



(51) МПК
C12N 1/12 (2006.01)
C12M 1/02 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)
A01G 33/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013142620/10, 19.09.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.09.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.09.2013

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2015 Бюл. № 9

(45) Опубликовано: 10.05.2015 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: МАЛЬЦЕВСКАЯ Н.В.,
 Энергосберегающие режимы освещения при культивировании светозависимых микроорганизмов \ Автореферат, Москва, 2012, стр.4-6, 10-14, найдено в Интернете: http://www.muctr.ru/upload/form/not_image/82a/NVMalcevskaia.pdf. RU 2176667 C1, 10.12.2001 . RU 2175013 C2, 20.10.2001. RU 2450049 C2, 10.05.2012

Адрес для переписки:
 107023, Москва, ул. Большая Семеновская, 38,
 Университет машиностроения, ОИПС

(72) Автор(ы):

Бирюков Валентин Васильевич (RU),
 Макеев Павел Петрович (RU),
 Архипов Михаил Юрьевич (RU),
 Мальцевская Надежда Владиславовна (RU),
 Стхновская Лариса Дмитриевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный машиностроительный университет (МАМИ)" (RU)

C2
2550266
RURU
2550266
C2

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области выращивания одноклеточных фотосинтезирующих микроорганизмов. Предложен способ культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов в фотобиореакторе закрытого типа с рабочим объемом, содержащим культуральную жидкость. Способ включает подачу газовой смеси, содержащей углекислый газ, в рабочий объем фотобиореактора, осуществление освещения культуральной жидкости от источника искусственного света и ее перемешивание. Перед началом процесса культивирования в рабочий объем фотобиореактора в культуральную

жидкость вносят гранулы люминофора с длительным послесвечением в количестве 10-30% от объема культуральной жидкости. Гранулы люминофора снабжены прозрачной наружной оболочкой из химически и биологически инертного материала. При непрерывном или периодическом отборе культуральной жидкости из рабочего объема фотобиореактора отделяют гранулы люминофора с помощью сетчатого фильтра. Изобретение обеспечивает снижение энергетических затрат на процесс культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов и увеличение производительности процесса. 1 табл., 2 пр.



(51) Int. Cl.
C12N 1/12 (2006.01)
C12M 1/02 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)
A01G 33/00 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2013142620/10, 19.09.2013

(24) Effective date for property rights:
19.09.2013

Priority:

(22) Date of filing: 19.09.2013

(43) Application published: 27.03.2015 Bull. № 9

(45) Date of publication: 10.05.2015 Bull. № 13

Mail address:

107023, Moskva, ul. Bol'shaja Semenovskaja, 38,
Universitet mashinostroenija, OIPS

(72) Inventor(s):

Birjukov Valentin Vasil'evich (RU),
Makeev Pavel Petrovich (RU),
Arkhipov Mikhail Jur'evich (RU),
Mal'tsevskaja Nadezhda Vladislavovna (RU),
Stekhnovskaja Larisa Dmitrievna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovaniya "Moskovskij
gosudarstvennyj mashinostroitel'nyj universitet
(MAMI)" (RU)

(54) CULTIVATION METHOD OF PHOTOSYNTHESISING MICROORGANISMS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention proposes a cultivation method of photosynthesising microorganisms in a photobioreactor of a closed type with a working volume containing culture liquid. The method involves supply of a gas mixture containing carbon dioxide to the working volume of the photobioreactor, lighting of culture liquid from a source of artificial light and its mixing. Before the beginning of the cultivation process to the working volume of the photobioreactor to the culture liquid there added are granules of fluorescent dye with continuous afterglow in the amount of 10-30%

of the culture liquid volume. Granules of fluorescent dye are provided with a transparent external cover from chemically and biologically inert material. At continuous or periodic sampling of the culture liquid from the working volume of the photobioreactor the granules of fluorescent dye are separated by means of a mesh filter.

EFFECT: reduction of energy consumption for a cultivation process of photosynthesising microorganisms and increase of efficiency of the process.

1 tbl, 2 ex

RU 2 550 266 C2

RU 2 550 266 C2

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способам для выращивания одноклеточных фотосинтезирующих микроорганизмов, и может найти применение в биотехнологии для непрерывного получения биомассы для последующего производства биотоплива и других полезных продуктов.

5 Биомасса - не только возобновляемый и почти даровой источник энергии, но и альтернатива запасам полезных ископаемых, которые оканчиваются. Причем применение микроорганизмов для получения топлива является экологически чистым путем в отличие от добычи и переработки нефти. Источником углеводородов также могут служить микроводоросли.

10 Урожайность фотосинтезирующих микроорганизмов (микроводорослей) по биомассе и количеству масла существенно превосходит традиционные высшие растения. Поэтому они и подходят для производства «биотоплива». Они являются автотрофами по питанию (синтезируют из неорганических соединений органическое вещество), поэтому для их выращивания нужны свет, вода, углекислый газ и небольшое количество минеральных 15 солей.

Известны способы культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов, которые проводят в природных условиях, используя, в основном, естественное освещение, (например, заявка RU №2010129376, 2012 г.; патент RU №2471863, 2013 г.).

Недостатком процесса культивирования при естественном освещении является то, 20 что средняя продуктивность микроводорослей при их массовом культивировании в 4-7 раз ниже, чем в аппаратах при искусственно создаваемом освещении, а также зависимость процесса культивирования от погодных и климатических условий.

Более перспективными для промышленного производства биотоплива третьего поколения являются способы культивирования микроорганизмов в фотобиореакторах 25 закрытого типа, в которых используется искусственное освещение.

В связи с этим при культивировании фотосинтезирующих микроорганизмов одной из главных задач является выбор способа освещения процесса культивирования фототрофных микроорганизмов с высоким коэффициентом светоотдачи и низкими энергозатратами. Для закрытого процесса культивирования в биореакторах используют 30 различные искусственные источники освещения

Из уровня техники известны способы культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов в биореакторах закрытого типа с объемом, содержащим культуральную жидкость, в которых предусматривают освещение культуральной жидкости от источника искусственного света и ее перемешивание. Например, в способе 35 по патенту RU №2450049, 2012 г. перемешивание культуральной жидкости осуществляют встряхиванием, а ее освещение - импульсным источником света с использованием набора светоизлучающих диодов, соединенных с регулируемым генератором импульсов. Применение таких генераторов из-за их высокой стоимости удорожает процесс.

В способе по патенту RU №2175013, 2001 г., для культивирования микроводорослей 40 используют свойства люминофоров, способных преобразовывать поглощаемую ими энергию в световое излучение (люминесцировать) в видимой, ультрафиолетовой или инфракрасной зоне. Искусственным источником энергии в нем служит источник проникающих ядерных излучений; источником люминесцентного оптического излучения - радиолюминофор; тепло генерируется в среде источника ядерных излучений. В качестве 45 источника ядерных излучений выбран ядерный реактор, в том числе реактор-размножитель с уран-ториевым циклом.

Недостаток этого аналога заключается в том, что из-за применения в качестве заряжающего устройства для люминофоров ядерного реактора способ культивирования

микроорганизмов является достаточно сложным, опасным для персонала в случае аварийной ситуации и дорогим в аппаратурном оформлении.

В качестве наиболее близкого аналога (прототипа) изобретения определен способ культивирования микроводорослей (RU №2176667, 2001 г.), который предусматривает

5 розлив питательной среды в емкости, инокуляцию суспензии штаммом, освещение культуральной жидкости в процессе роста микроводорослей и поддержание необходимой температуры суспензии. Емкости, представляющие собой сосуды из прозрачного материала, размещают на расстоянии один от другого на поддоне каркаса вокруг источника искусственного света, причем последний устанавливают на каркасе с

10 возможностью вертикального перемещения к поддону. Питательную среду разливают в 20-литровые бутыли по 18 литров в каждую из 6-и емкостей и вводят суспензию штамма *Chlorella vulgaris* ИФР N С-111 в количестве по 2 л до достижения необходимой исходной плотности клеток (3-5 млн/л) в культуре. Затем сосуды устанавливают на поддон каркаса в кольцевой ряд вокруг лампы ДРЛФ-400. При этом в первый день

15 культивирования лампа находится в крайнем верхнем положении, на второй день ее опускают на расстояние 2/3 от поддона и на третий день на 1/3 от поддона, причем в таком же положении лампа остается до окончания процесса культивирования.

Ежесуточное освещение в процессе культивирования микроводорослей составляет 20-22 часа. Температура суспензии хлореллы в бутылях равняется 30°C (нагрев от лампы)

20 при температуре окружающего воздуха 20°C. За 4 дня культивирования в одной установке получают 120 литров суспензии хлореллы. В таком виде суспензию хлореллы используют в качестве кормовой добавки.

Производительность по биомассе в способе культивирования микроводорослей на основе штамма *Chlorella vulgaris* ИФР N С-111 составляет 60 г абсолютно сухого

25 вещества с одного квадратного метра в сутки.

Недостатком прототипа является нерациональное использование светового излучения, т.к. при низкой концентрации биомассы будет не полностью утилизироваться свет, а при увеличении концентрации биомассы будет уменьшаться проницаемость культуральной жидкости светом, следовательно, будет снижаться скорость роста

30 биомассы вследствие нехватки светового излучения, поскольку стандартная глубина освещаемого слоя для фотосинтезирующих микроорганизмов составляет 1-2 см.

Задача, решаемая изобретением, направлена на повышение эффективности способа культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов при наименьших энергетических затратах.

35 Технический результат, получаемый при реализации изобретения, заключается в снижении энергозатрат на процесс культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов и увеличении производительности процесса.

Технический результат достигается тем, что в способе культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов в фотобиореакторе закрытого типа с рабочим

40 объемом, содержащим культуральную жидкость, характеризующемся тем, что в рабочий объем фотобиореактора подают газовую смесь, содержащую углекислый газ, осуществляют освещение культуральной жидкости от источника искусственного света и ее перемешивание, согласно изобретению перед началом процесса культивирования в рабочий объем фотобиореактора, выполненного из прозрачного силикатного стекла,

45 в культуральную жидкость вносят гранулы люминофора с длительным послесвечением в количестве 10-30% от объема культуральной жидкости, гранулы люминофора снабжены прозрачной наружной оболочкой из химически и биологически инертного материала и

при непрерывном или периодическом отборе культуральной жидкости из рабочего объема фотобиореактора отделяют гранулы люминофора с помощью сетчатого фильтра.

Предлагаемая созданная в соответствии с изобретением система освещенности при 5 культивировании фотосинтезирующих микроорганизмов включает новый дополнительный способ подвода света к клеткам растущих микроводорослей за счёт гранул люминофоров с длительным послесвечением, что дает возможность избежать неосвещенных зон рабочего объема фотобиореактора и увеличить КПД осветительных 10 приборов, увеличить объем прокачиваемой жидкости через фотобиореактор за счет возможности увеличения освещаемого слоя.

Т.е. при культивировании фотосинтезирующих микроорганизмов наряду со стационарным источником света в качестве дополнительного источника освещения используется эффект послесвечения гранул люминофора, которые, находясь в объеме культуральной жидкости и свободно перемещаясь под действием потока жидкости, 15 например, при непрерывном способе культивирования, или газа, как в барботажной системе перемешивания, проникают во внутренние более глубокие (более 1-2 см) слои жидкости, отдавая накопленную ими энергию в световое излучение, тем самым увеличивая слой освещаемой жидкости. При этом сами гранулы люминофора заряжаются от искусственного стационарного источника света. Использование данного 20 эффекта послесвечения от гранул люминофора дает возможность уменьшить энергозатраты на применение стандартных, например светодиодных источников света.

При данном способе культивирования за счет оптимизации потребления 25 электрической энергии системой освещения происходит увеличение производительности процесса и снижение энергозатрат минимум на 20%.

Предлагаемый способ культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов в фотобиореакторе с использованием искусственного источника света и дополнительного освещения гранулами люминофора реализуется следующим образом.

В фотобиореактор подают газовую смесь, содержащую углекислый газ, питательную 30 среду, посевной материал микроорганизмов; задают при помощи соответствующих датчиков необходимые в процессе культивирования значения температуры и pH. Перед началом процесса в рабочий объем фотобиореактора в культуральную жидкость вносят гранулы люминофора с послесвечением в количестве 10-30% от объема культуральной 35 жидкости. При периодическом культивировании осуществляется постоянное перемешивание культуральной жидкости, во время которого гранулы люминофора находятся в свободнодвижущемся состоянии; при непрерывном процессе гранулы люминофора перемещаются также за счет в потока культуральной жидкости. Во время 40 процесса происходит подзарядка гранул люминофора за счет стационарного искусственного источника света. При периодическом процессе культивирования при отборе культуральной жидкости на сетчатом фильтре производится отделение гранул люминофоров от культуральной жидкости. После промывки осуществляется возврат 45 гранул в процесс культивирования, которые могут использоваться многократно. В непрерывном процессе культуральная жидкость поступает в рабочий объем фотобиореактора и выходит из него через сетчатые фильтры, установленные на входе и выходе аппарата.

Нижеприведенные примеры реализации способа подтверждают получение заявленного технического результата.

Пример 1.

Для определения возможности снижения энергозатрат на процесс культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов были проведены периодические процессы культивирования с различными вариантами системы освещения культуральной жидкости:

- 5 контроль (постоянное освещение, получаемое от люминесцентных ламп),
 варианты с изменяемым количеством вносимого люминофора (10, 20, 30)% от объема культуральной жидкости с одновременным снижением количества потребляемой энергии,
 10 варианты снижения потребляемой энергии без внесения люминофора в культуральную среду.

Культивирование проводили в культиваторах из прозрачного силикатного стекла на шейкерах, на которых перемешивание и аэрация суспензии микроорганизмов осуществлялась встряхиванием путем возвратно-поступательного перемещения культиваторов. Для культивирования была выбрана культура фотосинтезирующих 15 микроорганизмов *Chlorella* sp. В культиваторы номинальным объемом 250 см³ вносили питательную среду Тамия, содержащую (мг/л): KNO₃ - 5000; KH₂PO₄ - 2500; MgSO₄·7H₂O - 1250; FeSO₄·7H₂O - 30; EDTA - 37; H₃BO₃ - 114; ZnSO₄·7H₂O - 88; CuSO₄·7H₂O - 53; MnCl₂·4H₂O - 14; MoO₃ - 6; Co(NO₃)₂·4H₂O - 5; Ca(NO₃)₂·4H₂O - 177, в количестве 90 см³
 20 и по 10 см³ засевной культуры *Chlorella* sp. и соответствующее количество люминофора голубого свечения марки DLO-7D производства Компании "AcmeLightchel", Челябинск.

Модуль шейкеров был изначально освещен 6 люминесцентными лампами по 18 Вт TL-D 18W / 965 DE LUXE PRO 90 G13. Освещенность исходная составляла 3 кЛк на 25 единицу поверхности. Измерение освещенности производили люксметром «ТКА - ПКМ» (производство НТП-ТКМ, г. Санкт-Петербург) (Комплект 31) с диапазоном измерений от 10 до 200000 лк. Пределы допускаемой основной относительной погрешности $\pm 8\%$. В процессе эксперимента количество ламп, освещавших 30 культиваторы, варьировалось от 3 до 6. Продолжительность выращивания составляла 4 суток.

Результаты эксперимента представлены в таблице.

№ п/п	Количество люминофора, % об.	Потребляемая энергия, Вт ч	Концентрация биомассы, г/л			Средняя производительность, г/сутки	Удельные энергозатраты, кВт/г	
			1	2	3			
35	1	0	108	5,8	5,75	6,0	0,146	17,75
2	0	90	5,4	5,3	5,3	0,13	16,62	
3	0	72	4,4	4,2	3,9	0,104	16,62	
4	0	54	2,4	2,1	2,3	0,057	22,74	
5	10	90	5,9	5,95	5,95	0,148	14,59	
6	20	72	5,85	5,9	5,9	0,147	11,76	
40	7	30	5,5	5,7	5,8	0,142	9,13	

Как видно из таблицы, внесение люминофора в культуральную жидкость в количестве до 30% об. не влияет на процесс культивирования. Снижение потребляемой энергии без внесения гранул люминофора ведет к уменьшению концентрации биомассы в конечном итоге на 60-65%. При этом внесение 10% люминофора дает снижение 45 энергозатрат на 17%, а внесение гранул люминофора в количестве 30%, дает снижение энергозатрат до 50% без падения продуктивности процесса культивирования, что подтверждает заявленный технический результат.

Пример 2.

Проверку периодического способа культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов с внесением гранул люминофора в культуральную жидкость проводили в двух фотобиореакторах эрлифтного типа с непрерывной циркуляцией культуральной жидкости. В опытном варианте был увеличен размер фотобиореактора 5 по ширине в 1,6 раза, т.к. за счет внесения гранул люминофора в культуральную жидкость увеличивается глубина освещаемого слоя жидкости. Также в опытном варианте на входе и выходе из аппарата были установлены сетчатые фильтры для улавливания гранул люминофора. Рабочий объем опытного варианта составил 10 л, рабочий объем контроля - 6 л. Для освещения процесса культивирования в обоих 10 вариантах были установлены световые элементы - светодиоды красные и синие в соотношении 2:1 (Светодиод красный 620-630 нм, 90-100 лм, 3 Вт, If=700 mA, Vf=2.2-2.6 В, угол 120°, кристалл 42×42 mils, производство Тайвань, светодиод синий 460-460 нм, 40-60 лм, 3 Вт, If=700 mA, Vf=3.4-3.8 В, угол 120°, кристалл 45×45 mils, производство Тайвань). В опытном варианте в культуральную жидкость было добавлено 20% от 15 объема культуральной жидкости люминофора голубого свечения марки DLO-7D производства Компании "AcmeLightchel" (Челябинск) из расчета 100 светодиодов мощностью 1 ватт/м², что на 30% ниже количества светодиодов, установленных в контрольном варианте. Для контролирования параметров процессов были установлены датчики pH, температуры, расходомеры. В фотобиореакторах проводили 20 культивирование фотосинтезирующей культуры Chlorella sp, была использована питательная среда Тамия, содержащая (мг/л): KNO₃ - 5000; KH₂PO₄ - 2500; MgSO₄·7H₂O - 1250; FeSO₄·7H₂O - 30; EDTA - 37; H₃BO₃ - 114; ZnSO₄·7H₂O - 88; CuSO₄·7H₂O - 53; MnCl₂·4H₂O - 14; MoO₃ - 6; Co(NO₃)₂·4H₂O - 5; Ca(NO₃)₂·4H₂O - 177.

25 Культивирование проводили при температуре 28±2°C и pH 6,1. Скорость циркуляции составляла 0,6 л/мин, скорость подачи газа составляла - 1 л/мин. Парциальные давления растворенного углекислого газа и кислорода измеряли датчиками фирмы Mettler Toledo и поддерживали на уровне 6%. Определение количества биомассы проводили нефелометрически фотоколориметрированием на приборе КФК-2, длина волны светофильтра 670 нм, толщина кюветы (оптический путь) - 5 мм. Предварительно были построены калибровочные зависимости оптической плотности от концентрации биомассы. Процесс культивирования проводился в течение 4 суток. Концентрация биомассы в контрольном варианте составила 12,5 г/л, в опытном варианте концентрация была 13 г/л, производительность контрольного процесса составила 18,75 г/сутки; 30 производительность в опытном варианте была на 40% выше и составила 32,5 г/сутки. Концентрация биомассы в контрольном и опытном вариантах была на одном уровне, но за счет возможности увеличения рабочего объема фотобиореактора производительность процесса в опытном варианте выше, при том что снижены удельные энергозатраты в 2-2.5 раза. В контроле удельные энергозатраты составили 576 Вт/г, а 35 производительность в опытном варианте была на 40% выше и составила 32,5 г/сутки. Концентрация биомассы в контрольном и опытном вариантах была на одном уровне, но за счет возможности увеличения рабочего объема фотобиореактора производительность процесса в опытном варианте выше, при том что снижены удельные энергозатраты в 2-2.5 раза. В контроле удельные энергозатраты составили 576 Вт/г, а 40 производительность в опытном варианте была на 40% выше и составила 32,5 г/сутки.

Таким образом, в описываемом способе культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов при внесении гранул люминофора в рабочий объем фотобиореактора в культуральную жидкость в количестве 20% от объема культуральной жидкости при уменьшении количества светодиодов на единицу площади на 30% производительность 45 процесса увеличивается на 30-40% по сравнению с контрольным вариантом за счет возможности увеличения просвечиваемого слоя, а следовательно, и протока культуральной жидкости через ферментер и удельные энергозатраты снижаются на 45-55%, что подтверждает преимущества предлагаемого способа.

Данный способ культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов позволяет значительно сократить затраты электроэнергии на освещение при культивировании, увеличить производительность процесса и соответственно снизить стоимость конечного целевого продукта. Технический результат заключается в снижении удельных

5 энергетических затрат на 45-50% и увеличении производительности процесса на 30-40%.

Предлагаемый способ культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов предусматривает использование в качестве источника углерода углерод из газовых выбросов предприятий, сжигающих твердые, жидкые или газообразные углеводороды, в том числе газовых выбросов тепловых электростанций, что обеспечит резкое снижение 10 выбросов углекислого газа и одновременно его подачу в фотобиореактор в концентрациях, оптимальных для роста фотосинтезирующих микроорганизмов.

15 Отходящие газы с электростанций ответственны за более чем 7% выброс углекислого газа в атмосферу Земли. Содержание самого газа в общих воздушных выбросов электростанции составляет 15%, что открывает большие перспективы использования 15 этих выбросов для производства биомассы при одновременном улучшении экологической обстановки.

Формула изобретения

Способ культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов в фотобиореакторе 20 закрытого типа с рабочим объемом, содержащим культуральную жидкость, характеризующийся тем, что в рабочий объем фотобиореактора подают газовую смесь, содержащую углекислый газ, осуществляют освещение культуральной жидкости от источника искусственного света и ее перемешивание, отличающийся тем, что перед началом процесса культивирования в рабочий объем фотобиореактора, выполненного 25 из прозрачного силикатного стекла, в культуральную жидкость вносят гранулы люминофора с длительным послесвечением в количестве 10-30% от объема культуральной жидкости, гранулы люминофора снабжены прозрачной наружной оболочкой из химически и биологически инертного материала и при непрерывном или 30 периодическом отборе культуральной жидкости из рабочего объема фотобиореактора отделяют гранулы люминофора с помощью сетчатого фильтра.

35

40

45