



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01G 33/00 (2006.01); C12N 1/12 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016134855, 25.08.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
25.08.2016Дата регистрации:  
24.05.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.08.2016

(43) Дата публикации заявки: 01.03.2018 Бюл. № 7

(45) Опубликовано: 24.05.2018 Бюл. № 15

Адрес для переписки:

299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,  
директору Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки "Институт  
морских биологических исследований имени  
А.О. Ковалевского РАН" д.б.н., проф. С.Б.  
Гулину

(72) Автор(ы):

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

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: PASQUET V. et al. Study on the  
microalgal pigments extraction process:  
Performance of microwave assisted extraction/  
/ Process Biochemistry, 46(2011), p.59-67.  
ERDOGAN A. et al. Fucoxanthin Content of  
Cylindrotheca closterium and Its Oxidative  
Stress Mediated Enhancement // Turkish  
Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 16,  
2016, p.499-506. RU (см. прод.)

(54) Способ получения биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* с повышенным содержанием фукоксантина

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Способ предусматривает накопительный режим культивирования, а именно активно делящуюся культуру диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*, взятую на линейной стадии роста, с начальной плотностью 0,1-0,2 г сухого вещества на 1 л культуры, культивируют в течение 10-12 суток в фотобиореакторах в виде культиваторов плоскопараллельного типа с толщиной освещаемого слоя 5 см, на приготовленной на

основе стерилизованной морской воды модифицированной питательной среде, г·л<sup>-1</sup>, следующего состава: NaNO<sub>3</sub> - 7,50, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>×9H<sub>2</sub>O - 3,00, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O - 0,50, Na<sub>2</sub>EDTA - 0,872, FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0,63, NaMoO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O - 0,063, CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O - 0,1, ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0,22, CoCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O - 0,1, MnCl<sub>2</sub>×4H<sub>2</sub>O - 0,18. Способ позволяет увеличить содержание фукоксантина в биомассе диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*. 3 ил., 1 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

2176667 C1, 10.12.2001. US 20110020914 A1, 27.01.2011.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A01G 33/00* (2006.01); *C12N 1/12* (2006.01)(21)(22) Application: **2016134855, 25.08.2016**(24) Effective date for property rights:  
**25.08.2016**Registration date:  
**24.05.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **25.08.2016**(43) Application published: **01.03.2018** Bull. № 7(45) Date of publication: **24.05.2018** Bull. № 15

Mail address:

299011, g. Sevastopol, pr. Nakhimova, 2, direktoru  
Federalnogo gosudarstvennogo byudzhethnogo  
uchrezhdeniya nauki "Institut morskikh  
biologicheskikh issledovaniy imeni A.O.  
Kovalevskogo RAN" d.b.n., prof. S.B. Gulinu

(72) Inventor(s):

**Ryabushko Vitalij Ivanovich (RU),  
Gevorgiz Ruslan Georgievich (RU),  
Nekhoroshev Mikhail Valentinovich (RU),  
Zheleznova Svetlana Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
uchrezhdenie nauki "Institut morskikh  
biologicheskikh issledovaniy im. A.O.  
Kovalevskogo RAN" (RU)**

(54) **METHOD FOR OBTAINING BIOMASS OF CYLINDROTHECA CLOSTERIUM DIATOM WITH HIGH FUCOXANTHIN CONTENT**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method provides a storage mode of cultivation, namely the actively dividing culture of *Cylindrotheca closterium* diatom, taken at the linear stage of growth, with an initial density of 0.1–0.2 g of dry matter per 1 liter of culture, are cultured for 10–12 days in photobioreactors in the form of cultivators of plane-parallel type with a thickness of the illuminated layer of 5 cm, on a modified nutrient medium prepared on the basis of sterilized sea water, g·l<sup>-1</sup>, with the

following composition: NaNO<sub>3</sub> - 7.50, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>×9H<sub>2</sub>O - 3.00, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O - 0.50, Na<sub>2</sub>EDTA - 0.872, FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0.63, NaMoO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O - 0.063, CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O - 0.1, ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0.22, CoCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O - 0.1, MnCl<sub>2</sub>×4H<sub>2</sub>O - 0.18.

EFFECT: method makes it possible to increase the content of fucoxanthin in the biomass of *Cylindrotheca closterium* diatom.

1 cl, 3 dwg, 1 tbl, 2 ex

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способам получения биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* с высоким содержанием каротиноидного пигмента фукоксантина.

Пигмент фукоксантин, принадлежащий к группе кислородсодержащих каротиноидов ксантофиллов, был экстрагирован из следующих диатомовых водорослей: *Chaetoseros* sp. (Lio et al., 2011 a, b), *Cylindrotheca closterium* (Rijstenbil et al., 2003), *Odontella aurita* (Moreau et al., 2006) и *Phaeodactylum tricornutum* (Nomura et al., 1997).

Микроводоросль *C. closterium* является ценным сырьем для получения биологически активных веществ. Она содержит в достаточном количестве полиненасыщенные жирные кислоты 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).

В недавних исследованиях, в основном японских ученых, показано, что фукоксантин обладает следующими свойствами: снижает избыточный вес, уменьшает уровень глюкозы в крови. Особо следует отметить противоопухолевое действие фукоксантина на клетки лейкоза человека, рака простаты и молочной железы, при низкой токсичности самого препарата (Das et al., 2008; Peng et al., 2011).

Содержание пигмента фукоксантина в диатомовой водоросли *C. closterium* варьирует в широких пределах в зависимости от условий культивирования. Известно, что содержание фукоксантина увеличивается и достигает максимальной величины при переходе диатомовых водорослей в стационарную фазу роста (Moreau et al., 2006). В стационарной фазе роста на фукоксантин приходится более половины всех каротиноидов. Содержание фукоксантина в диатомовых водорослях в стационарной фазе развития значительно выше, чем в экспоненциальной фазе роста по двум причинам: за счет уменьшения концентрации биогенных элементов (азота и фосфора) в среде и уменьшения освещенности в процессе увеличения концентрации клеток (Moreau et al., 2006). В этом случае увеличивается концентрация светособирающих пигментов.

При низкой освещенности наблюдается повышение концентрации фукоксантина, что вызвано эффектом антиокислительной защиты. При слабом освещении наблюдается низкий уровень синтеза активных кислородных комплексов, и, таким образом, слабое действие антиокислительных защитных ферментов (Rijstenbil, 2003).

Известен способ выращивания *C. closterium*, при котором выход фукоксантина на стационарной фазе роста составлял  $1,06 \pm 0,06$  мг пигмента  $\cdot$  см<sup>-3</sup> объема клеток культуры. Культуру микроводоросли по этому способу выращивали на среде F/2 в трубчатых фотобиореакторах объемом 2 л, при температуре 15°C, низком освещении  $27 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  и солености 35‰ (Rijstenbil, 2003).

По данным французских исследователей (Pasqueta et al., 2011) при выращивании *C. closterium* на среде F/2 при pH=7,6 в трубчатых фотобиореакторах объемом 2,2 л, при температуре 21°C и освещении  $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  максимальное содержание фукоксантина составляло  $5,34 \pm 0,06$  мг  $\cdot$  г<sup>-1</sup><sub>сух.</sub>. Экстракцию фукоксантина проводили из леофилизированной биомассы.

В основу изобретения «Способ получения биомассы диатомовой водоросли *C. closterium* с повышенным содержанием фукоксантина» поставлена задача увеличения выхода фукоксантина, содержащегося в биомассе диатомовой водоросли путем создания оптимальных условий культивирования *C. closterium*.

Технический результат: увеличивается содержание фукоксантина в биомассе диатомовой водоросли *C. Closterium*. Технический результат достигается за счет того,

что культура микроводоросли *C. closterium* выращивается в режиме накопительного культивирования в плоских культиваторах с освещаемой поверхностью 0,0425 м<sup>2</sup> и толщиной освещаемого слоя 5 см при круглосуточном освещении 13,5 клк и температуре 20-22°C на модифицированной питательной среде (табл. 1), приготовленной на основе стерилизованной морской воды. Объем культуры составлял 2,35 л. В процессе выращивания культура непрерывно насыщается воздухом с помощью микрокомпрессора со скоростью 0,5 л·мин<sup>-1</sup>.

Таблица 1.

Модифицированная питательная среда,  
приготовленная на основе стерилизованной морской воды,  
для накопительного культивирования диатомовой водоросли  
*Cylindrotheca closterium*

Компонент	Навеска, г·л <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub>	7,50
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> × 9H <sub>2</sub> O	3,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,50
Na <sub>2</sub> EDTA	0,872
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,63
NaMoO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,063
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	0,1
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,22
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,1
MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	0,18

При данных условиях культивирования в конце стационарной фазы роста выход фукоксантина составляет 14,71 мг на 1 г сухой массы или с литра культуры выход фукоксантина составляет 38,76 мг·л<sup>-1</sup>.

Величина выхода фукоксантина микроводоросли *C. closterium* зависит, с одной стороны, от накопления биомассы, с другой стороны, от накопления и содержания фукоксантина в самой клетке. В экспоненциальной фазе роста наблюдается увеличение содержания фукоксантина в культуре, в основном за счет увеличения биомассы микроводоросли, в то время как на стационарной фазе роста при постоянной биомассе наблюдается возрастание содержания фукоксантина за счет синтеза его в самих клетках. Поэтому целесообразно выражать содержание фукоксантина в расчете на литр культуры.

Новизна заключается том, что микроводоросль *C. closterium* выращивают на питательной среде, приготовленной на основе стерилизованной морской воды, с увеличенными концентрациями всех биогенных элементов с использованием фотобиореакторов в виде плоских культиваторов с освещаемой поверхностью 0,0425 м<sup>2</sup> и толщиной освещаемого слоя 5 см. Показано, что выход фукоксантина на стационарной фазе роста повышается и в конце стационарной фазы роста зависит от концентрации биогенных элементов в среде и толщины освещаемого слоя. Таким образом, использование обедненной стандартной питательной среды F/2 для высокого

выхода фукоксантина из культуры *C. closterium* нецелесообразно.

Общим с прототипом является выращивание диатомовой водоросли *C. closterium* в накопительном режиме культивирования. Значения количественных параметров заявляемого способа, режимы и условия культивирования экспериментально

установлены авторами в оптимальных границах достижения технического результата.

Предлагаемое изобретение поясняется иллюстрациями.

Фиг. 1. Динамика накопления фукоксантина в диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* в расчете на сухую биомассу при накопительном режиме культивирования. А - сухая биомасса; Б - концентрация фукоксантина (Пример 1).

Фиг. 2. Динамика накопления фукоксантина в расчете на литр культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* при накопительном режиме культивирования (Пример 1).

Фиг. 3. Динамика накопления фукоксантина в расчете на литр культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* при накопительном режиме культивирования (Пример 2).

Способ получения биомассы диатомовой водоросли *C. closterium* с высоким содержанием фукоксантина реализуется следующим образом. Для культивирования используется диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin из коллекции культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ИМБИ им. А.О. Ковалевского РАН (г. Севастополь), коллекционное хранение которой

осуществлялось на питательной среде F/2 при температуре 20-21°C.

Для получения инокулята культура водоросли в течение 5-7 дней выращивается методом накопительной культуры на среде F (Guillard and Ryther, 1963), но в которой

концентрации всех биогенных элементов увеличены в пять раз (5F), при освещении 6 клк при непрерывном барботаже воздухом (1 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> культуры)

Для засева культиваторов используется активно делящаяся культура, взятая 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 осуществляется на модифицированной питательной среде (табл. 1) в течение 12 сут.

#### Пример 1

Для получения инокулята культуру водоросли *Cylindrotheca closterium* в течение 7 суток выращивали методом накопительной культуры в колбах объемом 1 л при

освещении 6 клк на питательной среде F, в которой концентраций всех биогенных элементов увеличили в пять раз (5F). Полученную культуру использовали в качестве инокулята. Активно делящуюся культуру, взятую на линейной стадии роста, когда ее продуктивность максимальна, переносили в фотобиореакторы в виде плоских культиваторов плоскопараллельного типа объемом 3 л с рабочей толщиной слоя 5 см, содержащие модифицированную питательную среду на стерильной морской воде:

NaNO<sub>3</sub> - 7,50 г·л<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> × 9H<sub>2</sub>O - 3,00 г·л<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O - 0,50 г·л<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>EDTA -

0,872 г·л<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O - 0,63 г·л<sup>-1</sup>, NaMoO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O - 0,063 г·л<sup>-1</sup>, CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O - 0,1 г·л<sup>-1</sup>,

ZnSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O - 0,22 г·л<sup>-1</sup>, CoCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O - 0,1 г·л<sup>-1</sup>, MnCl<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O - 0,18 г·л<sup>-1</sup>. Суспензию

клеток вносили в культиваторы из такого расчета, чтобы начальная плотность культуры

составляла не менее 0,1-0,2 г сухого вещества на 1 л культуры и продолжали выращивать

в течение 10-12 суток при освещении 13,5 клк при непрерывном барботаже воздухом

со скоростью 1 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> культуры и при температуре 20-21°C до плотности 3,18 г

сухой биомассы на 1 л культуры. Выход фукоксантина в биомассе в конце стационарной фазы роста (на девятые сутки культивирования) составил 39,78 мг на 1 л культуры.

Таким образом, выход фукоксантина в предлагаемом способе в 3 раз выше, чем по прототипу.

## 5 Пример 2

Активно делящуюся культуру водоросли *Cylindrotheca closterium*, взятую на линейной стадии роста, когда ее продуктивность максимальна, переносили в культиваторы плоскопараллельного типа объемом 3 л с рабочей толщиной слоя 5 см, содержащие модифицированную питательную среду, приготовленную на основе стерилизованной морской воды:  $\text{NaNO}_3$  - 7,50 г·л<sup>-1</sup>,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$  - 3,00 г·л<sup>-1</sup>,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,50 г·л<sup>-1</sup>,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  - 0,872 г·л<sup>-1</sup>,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,63 г·л<sup>-1</sup>,  $\text{NaMoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  - 0,063 г·л<sup>-1</sup>,  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,1 г·л<sup>-1</sup>,  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,22 г·л<sup>-1</sup>,  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,1 г·л<sup>-1</sup>,  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  - 0,18 г·л<sup>-1</sup>. Суспензию клеток вносили в культиваторы из такого расчета, чтобы начальная плотность культур составляла не менее 0,1-0,2 г сухой массы на 1 л культуры. Выращивали при освещении 13,5 клк и при температуре 20-21°C до плотности 3,4 г сухой биомассы на 1 л культуры. Выход фукоксантина в полученной биомассе в конце стационарной фазы роста составил 37 мг на л культуры, что в 3 раз выше, чем в известном способе.

Источники информации, принятые во внимание

1. 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.
- 25 2. *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.
3. Pasquet V., *Chérouvrier* J.-R., Farhat F., *Thiéry* V., Piot J.-M., *Bérard* J.-B., Kaas R., Serive B., Patrice T., Cadoret J.-P., Picot L. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction // *Process Biochemistry.* - 2011. - 46. - P. 59-67.
- 30 4. Peng J., Yuan J., Wu C., Wang J. Fucoxanthin a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health // *Mar. Drugs.* - 2011. - 9. - P. 1806-1828.
- 35 5. Rijstenbil J.W. Effects of UVB radiation and salt stress on growth, pigments and antioxidative defence of the marine diatom *Cylindrotheca closterium* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* - 2003. - 254. - P. 37-48.
6. Moreau D., Tomasoni C., Jacquot C., Kaas R., Le Guedes R., Cadoret J.P., Muller-Feuga A., Kontiza I., Vagias C., Roussis V., Roussakis C. Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent antiproliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* - 2006. - 22. - P. 97-103.
- 40 7. Nomura T., Kikuchi M., Kubodera A., Kawakami Y Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) // *Biochem. Mol. Biol. Inf.* - 1997. - 42. - P. 361-370.

## 45 (57) Формула изобретения

Способ получения биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* с повышенным содержанием фукоксантина с использованием фотобиореакторов, предусматривающий накопительный режим культивирования, отличающийся тем, что

активно делящуюся культуру диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*, взятую на линейной стадии роста, с начальной плотностью 0,1-0,2 г сухого вещества на 1 л культуры, культивируют в течение 10-12 суток в плоскопараллельных культиваторах с толщиной освещаемого слоя 5 см, на приготовленной на основе стерилизованной морской воды модифицированной питательной среде, г·л<sup>-1</sup>, следующего состава:

5

NaNO <sub>3</sub>	7,50
-------------------	------

10

Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> × 9H <sub>2</sub> O	3,00
--	------

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,50
--	------

Na <sub>2</sub> EDTA	0,872
----------------------	-------

FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,63
---------------------------------------	------

15

NaMoO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,063
---------------------------------------	-------

CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,1
---------------------------------------	-----

ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,22
--	------

CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,1
---------------------------------------	-----

MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	0,18
---------------------------------------	------

20

25

30

35

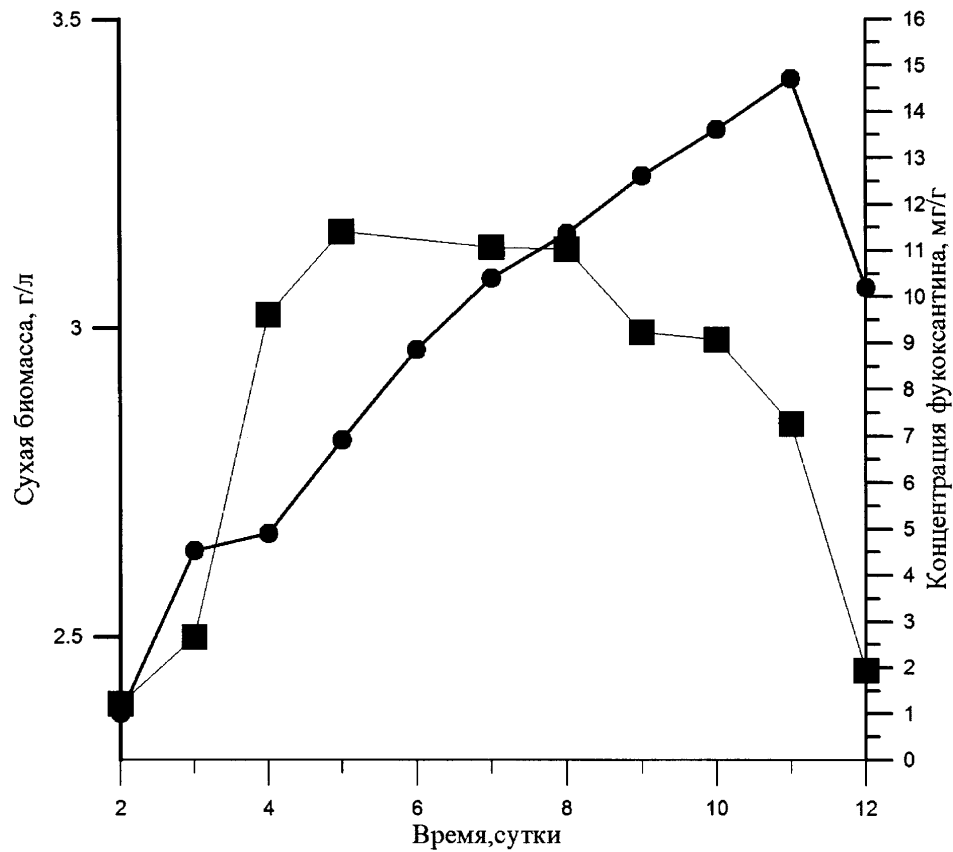
40

45

1

1

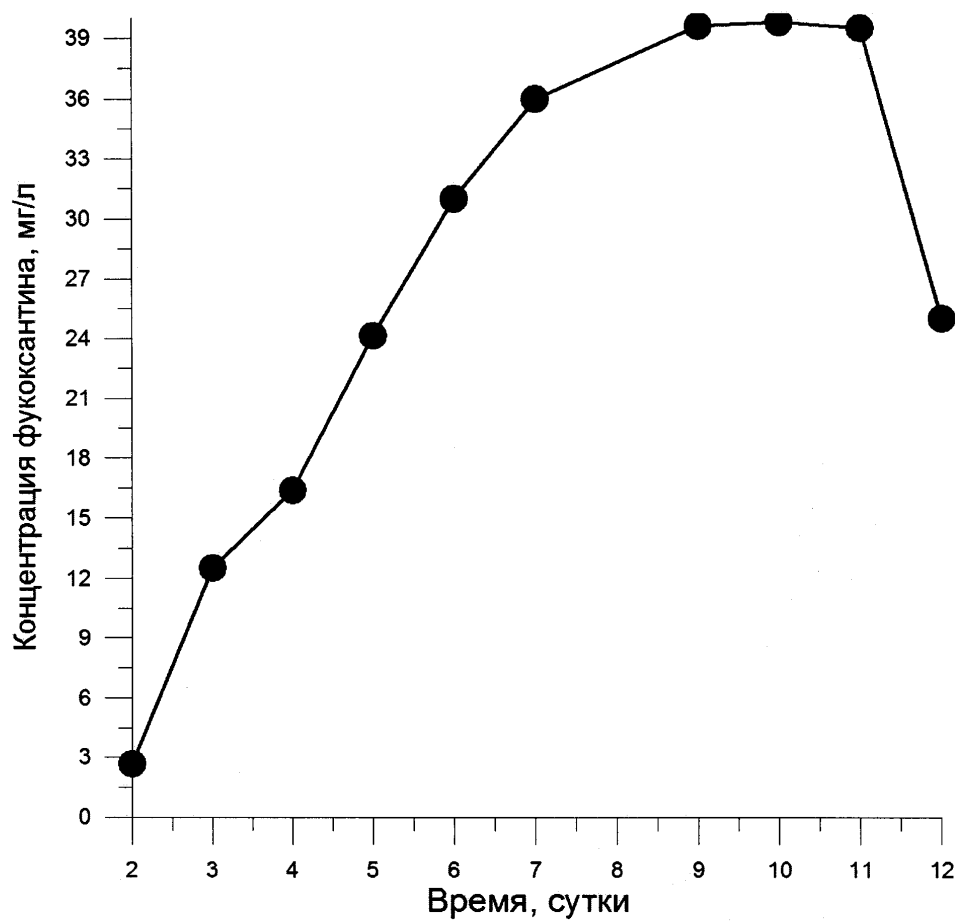
Способ получения биомассы диатомовой водоросли  
*Cylindrotheca closterium* с высоким содержанием фукоксантина



Фиг. 1

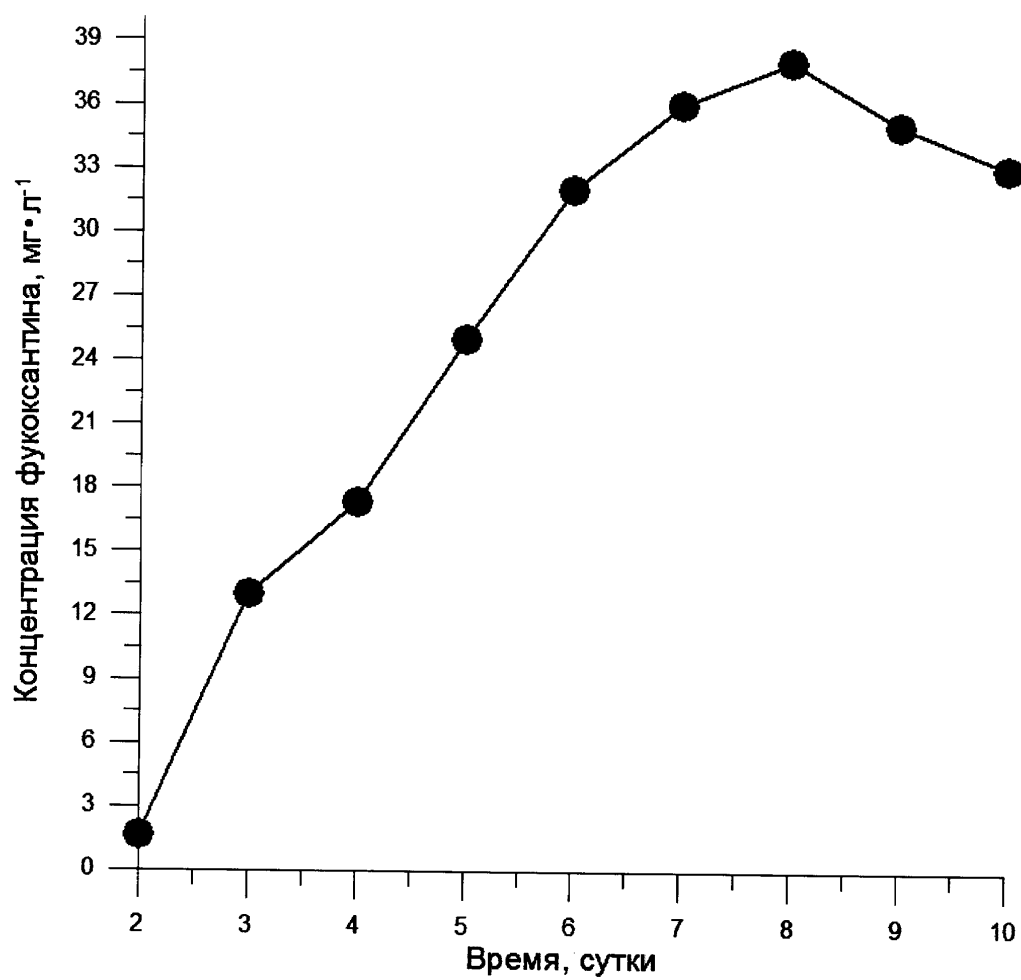
2

Способ получения биомассы диатомовой водоросли  
*Cylindrotheca closterium* с высоким содержанием фукоксантина



Фиг. 2

Способ получения биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* с высоким содержанием фукоксантина



Фиг. 3