



**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 13¹ 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 ЗЕЛЕННОЙ 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⁻¹ переводят в квазинепрерывный режим культивирования. Дальнейшее выращивание осуществляют при удельной скорости потока среды около 0,3 сут⁻¹, при круглосуточном

освещении с поверхностной освещенностью 80 Вт·м⁻², непрерывной продувке газовой воздушной смесью со скоростью 1 л смеси·мин⁻¹·л⁻¹ культуры, которая содержит 3 % CO₂, 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.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 541 446** (13) **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 13¹ of the Federal Law of December 18, 2006 № 231-ΦЗ «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 Mikhajlovich (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⁻¹ 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⁻¹ under continuous light at a superficial lighting of 80 Wt·m⁻², with continuous blow of air-gas mixture at 1 l of the mixture-

min⁻¹·l⁻¹ of the culture, which contains 3 % CO₂, 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.

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

Зеленая одноклеточная водоросль *Dunaliella salina* - объект массового промышленного 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, биомасса зеленой микроводоросли *D. salina* является источником биоактивных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, таких как липиды (полиненасыщенные жирные кислоты), каротиноиды (β -каротин, лютеин, зеаксантин и др.), витамины (токоферол) и др. В отличие от других водорослей, клетки *D. salina* лишены целлюлозной 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 на получение биомассы *D. salina*, обогащённой β -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 продукционными характеристиками.

На практике применяются следующие методы культивирования *D. salina*: 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 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 NaNO₃ и 2 M NaCl при естественном освещении, добавление свежей среды проводят каждые 2 суток до первоначальной плотности культуры 0,7 - 0,9·10⁶ кл·мл⁻¹. Водоросли выращивают в овальных пластиковых бассейнах с площадью поверхности 3 м² и глубиной 0,3 м при естественном уровне освещённости и температуре. При таком режиме культивирования средняя продуктивность составляет 1,65 г сухого вещества (СВ), а β -каротина - 0,1 г с 1 м² в сутки.

Указанная работа имеет принципиальное значение, так как подтверждает 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 $1,5 - 3 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$ (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 ($\omega = 0,12-0,42 \text{ сут}^{-1}$) и заменяют его равноценным объемом свежей среды. Выращивание *D. salina* осуществляют с удельной скоростью протока около $0,1 - 0,4 \text{ сут}^{-1}$, при круглосуточном освещении люминесцентными лампами дневного света, обеспечивающими поверхностную освещённость $80 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$, непрерывной продувке газовой воздушной смесью: на 1 литр культуры микроводоросли - 1 литр газовой воздушной смеси в 1 минуту ($1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ культуры), содержащей 3% CO_2 (по объёму) и температуре $26-28^\circ\text{C}$.

Общим для прототипа и заявляемого способа является применение квазинепрерывного режима культивирования. Основное отличие от прототипа заключается в том, что в заявляемом способе при культивировании используется метод квазинепрерывной культуры со скоростью протока около $0,3 \text{ сут}^{-1}$.

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 $15-18^\circ\text{C}$ с пересевом каждые 1,5-2 месяца.

Таблица 1.

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

Компонент	Навеска, г·л ⁻¹
Морская соль	120
$NaNO_3$	2,139
$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	0,30
Na_2EDTA	0,037
$FeC_6H_5O_7 \times 7H_2O$	0,042
$MnCl_2 \times 4H_2O$	0,0040
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,0031
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$	0,0009
$K_2Cr_2(SO_4)_4 \times 24H_2O$	0,0017

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⁻² в накопительном режиме при непрерывном барботаже газовой смеси (1 л·мин⁻¹·л⁻¹ культуры), содержащей 3% CO₂ (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⁻¹ сухого вещества. Процесс культивирования. Питательной средой для предлагаемого способа культивирования служит модифицированная среда Тренкеншу. Модификация заключается в увеличении солёности среды за счет добавления хлорида натрия или морской соли до концентрации 120 г/л. Выращивание водоросли осуществляют при поверхностной освещённости культиваторов около 80 Вт·м⁻², скорости продувки газовой смеси 1 л·мин⁻¹·л⁻¹ культуры, содержащей 3% CO₂ 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⁻¹. 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.

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 круглосуточной поверхностной освещённости 80 Вт·м⁻², со скоростью продувки газовой смеси 1 л смеси·мин⁻¹·л⁻¹ культуры, содержащей 3% CO₂ и температуре 26-28°C. Объем культуры в культиваторах составлял 5л, начальная плотность культуры - 0,12 г ОВ·л⁻¹. Каждые 24 часа из культиваторов отбирали 12, 14, 32 и 42% объема культуры ($\omega=0,12-0,42$ сут⁻¹) 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 ⁻¹	Плотность культуры, г ОВ·л ⁻¹	ХЛ а, % ОВ	ХЛ б, % 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 ⁻¹	Продуктивность				
	биомасса, г ОВ·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	хл а, мг·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	хл б, мг·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	каротиноиды, мг·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	белок, мг·л ⁻¹ ·сут ⁻¹
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⁻¹, но по результатам проведённых экспериментов наибольшая продуктивность по пигментам и белку зарегистрирована при удельной скорости протока среды около 0,3 сут⁻¹ (ежедневный 30% обмен среды). В этом случае продуктивность культуры *D. salina* по биомассе составляет 0,45 г ОВ·л⁻¹,

по хлорофиллу а - 12, каротиноидам - 4, белку - $250 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$.

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 объёмом 6 л с рабочей толщиной слоя 5 см при поверхностном освещении $80 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ 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 газовой смеси со скоростью $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ культуры, содержащей 3% CO_2 и температуре $26-28^\circ\text{C}$ до плотности культуры $1,5-3 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$.

Далее культивирование *D. salina* проводили в квазинепрерывном режиме в 6-литровых культиваторах на модифицированной питательной среде Тренкеншу при круглосуточной поверхностной освещённости $80 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$, скорости продувки газовой смеси $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ культуры, содержащей 3% CO_2 и температуре $26-28^\circ\text{C}$. Объём культуры в культиваторах составлял 5 л, начальная плотность культуры - около $0,12 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$.

Каждые 24 часа из культиваторов отбирали около 30% объёма культуры ($\omega = 0,30 \text{ сут}^{-1}$) и заменяли его равноценным объёмом свежей среды. Полученная биомасса составляла около $0,5 \text{ г ОВ}$ 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 зелёной водоросли *Dunaliella salina* и получения сырья для производства БАД с повышенной биодоступностью каротиноидов и хлорофиллов как биологически активных соединений.

Формула изобретения

Способ культивирования одноклеточной зелёной 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 $1,5-3 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$, переводят в квазинепрерывный режим культивирования и осуществляют дальнейшее выращивание при удельной скорости протока среды около $0,3 \text{ сут}^{-1}$ при круглосуточном освещении с поверхностной освещённостью $80 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$, непрерывной продувке газовой смеси со скоростью $1 \text{ л смеси} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ культуры, содержащей 3% CO_2 и температуре $26-28^\circ\text{C}$, на модифицированной питательной среде Тренкеншу, имеющей состав, $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$:

Морская соль	120
NaNO_3	2,139
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,30
Na_2EDTA	0,037

RU 2 541 446 C1

$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,042
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,0040
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,0031
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,0009
$\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \times 24\text{H}_2\text{O}$	0,0017

5

10

15

20

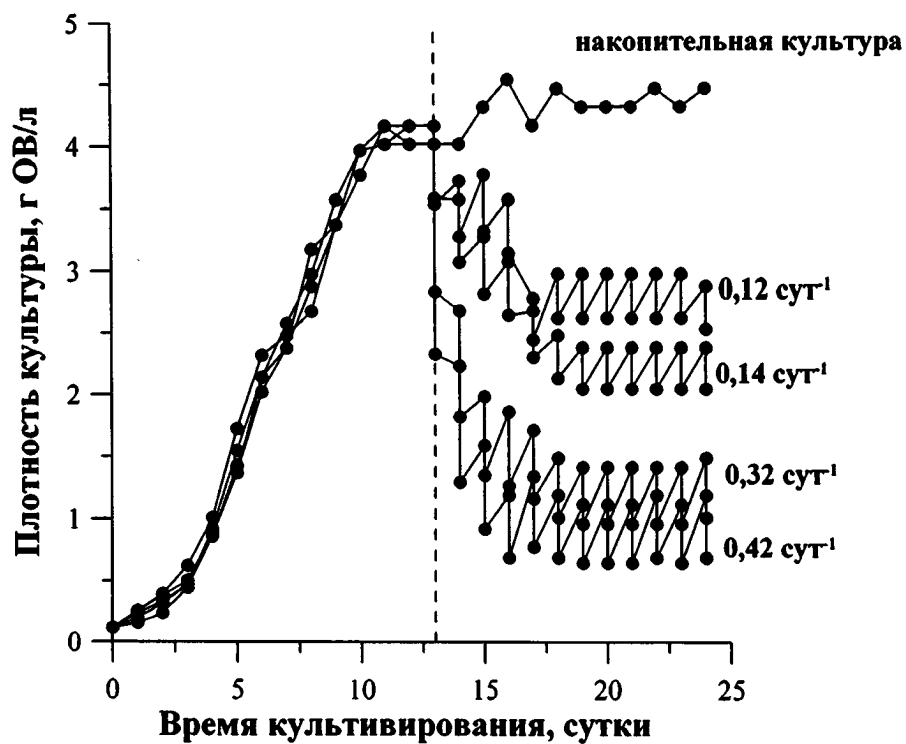
25

30

35

40

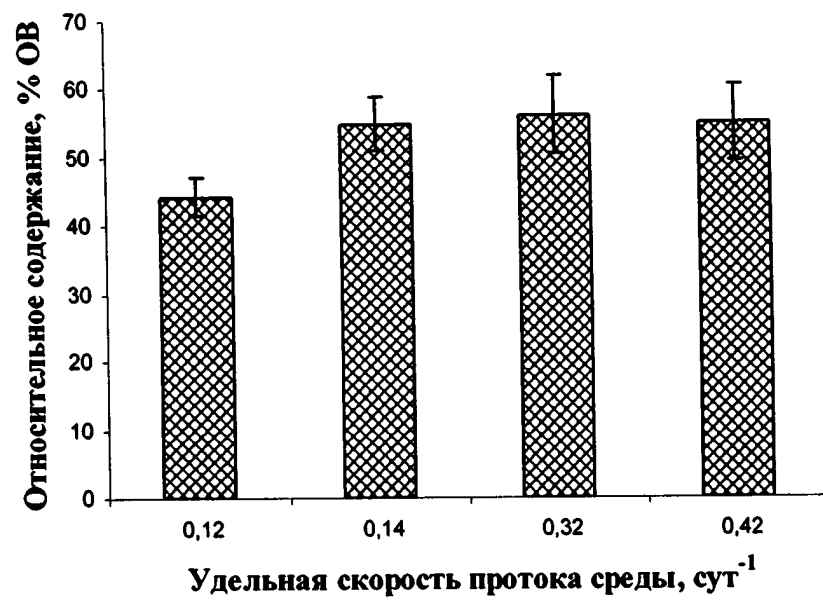
45



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3