

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)(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

(19) **RU** (11) **2 582 182** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

*C12N* 1/12 (2006.01)

*A01G* 33/00 (2006.01)

*C12R* 1/89 (2006.01)

(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 bjudzhetnoe  
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

R U 2 5 8 2 1 8 2 C 2

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, антимутогенными и антиканцерогенными свойствами, которые обуславливают 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  $\text{NaNO}_3$  - 7,5 мг·л<sup>-1</sup>;

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  - 5 мг·л<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$  - 30 мг·л<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  - 4,36 мг·л<sup>-1</sup>;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 3,15 мг·л<sup>-1</sup> в колбах объемом 125 мл при освещенности 240 мк·моль·фотон·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> и температуре 27°C в накопительном режиме культивирования (Kingston, 2009). При таких условиях культивирования зафиксирована максимальная плотность культуры  $(2,94 \pm 0,02) \cdot 10^6$  клеток на 1 мл.

Известен способ, в котором культуру *C. closterium* выращивали на питательной среде F/2 (Guillard et al., 1963) с содержанием  $\text{NaNO}_3$  - 7,5 мг·л<sup>-1</sup>;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  - 5 мг·л<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$  - 30 мг·л<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  - 4,36 мг·л<sup>-1</sup>;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 3,15 мг·л<sup>-1</sup> в колбах объемом 200 мл при различных уровнях освещенности: при высоком уровне - 268 мк·моль·фотон·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> и при низком уровне - 27 мк·моль·фотон·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> и температуре 15°C в накопительном режиме культивирования (Rijstenbil, 2003). При высоком уровне освещения зафиксирована максимальная плотность культуры  $(5 \pm 0,02) \cdot 10^5$  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  $\text{NaNO}_3$  - 150 мг·л<sup>-1</sup>;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  - 10 мг·л<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$  - 60 мг·л<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  - 8,72 мг·л<sup>-1</sup>;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 6,3 мг·л<sup>-1</sup> в колбах объемом 250 мл при освещенности 180 мк·моль·фотон·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> и температуре 20°C в накопительном режиме культивирования (Affan et al., 2009). При таких условиях культивирования зафиксированы максимальная плотность культуры  $(7,2 \pm 0,02) \cdot 10^4$  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 накопления биомассы нецелесообразно. Но при увеличении концентрации биогенных элементов (см. Фиг. 1) угол наклона накопительной кривой повышается, т.е. продуктивность культуры в начальный момент времени зависит от концентрации биогенных элементов в среде. Максимальное значение плотности культуры ( $8 \cdot 10^6$  кл. · мл<sup>-1</sup>) 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)

для накопительного культивирования *Cylindrotheca closterium*

Компонент	Питательная среда F Навеска, г·л <sup>-1</sup>	Модифицированная питательная среда. Навеска, г·л <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> × 9H <sub>2</sub> O	0,06	3,000
NaNO <sub>3</sub>	0,15	7,500
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,01	0,500
Na <sub>2</sub> EDTA	0,00872	0,872
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,0063	0,63
NaMoO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	$1,26 \cdot 10^{-5}$	0,063
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	$2 \cdot 10^{-5}$	0,1
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	$4,4 \cdot 10^{-5}$	0,22
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	$2 \cdot 10^{-5}$	0,1
MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	$3,6 \cdot 10^{-5}$	0,18

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* 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).

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

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 *S. 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 ( $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$  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  $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$  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  $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$  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.

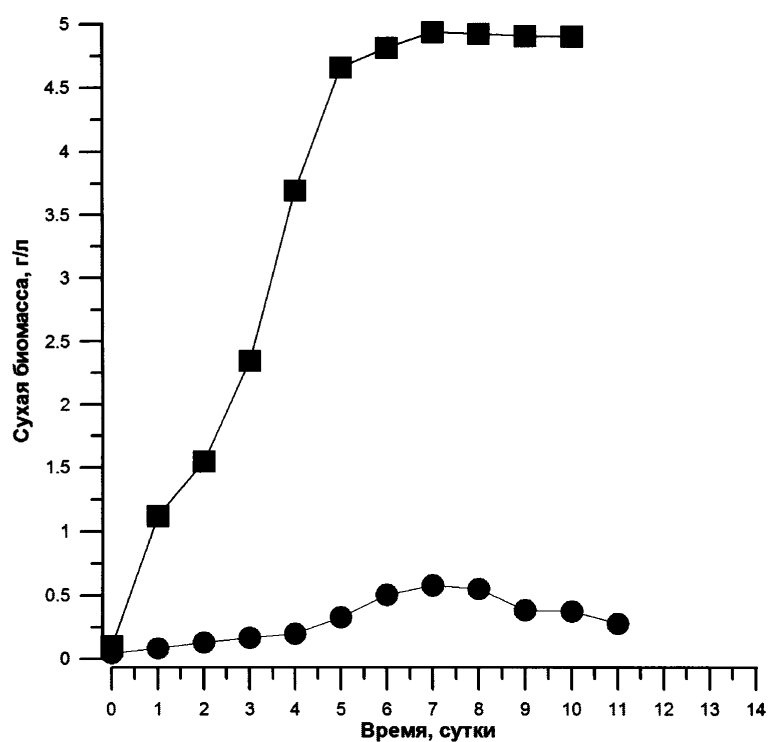
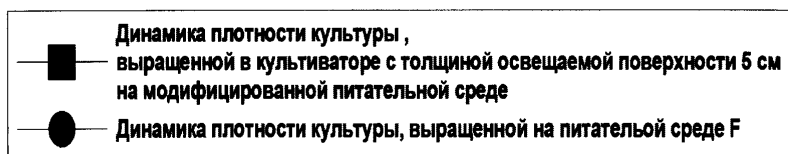
5. Guillard, R.R., Ryther, J.H. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Cran // Can J. Microbiol. - 1963. -8. - P. 229-239.

#### Формула изобретения

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 круглосуточном освещении 13,5 клк на модифицированной питательной среде, имеющей состав, г·л<sup>-1</sup>:

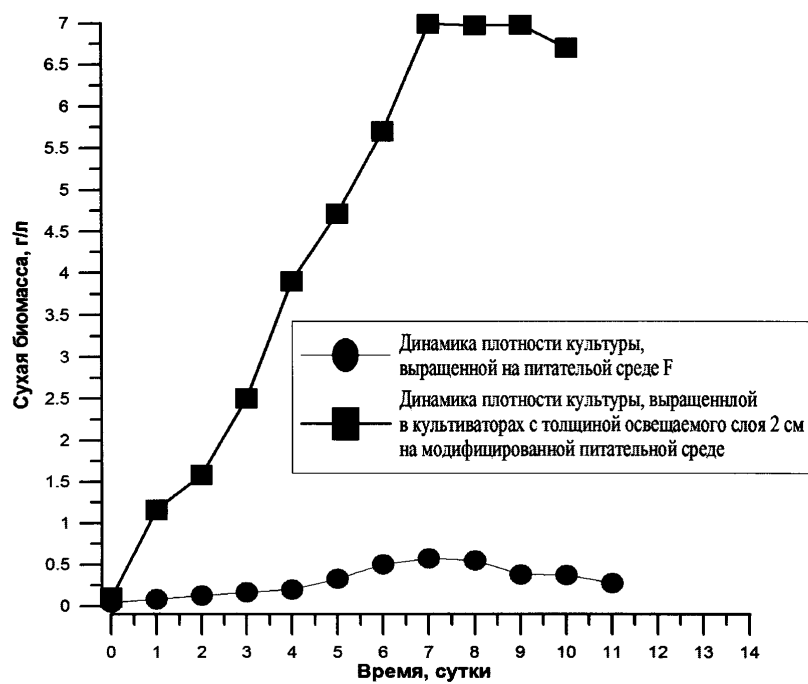
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$	3,00
$\text{NaNO}_3$	7,50
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,50
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	0,872
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,63
$\text{NaMoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,063
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,10
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	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

Способ получения биомассы  
диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*



Фиг. 1

Способ получения биомассы  
диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*



Фиг. 2