

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11) 2 582 182⁽¹³⁾ C2

(51) МПК
C12N 1/12 (2006.01)
A01G 33/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014138859/10, 25.09.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.09.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.09.2014

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2016 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 20.04.2016 Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: GUILLARD R.R, RUTHER J.H., Studies or marine planktonic diatoms//Canadian journal of microbiology, 1962, vol.8, P. 229-239.
KINGSTON M.B., Growth and motility of the diatom cylindrotheca closterium: implications for commercial application//Journal of the North Carolina Academy of Science, 2009, vol 124, (4), P. 138-142. RU 2176667 C1, 20.12.2001. US 20110020914 A1, 27.01.2011.

Адрес для переписки:
299011, Севастополь, пр. Нахимова, 2, ФГБУН
ИМБИ

(72) Автор(ы):

Железнова Светлана Николаевна (RU),
Геворгиз Руслан Георгиевич (RU),
Рябушко Виталий Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Институт морских биологических исследований им. А.О.Ковалевского РАН" (ФГБУН ИМБИ) (RU)

C2

2 5 8 2 1 8 2

R U

R U
2 5 8 2 1 8 2
C 2

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *Cylindrotheca closterium*

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано при промышленном получении биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*. Способ предусматривает выращивание культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* в течение 7-10 суток в плоскопараллельных культиваторах с рабочей

толщиной слоя 2-5 см при круглосуточном освещении 13,5 клк на модифицированной питательной среде до плотности 5-7 г сухой биомассы на 1 л культуры. Изобретение позволяет повысить выход биомассы культуры микроводоросли. 1 табл., 2 пр., 2 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2014138859/10, 25.09.2014

(24) Effective date for property rights:
25.09.2014

Priority:

(22) Date of filing: 25.09.2014

(43) Application published: 10.04.2016 Bull. № 10

(45) Date of publication: 20.04.2016 Bull. № 11

Mail address:
299011, Sevastopol, pr. Nakhimova, 2, FGBUN IMBI

(72) Inventor(s):

ZHeleznova Svetlana Nikolaevna (RU),
Gevorgiz Ruslan Georgievich (RU),
Rjabushko Vitalij Ivanovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe budzhetnoe
uchrezhdenie nauki "Institut morskikh
biologicheskikh issledovanij im.
A.O.Kovalevskogo RAN" (FGBUN IMBI) (RU)

(54) METHOD OF PRODUCING BIOMASS OF DIATOMACEOUS ALGAE *Cylindrotheca closterium*

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and can be used in industrial production of biomass of diatomaceous algae *Cylindrotheca closterium*. Method involves growing a culture of diatomaceous algae *Cylindrotheca closterium* during 7-10 days in plane-parallel cultivators with working layer thickness 2-5

cm with 24-hour illumination 13.5 klx on modified nutrient medium-density 5-7 g of dry biomass on 1 l of culture.

EFFECT: invention increases output of biomass of microalgae culture.

1 cl, 1 tbl, 2 ex, 2 dwg

C 2

2 5 8 2 1 8 2

R U

R
U

2
5
8
2
1
8
2

C
2

Изобретение относится к биотехнологии микроводорослей и может быть использовано при промышленном получении биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*.

Микроводоросль *C. closterium* является ценным сырьем для получения биологически активных веществ. Она содержит в достаточном количестве полиненасыщенные жирные кислоты (40% от общего содержания жирных кислот) и каротиноиды, что предполагает возможность ее массового культивирования. Содержание фукоксантина в клетках составляет 78% от общего количества каротиноидов (Das et al., 2008; Peng et al., 2011). Известно, что фукоксантин обладает антиоксидантными, antimутогенными и антиканцерогенными свойствами, которые обусловливают его антиокислительное действие (Kotake-Nara et al., 2001; Das et al., 2008). Благодаря этим ценным качествам биомасса *Cylindrotheca closterium* широко применяется в мировой практике в качестве кормовых добавок для двустворчатых моллюсков.

Известен способ (см. Guillard et al., 1963), в котором микроводоросль *C. closterium* культивировали на питательной среде F/2 с содержанием NaNO_3 - 7,5 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{x}2\text{H}_2\text{O}$ - 5 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{SiO}_3\text{x}9\text{H}_2\text{O}$ - 30 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; Na_2EDTA - 4,36 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; $\text{FeSO}_4\text{x}7\text{H}_2\text{O}$ - 3,15 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в колбах объемом 125 мл при освещенности 240 $\text{мк}\cdot\text{моль}\cdot\text{фотон}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ и температуре 27°C в накопительном режиме культивирования (Kingston, 2009). При таких условиях культивирования зафиксирована максимальная плотность культуры $(2,94\pm0,02)\cdot10^6$ клеток на 1 мл.

Известен способ, в котором культуру *C. closterium* выращивали на питательной среде F/2 (Guillard et al., 1963) с содержанием NaNO_3 - 7,5 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{x}2\text{H}_2\text{O}$ - 5 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{SiO}_3\text{x}9\text{H}_2\text{O}$ - 30 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; Na_2EDTA - 4,36 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; $\text{FeSO}_4\text{x}7\text{H}_2\text{O}$ - 3,15 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в колбах объемом 200 мл при различных уровнях освещенности: при высоком уровне - 268 $\text{мк}\cdot\text{моль}\cdot\text{фотон}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ и при низком уровне - 27 $\text{мк}\cdot\text{моль}\cdot\text{фотон}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ и температуре 15°C в накопительном режиме культивирования (Rijstenbil, 2003). При высоком уровне освещения зафиксирована максимальная плотность культуры $(5\pm0,02)\cdot10^5$ клеток на 1 мл.

Наиболее близким к заявляемому по технической сущности является способ выращивания *Cylindrotheca closterium* на питательной среде F (Guillard, Ryther, 1963) с содержанием NaNO_3 - 150 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{x}2\text{H}_2\text{O}$ - 10 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{SiO}_3\text{x}9\text{H}_2\text{O}$ - 60 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; Na_2EDTA - 8,72 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$; $\text{FeSO}_4\text{x}7\text{H}_2\text{O}$ - 6,3 $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в колбах объемом 250 мл при освещенности 180 $\text{мк}\cdot\text{моль}\cdot\text{фотон}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ и температуре 20°C в накопительном режиме культивирования (Affan et al., 2009). При таких условиях культивирования зафиксированы максимальная плотность культуры $(7,2\pm0,02)\cdot10^4$ клеток на 1 мл и выход биомассы 1,6 г сухого вещества на 1 л культуры. Недостаток данного метода заключается в получении небольшого количества биомассы культуры *Cylindrotheca closterium* из-за использования питательной среды F, обедненной биогенными элементами.

В основу изобретения «Способ культивирования диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*» поставлена задача увеличения выхода биомассы культуры микроводоросли путем увеличения скорости роста и накопления биомассы *Cylindrotheca closterium*.

Поставленная задача достигается тем, что культуру диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* выращивают на модифицированной питательной среде (табл.

1). Модификация заключается в увеличении концентрации всех биогенных элементов среды соответственно представлениям о субстрат зависимом росте микроорганизмов в культуре (Тренкеншу, 2010 а, б). Показано, что использование обедненной стандартной питательной среды F для интенсивного культивирования *C. closterium* с целью 5 накопления биомассы нецелесообразно. Но при увеличении концентрации биогенных элементов (см. Фиг. 1) угол наклона накопительной кривой повышается, т.е. 10 продуктивность культуры в начальный момент времени зависит от концентрации биогенных элементов в среде. Максимальное значение плотности культуры ($8 \cdot 10^6$ кл.· мл^{-1}) в стационарной фазе роста, так же, как и продуктивность, прямо пропорционально зависит от концентрации биогенных элементов в среде.

Таблица 1.

Состав модифицированной питательной среды и среды F (Guillard and Ryther, 1963)

15 для накопительного культивирования *Cylindrotheca closterium*

Компонент	Питательная среда F Навеска, $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$	Модифицированная пита- тельная среда. Навеска, $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$	0,06	3,000
	NaNO_3	7,500
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,500
	Na_2EDTA	0,872
	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,63
$\text{NaMoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$1,26 \cdot 10^{-5}$	0,063
	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,1
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,22
	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,1
	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,18

30 Выращивание осуществляется при круглосуточном освещении 13,5 клк в накопительном режиме в культиваторах с рабочей толщиной освещаемого слоя 2 и 5 см. При таких условиях культивирования выход биомассы микроводоросли *C. closterium* 35 составляет 6,98 г сухого вещества на 1 л культуры в культиваторе с рабочей толщиной освещаемого слоя 2 см и 4,94 г сухого вещества на 1 л культуры в культиваторе с рабочей толщиной освещаемого слоя 5 см (см. Фиг. 1 и Фиг. 2).

40 Общим для прототипа (Affan et al., 2009) и заявляемого способа является применение накопительного режима культивирования. Основное отличие от прототипа заключается в том, что в заявлении способе при культивировании используется питательная среда, обогащенная макро и микроэлементами, количественный состав которой авторами был подобран в результате экспериментов.

45 Способ поясняется иллюстрациями. Фиг. 1 - Динамика плотности накопительной культуры *C. closterium* при различной концентрации биогенных элементов в питательной среде, выращенной в культиваторе с рабочей толщиной освещаемого слоя 5 см. Фиг. 2 - Динамика плотности накопительной культуры *C. closterium* при различной концентрации биогенных элементов в питательной среде, выращенной в культиваторе с рабочей толщиной освещаемого слоя 2 см.

Способ культивирования одноклеточной диатомовой водоросли *C. closterium*

реализуется следующим образом.

Для культивирования использовалась диатомовая водоросль *C.closterium*, коллекционное хранение которой осуществлялось на питательной среде F/2 при температуре 20-21°C. Для получения инокулята культуру водоросли в течение 5-7 дней выращивают методом накопительной культуры на среде F, в которой концентрации всех биогенных элементов увеличены в пять раз (5F) при освещении 6 клк. при непрерывном барботаже воздухом (1 л·мин⁻¹·л⁻¹ культуры).

Для засева культиваторов используют активно делящуюся культуру, взятую на линейной стадии роста, когда ее продуктивность максимальна. Суспензию клеток вносят в культиваторы из такого расчета, чтобы начальная плотность культур составляла не менее 0,1-0,2 г сухого вещества на 1 л культуры. Процесс культивирования осуществляют на модифицированной питательной среде (табл. 1).

Пример 1

Для культивирования использовали штамм из коллекции культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ИМБИ им. А.О. Ковалевского РАН.

Для получения инокулята штамм в течение 7 суток выращивали методом накопительной культуры в колбах объемом 1 л при освещении 6 клк на питательной среде F, в которой концентрации всех биогенных элементов увеличены в пять раз (5F). Полученную культуру использовали в качестве инокулята. Культуру переносили в культиваторы плоскопараллельного типа объемом 3 л с рабочей толщиной слоя 5 см, содержащие модифицированную питательную среду (табл. 1), и продолжали выращивать в течение 7 суток при освещении 13,5 клк и непрерывном барботаже воздухом со скоростью 1 л·мин⁻¹·л⁻¹ культуры, и при температуре 20-21°C до плотности 5 г сухой биомассы на 1 л культуры. Выход сухой биомассы в стационарной фазе роста составил 5 г на 1 л культуры.

Пример 2

Для культивирования использовали штамм из коллекции культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ИМБИ им. А.О. Ковалевского РАН.

Для получения инокулята штамм в течение 7 суток выращивали методом накопительной культуры в колбах объемом 1 л при освещении 6 клк на питательной среде F, в которой концентрации всех биогенных элементов увеличены в пять раз (5F). Полученную культуру использовали в качестве инокулята. Культуру переносили в культиваторы плоскопараллельного типа объемом 2 л с рабочей толщиной слоя 2 см, содержащие модифицированную питательную среду (табл. 1), и продолжали выращивать в течение 10 суток при освещении 13,5 клк и непрерывном барботаже воздухом со скоростью 1 л·мин⁻¹·л⁻¹ культуры, и при температуре 20-21°C до плотности 7 г сухой биомассы на 1 л культуры. Выход сухой биомассы в стационарной фазе роста составил 7 г на 1 л культуры.

Таким образом, продуктивность по биомассе в известном способе в 25 раз ниже, чем в предлагаемом способе.

Источники информации

1. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 5. Скорость энергообмена // Экология моря. - 2010 а. - Спец. вып. 80: Биотехнология водорослей. - С. 79-84.

2. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 6. Предельные скорости роста // Экология моря. - 2010 б. - Спец. вып. 80: Биотехнология водорослей. - С. 85-91.

3. Affan A., Heo S.-J., Jeon Y.-J., Lee J.-B. Optimal growth conditions and antioxidative activities of *Cylindrotheca closterium* // *J. Phycol.* - 2009. - 45. - P. 1405-1415.
4. Das, S.K., Hashimoto, T., Kanazawa, K. Growth inhibition of human hepatic carcinoma HepG2 cells by fucoxanthin is associated with down regulation of cyclin D // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2008. - 4. - P. 743-749.
5. Guillard, R.R., Ryther, J.H. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Cran // *Can J. Microbiol.* - 1963. -8. - P. 229-239.

Формула изобретения

10 Способ получения биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*, предусматривающий получение инокулята и культивирование культуры в накопительном режиме на питательной среде F, отличающийся тем, что культуру диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* выращивают в течение 7-10 суток в плоскопараллельных культиваторах с рабочей толщиной слоя 2-5 см и при 15 круглосуточном освещении 13,5 клк на модифицированной питательной среде, имеющей состав, г·л⁻¹:

20	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	3,00
	NaNO ₃	7,50
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,50
	Na ₂ EDTA	0,872
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,63
	NaMoO ₄ ·H ₂ O	0,063
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,10
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22
25	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,1
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,18

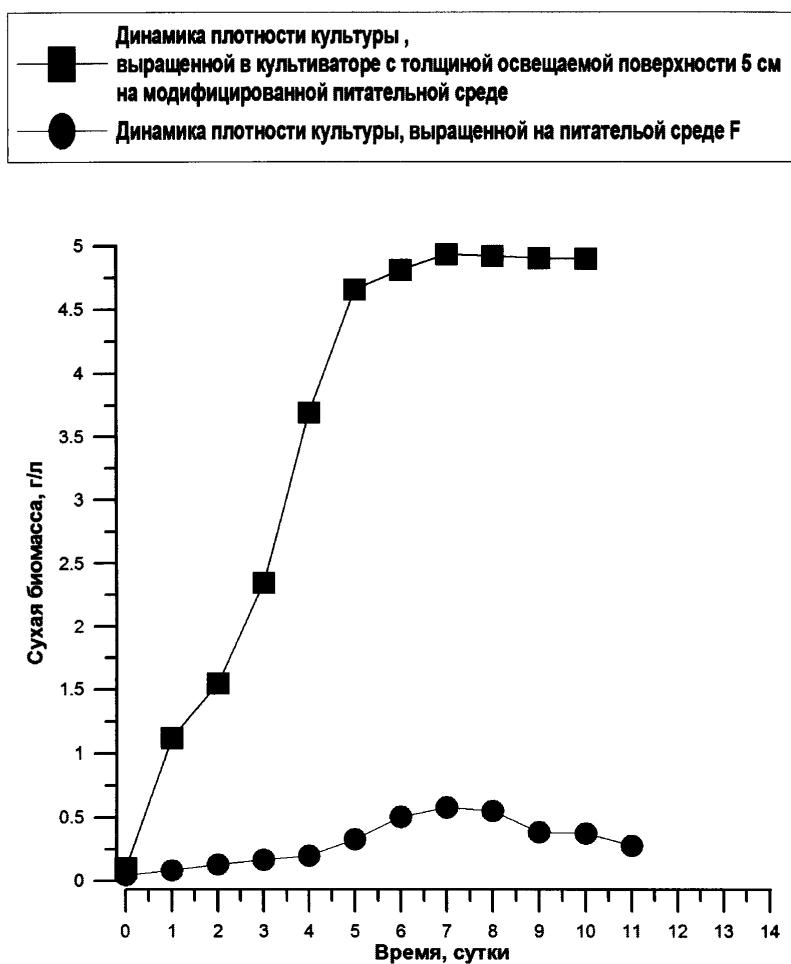
30

35

40

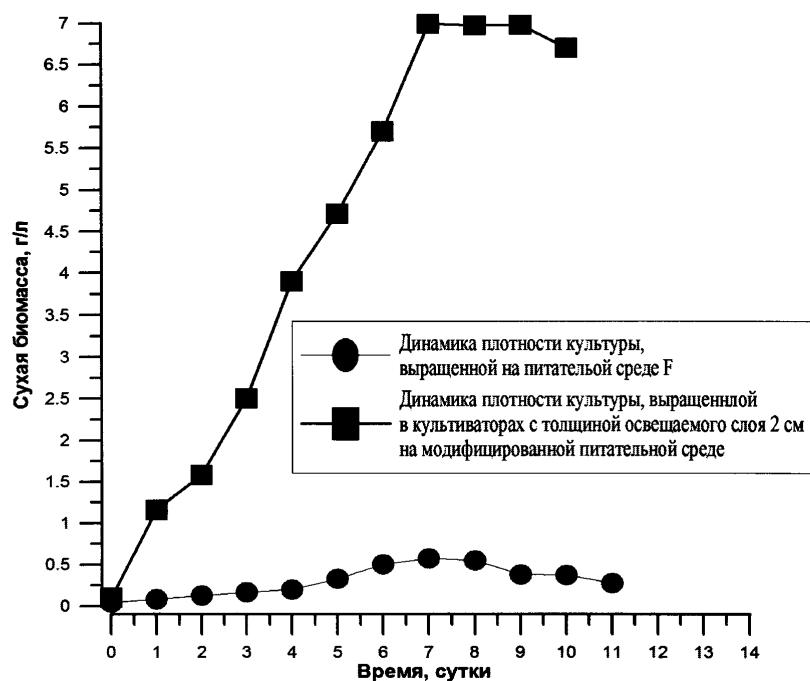
45

Способ получения биомассы
диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*



Фиг. 1

Способ получения биомассы
диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*



Фиг. 2