, г·л <sup>-1</sup>
Морская соль	120
<i>NaNO<sub>3</sub></i>	2,139
<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O</i>	0,30
<i>Na<sub>2</sub>EDTA</i>	0,037
<i>FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> × 7H<sub>2</sub>O</i>	0,042
<i>MnCl<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O</i>	0,0040
<i>CoCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O</i>	0,0031
<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> × 4H<sub>2</sub>O</i>	0,0009
<i>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> × 24H<sub>2</sub>O</i>	0,0017

10

Получение инокулята. Для получения инокулята культуру водоросли из музея 5-7 дней выращивают методом накопительной культуры на модифицированной среде Тренкеншу разбавленной водой 1:1 при освещении 6 кЛк. Затем культуру переносят в неразбавленную модифицированную среду Тренкеншу и продолжают культивировать при искусственном освещении люминесцентными лампами дневного света 80 Вт·м<sup>-2</sup> в накопительном режиме при непрерывном барботаже газовоздушной смесью (1 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> культуры), содержащей 3% СО<sub>2</sub> (по объёму). Для засева культиваторов используют активно делящуюся культуру, взятую на линейной стадии роста, когда её продуктивность максимальна. Суспензию клеток вносят в культиваторы из такого расчета, чтобы начальная плотность культур составляла не менее 0,1-0,2 г·л<sup>-1</sup> сухого вещества. Процесс культивирования. Питательной средой для предлагаемого способа культивирования служит модифицированная среда Тренкеншу. Модификация заключается в увеличении солености среды за счет добавления хлорида натрия или морской соли до концентрации 120 г/л. Выращивание водоросли осуществляют при поверхностной освещенности культиваторов около 80 Вт·м<sup>-2</sup>, скорости продувки газовоздушной смесью 1 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> культуры, содержащей 3% СО<sub>2</sub> и температуре питательной среды 26-28°C. Первоначально *D. salina* культивируют в накопительном режиме на модифицированной среде Тренкеншу до плотности культуры 1,5 - 3 г ОВ·л<sup>-1</sup>. Далее культуру переводят на квазинепрерывный режим, т.е. с интервалом в 24 часа из культиваторов отбирают 10-40% объема культуры, заменяя его равноценным объемом свежей среды.

25

Для установления условий культивирования, способствующих накоплению в клетках пигментов и белка, культивирование *D. salina* проводили в четырёх вариантах квазинепрерывного режима в 6-литровых культиваторах на модифицированной питательной среде Тренкеншу при круглогодичной поверхностной освещенности 80 Вт·м<sup>-2</sup>, со скоростью продувки газовоздушной смесью 1 л смеси·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> культуры, содержащей 3% СО<sub>2</sub> и температуре 26-28°C. Объем культуры в культиваторах составлял 5 л, начальная плотность культуры -0,12 г ОВ·л<sup>-1</sup>. Каждые 24 часа из культиваторов отбирали 12, 14, 32 и 42% объема культуры ( $\omega=0,12-0,42$  сут<sup>-1</sup>) и заменяли его

равноценным объемом свежей среды.

При квазинепрерывном режиме происходит систематическое внесение биогенов в культуру, и с увеличением удельной скорости протока количество азота и фосфора, вносимого в культуру, пропорционально увеличивается. При этом плотность культуры изменяется и достигает стационарного динамического равновесия (фиг. 1, табл. 2).

Таблица 2

Относительное содержание фотосинтетических пигментов и белка в клетках квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina* при различных удельных скоростях протока среды

Удельная скорость протока, сут <sup>-1</sup>	Плотность культуры, г ОВ·л <sup>-1</sup>	ХЛ a, % ОВ	ХЛ b, % ОВ	Каротиноиды, % ОВ	Белок, % ОВ
0,12	2,96±0,15	2,89±0,23	0,62±0,060	0,95±0,100	44,3±2,85
0,14	2,39±0,15	3,25±0,41	0,74±0,182	1,08±0,193	54,6±3,93
0,32	1,42±0,11	2,77±0,15	0,60±0,065	0,92±0,069	55,9±5,78
0,42	1,14±0,11	2,34±0,24	0,52±0,060	0,79±0,141	54,7±5,57

Кроме того, наблюдается изменение и стабилизация относительного содержания фотосинтетических пигментов и белка в связи с изменившимися условиями по минеральному обеспечению и освещённости (на фоне изменения плотности культуры) (фиг. 2, фиг. 3, табл. 2).

Общий выход биомассы *D. salina* при квазинепрерывном культивировании складывается из ежедневных 10-40% отборов биомассы и биомассы, собираемой из культиваторов по окончании технологического цикла. Данные, характеризующие продуктивность культуры *D. salina* по биомассе, пигментам и белку при квазинепрерывном режиме культивирования представлены в табл. 3.

Таблица 3

Продуктивность культуры *Dunaliella salina* по биомассе, пигментам и белку при квазинепрерывном режиме культивирования

Удельная скорость протока, сут <sup>-1</sup>	Продуктивность				
	биомасса, г ОВ·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>	ХЛ a, мг·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>	ХЛ b, мг·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>	каротиноиды, мг·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>	белок, мг·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>
0,12	0,35±0,011	9,61±0,690	2,20±0,205	3,17±0,235	157,9±10,11
0,14	0,33±0,009	10,82±0,691	2,48±0,217	3,43±0,372	181,8±13,09
0,32	0,46±0,024	12,42±0,626	2,72±0,218	4,15±0,379	252,7±23,46
0,42	0,48±0,036	11,22±1,022	2,39±0,245	3,96±0,295	263,5±24,42

Ежедневное внесение нитратов и фосфатов обеспечивает поддержание клеток в культуре в вегетативном состоянии. В предлагаемом способе культивирования величина скорости протока находится в диапазоне 0,1-0,4 сут<sup>-1</sup>, но по результатам проведённых экспериментов наибольшая продуктивность по пигментам и белку зарегистрирована при удельной скорости протока среды около 0,3 сут<sup>-1</sup> (ежедневный 30% обмен среды). В этом случае продуктивность культуры *D. salina* по биомассе составляет 0,45 г ОВ·л<sup>-1</sup>,

по хлорофиллу а - 12, каротиноидам - 4, белку - 250 мг·л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup>.

Пример.

Для культивирования использовали штамм IBSS-2, который характеризуется более высоким содержанием каротиноидов, по сравнению со штаммами IBSS-1 и IBSS-3.

Для получения инокулята штамм в течение 7 суток выращивали методом накопительной культуры в культиваторах плоскопараллельного типа объемом 6 л с рабочей толщиной слоя 5 см при поверхностном освещении 80 Вт·м<sup>-2</sup> на модифицированной питательной среде Тренкеншу. Полученную культуру использовали в качестве инокулята. Культуру переносили в аналогичные культиваторы, содержащие свежую модифицированную питательную среду Тренкеншу и продолжали выращивать в течение 10 суток при тех же условиях, при непрерывном барботаже газовоздушной смесью со скоростью 1 л мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> культуры, содержащей 3% CO<sub>2</sub> и температуре 26-28°C до плотности культуры 1,5-3 г ОВ·л<sup>-1</sup>.

Далее культивирование D. salina проводили в квазинепрерывном режиме в 6-литровых культиваторах на модифицированной питательной среде Тренкеншу при круглосуточной поверхностной освещенности 80 Вт·м<sup>-2</sup>, скорости продувки газовоздушной смесью 1 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> культуры, содержащей 3% CO<sub>2</sub> и температуре 26-28°C. Объем культуры в

культиваторах составлял 5 л, начальная плотность культуры - около 0,12 г ОВ·л<sup>-1</sup>.

Каждые 24 часа из культиваторов отбирали около 30% объема культуры ( $\omega = 0,30$  сут<sup>-1</sup>) и заменяли его равноценным объемом свежей среды. Полученная биомасса составляла около 0,5 г ОВ с 1 л культуры в сутки при относительном содержании каротиноидов в

биомассе не менее 0,9 % ОВ, хлорофилла а - 2,8% ОВ и белка - 55 % ОВ.

В предлагаемом способе продуктивность по биомассе в 25 раз выше, чем в известном. Способ эффективный и может быть положен в основу промышленного культивирования одноклеточной зеленой водоросли Dunaliella salina и получения сырья для производства БАД с повышенной биодоступностью каротиноидов и хлорофиллов как биологически активных соединений.

#### Формула изобретения

Способ культивирования одноклеточной зеленой микроводоросли Dunaliella salina для получения биомассы, в котором используют квазинепрерывный режим культивирования, отличающийся тем, что культуру, выращенную на модифицированной питательной среде Тренкеншу методом накопительных культур до плотности 1,5-3 г ОВ·л<sup>-1</sup>, переводят в квазинепрерывный режим культивирования и осуществляют дальнейшее выращивание при удельной скорости протока среды около 0,3 сут<sup>-1</sup> при круглосуточном освещении с поверхностной освещенностью 80 Вт·м<sup>-2</sup>, непрерывной продувке газовоздушной смесью со скоростью 1 л смеси·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> культуры, содержащей 3% CO<sub>2</sub> и температуре 26-28°C, на модифицированной питательной среде Тренкеншу, имеющей состав, г·л<sup>-1</sup>:

Морская соль	120
NaNO <sub>3</sub>	2,139
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,30
Na <sub>2</sub> EDTA	0,037

**RU 2 541 446 C1**

FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,042
MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	0,0040
CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,0031
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> × 4H <sub>2</sub> O	0,0009
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> × 24H <sub>2</sub> O	0,0017

5

10

15

20

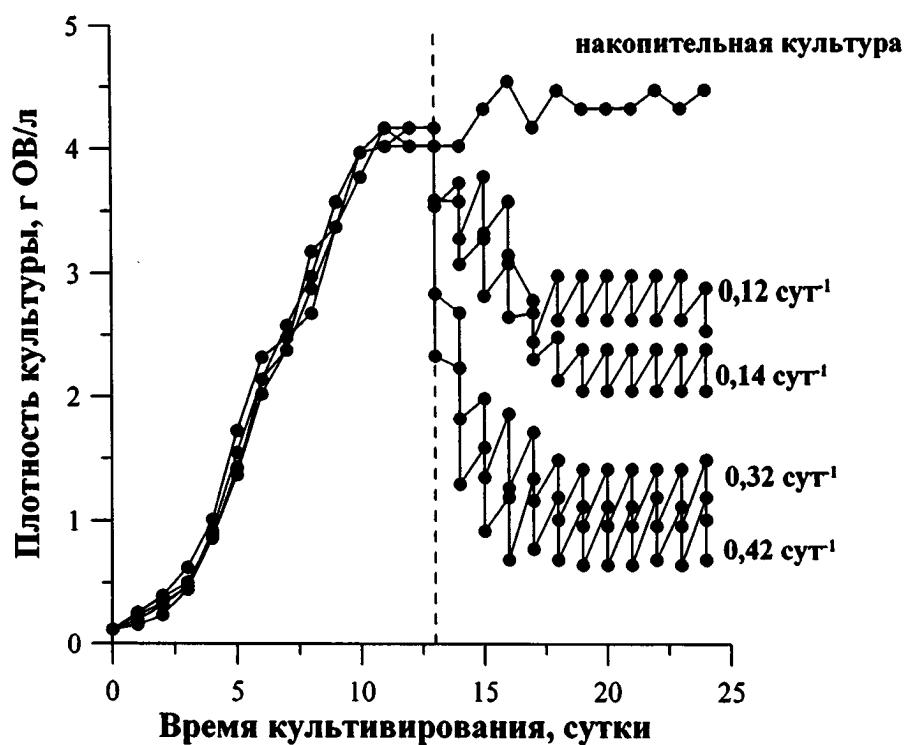
25

30

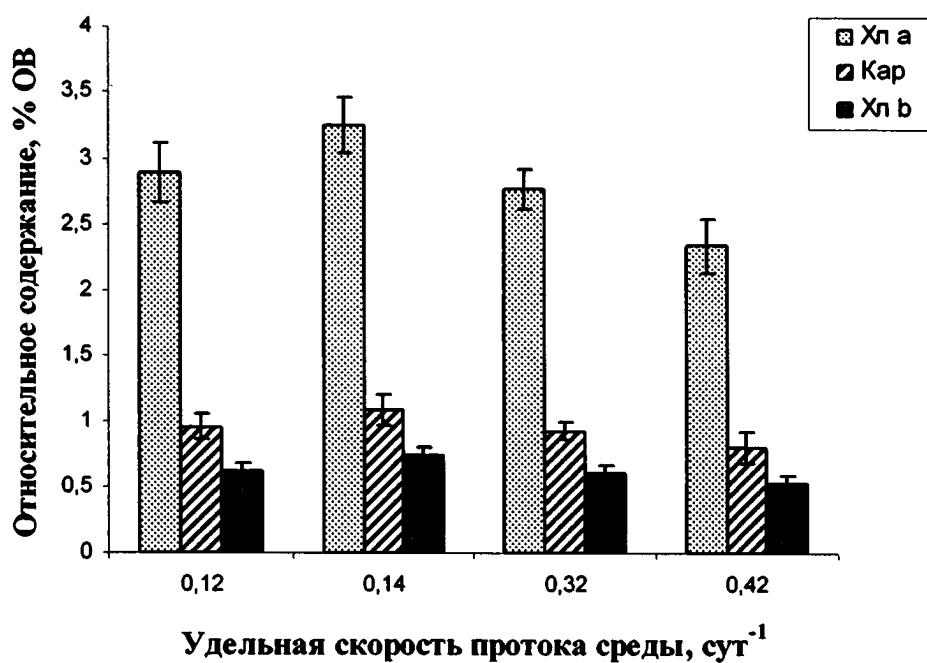
35

40

45



Фиг. 1



Фиг. 2



ФИГ. 3