



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/12 (2006.01); *C12P 23/00* (2006.01); *C12R 1/89* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017110990, 31.03.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 31.03.2017

Дата регистрации:
 11.07.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.03.2017

(45) Опубликовано: 11.07.2018 Бюл. № 20

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Минюк Галина Семеновна (RU),
 Чубчикова Ирина Николаевна (RU),
 Дробецкая Ирина Викторовна (RU),
 Данцюк Наталья Викторовна (RU),
 Челебиева Элина Сергеевна (RU),
 Сидоров Роман Александрович (RU),
 Соловченко Алексей Евгеньевич (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: МИНЮК Г.С., ЧЕЛЕБИЕВА
 Э.С., ЧУБЧИКОВА И.Н. Особенности
 вторичного каротиногенеза у *Bracteacoccus*
minor (CHLOROPHYTA) в условиях
 двухстадийной культуры., *Algologia*, 2015,
 25 (1), 21-34. МИНЮК Г.С., ЧЕЛЕБИЕВА
 Э.С., ЧУБЧИКОВА И.Н. и др. Влияние pH
 и CO₂ на рост и метаболизм
 микроводоросли *Coelastrella* (*Scotiellopsis*)
tubescens. Физиология (см. прод.)

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ *COELASTRELLA RUBESCENS* ДЛЯ
 ПОЛУЧЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ И ЛИПИДОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии
 микроводорослей и может быть использовано
 для получения каротиноидов и липидов.
 Предложен способ культивирования
 микроводоросли *Coelastrella rubescens* для
 одновременного получения кетокаротиноидов
 группы астаксантина и липидов для производства
 биодизеля. В способе предусмотрено
 культивирование *Coelastrella rubescens* методом
 двухстадийной накопительной культуры на
 питательной среде с соблюдением на I («зеленой»)
 стадии режима освещения 15 ч свет/9 ч темнота.

Перед культивированием на II («красной») стадии
 на среде ВВМ культуру подвергают
 комплексному стресс-воздействию - разведению
 полученной биомассы питательной средой ВВМ,
 редуцированной по азоту и фосфору, и переходят
 на круглосуточный режим освещения. На I
 («зеленой») стадии *C. rubescens* культивируют в
 течение 11 суток на питательной среде МВВМ
 при $n_{\text{нач}}=1.1-1.3 \text{ кл}\cdot\text{мл}^{-1}$ и pH 7, соблюдая условия
 культивирования: $I=140 \mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, $T = 25-26^\circ\text{C}$,

2 6 6 1 0 8 6 С 1
 Р У

2 6 6 1 0 8 6 С 1

скорость продувки воздухом - 1 л·мин⁻¹·л⁻¹. На II («красной») стадии культивирования выполняют 11-кратное разведение культуры, которую затем культивируют в течение 8 суток. Изобретение

обеспечивает: увеличение среднесуточной продуктивности культуры по каротиноидам на 53% и сокращение периода культивирования с 27 до 19 суток. 1 з.п. ф-лы, 3 ил., 3 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

растений, 2016, N 4, с. 601-614. ЧУБЧИКОВА И.Н., МИНЮК Г.С., ДРОБЕЦКАЯ И.В. Вторичный каротиногенез у зеленой микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* vinatz в условиях природных освещенности и температуры, Экология моря, 2010, т.81, с. 77-81. ЧУБЧИКОВА И.Н., МИНЮК Г.С., ДРОБЕЦКАЯ И.В. и др. Оптимизация состава питательной среды для выращивания микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* vinatz (CHLOROPHYCEAE), Ученые записки Таврического национального Университета им. В.И. Вернадского. Серия "Биология, химия", 2013, N 4, Т. 26(65), с. 196-205. RU 2573944 C1, 27.01.2016.



(51) Int. Cl.
C12N 1/12 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12N 1/12 (2006.01); *C12P 23/00* (2006.01); *C12R 1/89* (2006.01)

(21)(22) Application: 2017110990, 31.03.2017

(24) Effective date for property rights:
31.03.2017

Registration date:
11.07.2018

Priority:

(22) Date of filing: 31.03.2017

(45) Date of publication: 11.07.2018 Bull. № 20

Mail address:
299011, g. Sevastopol, pr. Nakhimova, 2, direktoru
Federalnogo gosudarstvennogo byudzhetnogo
uchrezhdeniya nauki "Institut morskikh
biologicheskikh issledovanij im. A.O. Kovalevskogo
RAN" d.b.n. professoru S.B. Gulinu

(72) Inventor(s):

Minyuk Galina Semenovna (RU),
Chubchikova Irina Nikolaevna (RU),
Drobetskaya Irina Viktorovna (RU),
Dantsyuk Nataliya Viktorovna (RU),
Chelebieve Elina Sergeevna (RU),
Sidorov Roman Aleksandrovich (RU),
Solovchenko Aleksej Evgenievich (RU)

(73) Proprietor(s):

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

RU 2661086 C1

(54) METHOD OF CULTIVATION OF MICROALGAE *COELASTRELLA RUBESCENS* FOR PRODUCTION OF CAROTENOIDS AND LIPIDS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to microalgae biotechnology and can be used to obtain carotenoids and lipids. Method of cultivation of microalgae *Coelastrella rubescens* for the simultaneous production of ketocarotenoids of the astaxanthin group and lipids for production of biodiesel. Method provides for culturing *Coelastrella rubescens* method of a two-stage storage culture on a nutrient medium with observance at the I ("green") stage of the illumination regime of 15 h light/9 h dark. Before cultivation on the II ("red") stage on the medium BBM, the culture is subjected to a complex stress action – dilution of the obtained biomass with nutrient medium BBM, reduced in

nitrogen and phosphorus, and switch to a 24-hour lighting mode. At the I ("green") stage *C. rubescens* are cultured for 11 days on the MBBM nutrient medium at $n_{st}=1.1-1.3$ cells·ml⁻¹ and pH 7, observing the conditions of cultivation: $I=140$ mcE·m⁻²·s⁻¹, $T=25-26$ °C, air blowing speed – 1 l·min⁻¹·l⁻¹. At the II ("red") stage of cultivation, 11-fold dilution of the culture is performed, which is then cultivated for 8 days.

EFFECT: invention provides an increase in average daily carotenoid productivity of the culture by 53 % and reduction in cultivation period from 27 to 19 days.

1 cl, 3 dwg, 3 tbl, 1 ex

RU 2661086 C1

Изобретение относится к биотехнологии микроводорослей и может быть использовано при промышленном культивировании зеленой аэрофильной микроводоросли *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens* (Vinatzer) **Kaufnerová & Eliás** (Chlorophyceae, Sphaeropleales, Scenedesmaceae) для одновременного получения кетокаротиноидов группы астаксантина и липидов для производства биодизеля.

5 Зеленая микроводоросль *C. ubescens* (ранее *Scotiellopsis rubescens* Vinatzer) [

10 **Kaufnerová, Eliás, 2013]** относится к группе экстремобионтных одноклеточных эукариот, способных при неблагоприятных условиях внешней среды (голодании, высыхании, высокой освещенности, солености, температуре и др.) переходить из вегетативного состояния в стадию покоя и накапливать в образующихся спорах коммерчески значимое количество (1-2% сухого вещества) специфических защитных кетокаротиноидов (ККар) - продуктов многостадийного ферментативного окисления β-каротина (β-кар) в астаксантин (Act) (далее ККар группы Act) [Lemoine, Schoefs, 2010; Чубчикова и др., 2010; Чубчикова, 2012].

15 В отличие от планктонной микроводоросли *Haematococcus pluvialis*, у которой ККар на 90-95% представлены эфирами Аст, у аэрофильных видов рода *Coelastrella* (*C. striolata* var. *multistriata*, *C. oocystifomis*, *C. sp. F50* и др.) в составе ККар заметную роль играют интермедиаты биосинтеза Аст: адониксантин (Адк), адонирубин (Адр), кантаксантин (Кан), эхиненон (Эх) и др. [Abe et al., 2007; Чубчикова, 2012; Чубчикова и др., 2010; Hu et al., 2013; Iyer et al., 2015]. Все перечисленные ККар проявляют ярко выраженные антиоксидантные и регуляторные свойства (включая способность тормозить рост раковых клеток) [Yuan et al., 2010; Surai, 2012; Maoka et al., 2013. Iyer et al., 2015], вследствие чего широко востребованы в производстве парофармацевтиков, кормов 20 для аквакультуры и птицеводства, функциональных продуктов питания и косметики [Han et al., 2013; Ahmed et al., 2013].

25 Процесс накопления ККар в клетках каротиногенных микроводорослей тесно связан с интенсификацией биосинтеза липидов, служащих средой для депонирования пигментов в цитоплазматических включениях. Содержание липидов в биомассе у *Coelastrella* spp варьирует в широких пределах (25-50% сухой массы) в зависимости от видовых особенностей водорослей и стадий их жизненного цикла [Abe et al., 2007; Hu et al., 2013; Luo et al., 2016; Минюк и др., 2015]. В вегетативных быстро делящихся клетках в составе жирных кислот (ЖК) суммарных липидов преобладают (не менее 50 масс% в сумме) две незаменимые кислоты $C18:2\omega 6$ (линовая) и $C18:3\omega 3$ (α -линоленовая), играющие 30 важную роль в метаболизме человека и животных как предшественники мембранных полиненасыщенных ЖК (арахидоновой, эйкозопентаеновой и докозагексаеновой) и регуляторы деятельности сердечно-сосудистой и иммунной систем [Lunn, Theobald, 2006; Rasmussen et al., 2006; Bentley, 2007]. В клетках с высоким содержанием ККар (зрелые споры) в составе жирных кислот, доминируют насыщенные ($C16:0$ и $C18:0$) и моноеновые 35 кислоты ($C16:1$, $C18:1$) [Abe et al., 2007; Hu et al., 2013; Luo et al., 2016], что делает такие липиды пригодными для производства биодизеля [Islam et al., 2013].

40 Возможность одновременного получения из биомассы *Coelastrella* spp двух или нескольких высоко востребованных рынком продуктов (антиоксидантных ККар группы АСТ, незаменимых ди- и триеновых ЖК и липидов для биодизеля), а также 45 потенциальная возможность их культивирования открытым способом [Hong et al., 2016] определяют перспективность этих видов в качестве объектов промышленной биотехнологии.

Известен способ получения биомассы *Coelastrella rubescens*, состоящей из вегетативных

клеток [Чубчикова и др., 2013], основанный на оптимизации состава питательной среды Болда (ВВМ) [Bold, 1942] по содержанию азота (N) и фосфора (P). Ключевыми критериями для выбора концентраций N и P, адекватных потребностям клеток, служили показатели роста культуры и массовая доля хлорофилла *a* (Хл *a*) и первичных

5 каротиноидов (Кар). Среди 9 вариантов соотношения N и P в среде наилучшие результаты получены на модифицированной среде ВВМ (далее среда МВВМ) следующего состава (г/л): NaNO_3 - 1,34; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,075; NaCl - 0,03; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,04; KH_2PO_4 - 0,1; $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ - 0,05; KOH - 0,03; H_3BO_3 - 0,011; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0094;

10 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,0014; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,0024; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0016; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,0005; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,005; CaCl_2 - 0,019; H_2SO_4 конц. - 1 мкл. Остальные условия

культтивирования были следующими: начальная численность клеток ($n_{\text{нач.}}$) - $1,4\text{-}1,6 \cdot 10^6$

кл. \cdot мл $^{-1}$; Интенсивность ФАР (далее I - количество микромолей (μE) квантов

15 фотосинтетически активной радиации (ФАР) в диапазоне 400-700 нм, падающей на поверхность площадью 1 м 2 за 1 с) - $120 \mu\text{E} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$; фотопериод (далее ФП) - 15 ч свет:

9 час темнота: скорость продувки газо-воздушной смесью (0,2% CO_2) - 0,5 л \cdot мин $^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$;

температура среды (T) - 25-28°C; длительность культивирования (t) - 9 сут. Максимальная

20 удельная скорость роста культуры ($\mu_{\text{макс}}$) составляла 1,4 сут $^{-1}$, средняя удельная скорость

($\mu_{\text{ср.}}$) - 0,54 сут $^{-1}$, содержание Хл *a* и суммарных Кар в биомассе - 1.26 и 1.34% сухого вещества (СВ) соответственно. Возможность одновременного получения Кар и липидов не рассматривалась.

25 Известен способ получения биомассы *Coelastrella rubescens* состоящей из вегетативных клеток, основанный на методе накопительной культуры и стабилизации pH питательной среды МВВМ в диапазоне 5.0-9.5 ед., путем контролируемой подачи в среду газообразного CO_2 [Минюк и др., 2015]. Остальные параметры культивирования были

30 следующие: ($n_{\text{нач.}}$) - $1,1 \cdot 10^6$ кл. \cdot мл $^{-1}$; I - $136 \mu\text{E} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$; ФП - 15 ч свет: 9 час темнота:

скорость продувки культур воздухом - 1 л \cdot мин $^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$; T - 25-26°C; t - 11 сут. Наилучшие

35 результаты получены при поддержании pH среды на уровне 6-8 ед. В этих условиях $\mu_{\text{ср}}$ варьировалась в пределах 0.28-0.31 сут $^{-1}$, средняя продуктивность культур по Кар ($P_{\text{кар}}$)

40 составляла 1.6-2.2 мг \cdot л $^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ при массовой доле хлорофилла *a* (Хл *a*) и суммарных Кар - 4.8-4.9 и 1.3-2.1% СВ. В составе Кар присутствовали только фотосинтетические пигменты. Аст и другие ККар отсутствовали. Содержание суммарных липидов в

культурах на заключительной стадии составляло 337-520 мг \cdot л $^{-1}$ при их массовой доле

45 в сухом веществе 23-43% и средней продуктивности по липидам ($P_{\text{лип}}$) 37-43 мг \cdot л $^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$.

В составе жирных кислот (ЖК) суммарных липидов преобладали незаменимые ди- и

триненасыщенные ЖК - C18:2 ω 6 (20.8-22.9 масс%), C18:3 ω 3 (28,1-30.4 масс%) а также C16:0 (19.8-20.5 масс%). Недостатками обоих способов по отношению к заявляемому

являются отсутствие в получаемой биомассе ККар группы Аст и липидов, пригодных для получения биодизеля.

Наиболее близким к заявляемому является двухстадийный способ получения биомассы *Coelastrella rubescens*, состоящей из покоящихся клеток, обогащенных ККар группы Аст, основанный на результатах оптимизации состава питательной среды для

«красной» стадии с целью увеличения выхода ККар [Чубчикова и др., 2012]. На I «зеленой» стадии продолжительностью 21 сут водоросль выращивали на среде ВВМ 3N при следующих условиях: одностороннее освещение, $I - 60 \mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, ФП - 15 ч свет: 9 ч темнота, продувка воздухом со скоростью $0,3 \text{ л}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$, $T - 22\text{--}24^\circ\text{C}$. $\mu_{\text{макс.}}$ культуры на этой стадии составляла $0,25 \text{ сут}^{-1}$, $\mu_{\text{ср.}}$ - $0,15 \text{ сут}^{-1}$. На II «красной» стадии культуру подвергли комплексному стресс-воздействию для индукции биосинтеза Аст. В стресс-комплекс входили: 15-кратное разведение культуры редуцированной по N, Р и микроэлементам (МЭ) средой ВВМ для создания дефицита элементов питания в среде и увеличения облученности клеток, перевод культуры на круглосуточное двухстороннее освещение ($140 \mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ с каждой стороны) и внесение в среду химических активаторов биосинтеза Аст - ацетата натрия (CH_3COONa) и хлорида натрия (NaCl) до концентрации соответственно 0.05 и 0.2 М. Продолжительность «красной» стадии составляла 6 сут.

Наилучшие результаты получены при использовании на «красной» стадии редуцированной по N и Р среды ВВМ, содержащей: а) $4,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\text{N}$ и $53 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\text{P}$ и б) $4,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\text{N}$ и $5,3 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\text{P}$. Обе среды включали полный набор МЭ по прописи среды ВВМ [Bold, 1942]. При таких условиях $P_{\text{кар}}$ составила $1,7\text{--}1,8 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$, а содержание суммарных Кар в биомассе 0.9-1.1% СВ. В составе Кар идентифицированы (% от суммы): лютеин (5.6-6.0%), β -кар, свободные Аст и Адк (7.0-7.5%), Кан (9.2-12.04%),monoэфиры Адк (11.1-11.6%), monoэфиры Аст (15.5-24.63%), диэфиры Аст (8.6-9.5%). Сумма неидентифицированных фракций составляла 16.8-18.2%.

Недостатками известного способа получения биомассы *C. rubescens* являются: недооценка возможности использования биомассы водоросли для получения других ценных продуктов (незаменимых ЖК, липидов для биодизеля и каротиноидов, отличных по биологической активности от ККар группы Аст); низкая скорость роста водоросли на среде ВВМ 3N на I «зеленой» стадии; частичные потери биомассы (9%) на «красной» стадии в результате отмирания вегетативных клеток при действии CH_3COONa и NaCl ; сравнительно низкая $P_{\text{кар}}$ культуры.

Задачей изобретения Способ культивирования микроводоросли *Coelastrella rubescens* для получения каротиноидов и липидов является создание условий культивирования *Coelastrella rubescens* для увеличения продуктивности культуры по каротиноидам и повышения ценности получаемой биомассы как полифункционального сырья пищевого и технического назначения.

Техническим результатом изобретения является:

- увеличение среднесуточной продуктивности культуры по каротиноидам на 53%) путем повышения средней удельной скорости культуры на I стадии культивирования до $0,35 \text{ сут}^{-1}$ (против $0,15 \text{ сут}^{-1}$ в условиях прототипа) и нивелирования отхода вегетативных клеток, характерного для прототипа при стресс-индукции биосинтеза астаксантина;
- сокращение периода культивирования с 27 до 19 суток;
- сокращение потребления электроэнергии на освещение на 14%;
- обеспечение продуктивности культур по липидам, превышающей в 7.7-10 раз среднюю продуктивность других видов *Coelastrella* [Iyer et al., 2015; Luo et al., 2016];
- возможность одновременного использования биомассы *C. rubescens* как полифункционального сырья для получения каротиноидов с различной биологической

активностью (лютеина и кетокаротиноидов группы астаксантина), незаменимых жирных кислот (линовой и альфа-линовой) и биодизеля, что существенно снизит затраты на производство каждого из продуктов.

Поставленная задача достигается тем, что в Способе культивирования

5 микроводоросли *Coelastrella rubescens* для получения каротиноидов и липидов, включающем культивирование методом двухстадийной накопительной культуры на питательной среде с соблюдением на I («зеленой») стадии фотопериода 15 ч свет/9 ч темнота, с переводом полученной культуры на II («красную») путем разведения полученной биомассы питательной средой ВВМ, редуцированной по азоту и фосфору, 10 с одновременным переходом на круглосуточный режим освещения с интенсивностью ФАР $280 \mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, предусмотрены следующие отличия. На I («зеленой») стадии *C. rubescens* культивируют в течение 11 суток на питательной среде МВВМ при $n_{\text{ нач}}=1.1\cdot 1.3 \text{ кл}\cdot\text{мл}^{-1}$ и постоянном pH 7, поддерживаемом контролируемой подачей газообразного 15 CO_2 в культуру, соблюдая условия культивирования: I - $140 \mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, T - 25-26°C, скорость продувки воздухом - $1 \text{ л}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$. На II («красной») стадии при разведении биомассы в 11 раз до $n_{\text{ нач}}\approx 2.5\times 10^6 \text{ кл}\cdot\text{мл}^{-1}$ водоросли культивируют в течение 8 суток. В состав питательной среды МВВМ (г/л дистиллированной воды) входят: NaNO_3 - 134; 20 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,075; NaCl - 0,03; $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 004; KH_2PO_4 - 0,1; $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ - 0,05; KOH - 0,03; H_3BO_3 - 0,011; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0094; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,0014; $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,0024; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0016; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,0005; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,005; CaCl_2 - 0,019; H_2SO_4 конц - 1 мкл.

25 Для достижения технического результата изобретения культуру водоросли *C. rubescens* выращивают оптимизированным двухстадийным методом в сочетании всех наиболее эффективных приемов по интенсификации роста и метаболизма водоросли, разработанных авторами, и направленных на достижение коммерчески значимого 30 выхода целевых продуктов (каротиноидов и липидов с различными функциональными свойствами).

Заявляемый Способ культивирования микроводоросли *Coelastrella rubescens* для получения каротиноидов и липидов отличается от прототипа следующими параметрами: а) культивированием водоросли на «зеленой» стадии на модифицированной питательной среде МВВМ в режиме pH-стата, создаваемого контролируемой подачей в среду газообразного CO_2 до pH 7; б) увеличением на «зеленой» стадии внешней освещенности культуры в 2.3 раза; в) сокращением продолжительности «зеленой» стадии с 21 до 11 сут; г) использованием более щадящего способа индукции биосинтеза Аст в клетках (без использования химических индукторов биосинтеза Аст), предотвращающим потерю «зеленой» биомассы при переводе культуры на «красную» стадию культивирования; 35 д) использованием дополнительных аналитических методов контроля технико-химических характеристик биомассы (ФЭЖХ и ГЖХ-МС), позволяющих производить ее отбор в наиболее оптимальные сроки.

Сходство с прототипом заключается в использовании общего принципа 40 культивирования каротиногенных микроводорослей - метода двухстадийной накопительной культуры, основанного на стресс-индукции биосинтеза Аст путем сочетания острого дефицита элементов питания и высокой освещенности.

Изобретение поясняется таблицами и иллюстрациями.

Фиг. 1 - Динамика численности клеток *Coelastrella rubescens* на «зеленой» стадии

культивирования;

Фиг. 2 - Динамика численности клеток *Coelastrella rubescens* на «красной» стадии при культивировании заявляемым способом (1) и с применением ацетата натрия (2);

Фиг. 3 - Состав суммарных каротиноидов *Coelastrella rubescens* в конце «зеленой» (а)

и «красной» (б) стадий культивирования: 1 - неоксантин. 2 - виолаксантин. 3 - антераксантин. 4 - лютеин + зеаксантин. 5 - кантаксантин. 6 - изокантаксантин. 7, 10, 12, 13, 16 - моноэфиры астаксантина. 8, 14, 15, 17 - моноэфиры адониксантина. 11 - моноэфиры адониксантина + эхиненон. 18, 19, 21 - диэфиры астаксантина. 20 - α - и β -каротин.

Для реализации предлагаемого способа получения биомассы *C.rubescens* используют штамм *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens* IPPAS H-350 (Vinatzer/Innsbruck V 195 = CCALA 475), который выращивают методом двухстадийной накопительной культуры. На I («зеленой») стадии *C. rubescens* культивируют в режиме pH-стата (pH 7) в условиях, благоприятных для роста и накопления в культуре первичных Кар и незаменимых ЖК (линолевой и α -линоленовой). Полученная в конце «зеленой» стадии биомасса *C. rubescens*, состоящая из метаболически активных делящихся клеток, может быть использована (частично или целиком) как самостоятельное сырье для получения смеси ксантофиллов (лютеина, зеаксантина, неоксантина и β -каротина) и незаменимых ЖК C18:2 ω и C18:3 ω пищевого назначения, а также (частично или целиком) в качестве инокулята для проведения II («красной») стадии культивирования с целью получения ККар группы Аст и технических липидов. В этом случае «зеленую» культуру частично или полностью (в зависимости от требуемых целевых продуктов) подвергают комплексному стресс-воздействию, индуцирующему переход клеток *C. rubescens* в фазу покоя и накопление в них АСТ и триацилглицеринов со специфическим составом ЖК, пригодных для получения биодизеля. Перевод «зеленой» культуры на «красную» стадию осуществляется путем создания острого дефицита азота и фосфора в среде (путем 11-кратного разведения культуры редуцированной по N и P средой ВВМ) и одновременного резкого увеличения освещенности клеток, которое достигается за счет существенного снижения плотности культуры при ее разведении и 2-х кратного увеличения интенсивности ФАР. Пример реализации способа культивирования *C. rubescens* для получения кетокаротиноидов группы астаксантина и липидов для биодизеля.

Пример реализации способа.

Получение инокулята (посевного материала).

Штамм IPPAS H-350 с момента получения из коллекции микроводорослей Института физиологии растений РАН (2006 г) до проведения исследования хранили в лабораторных стеклянных пробирках на агаризованной питательной среде ВВМ (1.5%) при $T=15-16^{\circ}\text{C}$ и $I=40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$ с пересевом каждые 45 суток. Для получения инокулята биомассу с твердой среды ВВМ перенесли в жидкую среду МВВМ и выращивали в течение 7 суток в стеклянных конических колбах объемом 250 мл при естественном рассеянном свете ($I=30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$), $T=20-22^{\circ}\text{C}$ и продувке стерильным воздухом со скоростью $0.3 \text{ л}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$ культуры. Полученную культуру центрифугировали при 800-1000g в течение 5 мин, супернатант удалили, осадок клеток перенесли в колбы объемом 1 л со свежей средой МВВМ и снова культивировали в течение 7 дней при $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$, $T=20-22^{\circ}\text{C}$. Последнюю процедуру повторили дважды. Биомассу, собранную после 2-цикла культивирования при $I=100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$ развели в свежей среде МВВМ и использовали в качестве инокулята для засева экспериментальных колб. Численность клеток в инокуляте составляла $1.44\cdot10^8 \text{ кл}\cdot\text{мл}^{-1}$, в размерной структуре культуры преобладали молодые

мелкие клетки с объемом, равным 30-80 мкм³ (80%).

Проведение «зеленой» стадии.

Инокулят вносили в 3-х повторностях в стеклянные конические колбы объемом 1 л

с таким расчетом, чтобы $n_{\text{нач}}$ во всех колбах составляла около $1.0 \cdot 10^6 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$ при общем объеме культуры 0.45 л (3.8 мл инокулята + 447 мл среды МВВМ). В состав питательной среды входили (г/л дистиллированной воды): NaNO₃ - 1.34; MgSO₄·7H₂O - 0.075; NaCl - 0.03; K₂HPO₄·3H₂O - 004; KH₂PO₄ - 0,1; Na₂-ЭДТА - 0.05; KOH - 0.03; H₃BO₃ - 0.011; ZnSO₄·7H₂O - 0.0094; MnCl₂·4H₂O - 0.0014; Na₂MoO₄·2H₂O - 0.0024; CuSO₄·5H₂O - 0.0016; Co(NO₃)₂·6H₂O - 0.0005; FeSO₄·7H₂O - 0.005; CaCl₂ - 0.019; H₂SO₄конц - 1 мкл. pH среды поддерживали на уровне 7 ед. путем дробной подачи в культуру газообразного CO₂ (по ГОСТ 8050-85), контролируемой цифровым pH-контроллером (Aqua Medic pH 2001C, Германия) и электромагнитным клапаном (Camozzi A7E, Италия). Интенсивность ФАР I составляла $140 \mu\text{E} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, ФП - 15 ч свет/9 ч темнота, T - 25-26°C. Культуры непрерывно продували воздухом со скоростью $0.5 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ при помощи воздушного насоса (Resun ACO-9630, Китай). Продолжительность I стадии составляла 11 суток.

При этих условиях динамика численности клеток *C. rubescens* на «зеленой» стадии имела типичный для накопительной культуры характер (Фиг. 1). Ее ростовые характеристики составляли: $\mu_{\text{макс}}$ - $(1.1 \pm 0.02) \text{ сут}^{-1}$ (что было выше, чем в прототипе в 4.4 раза), $\mu_{\text{ср}}$ - $(0.35 \pm 0.001) \text{ сут}^{-1}$ (что было выше, чем в прототипе в 2.3 раза). Средняя продуктивность культуры по клеткам ($P_{\text{нср}}$) равнялась $(25.2 \pm 0.28) \times 10^5 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, продуктивность по сухому веществу ($P_{\text{СВср}}$) - $112.68 \pm 2.74 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$.

Содержание суммарных Кар в биомассе, собранной на 11-е сутки, достигало $2.1 \pm 0.17\%$ СВ при $P_{\text{кар}}$, равной $2.2 \pm 0.08 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$. В составе Кар доминировали лютеин/зеаксантин (51.9% от суммы), неоксантин (18.1%) и α - и β -каротины (10.6%). Аст и интермедиаты его биосинтеза в биомассе отсутствовали (табл. 1).

Содержание липидов в культуре и биомассе на 11-е сут составляло соответственно $520.38 \pm 16.43 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ и $39.68 \pm 5.43\%$ СВ, средняя $P_{\text{лип}}$ - $47 \pm 3.2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$. В составе жирных кислот преобладали полиненасыщенные кислоты (66.2% от суммы), причем на долю двух высокоценных ЖК C18:2^{Δ9,12} и C18:3^{Δ9,12,15} (эссенциальных предшественников арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой ПНЖК), приходилось 20.8 и 30.4% соответственно (табл. 2).

При необходимости полученная «зеленая» биомасса может быть использована (частично или целиком) как сырье для получения смеси Кар (лютеина, зеаксантина, неоксантина и β -каротина) и незаменимых ЖК пищевого и медицинского назначения.

Проведение «красной» стадии.

Для получения Аст и липидов технического назначения «зеленую» культуру разводили в 11 раз редуцированной средой ВВМ следующего состава (г/л дистиллированной воды): NaNO₃ - 24.1; MgSO₄·7H₂O - 75; NaCl - 25, K₂HPO₄·3H₂O - 7.5; KH₂PO₄ - 17.5; Na₂-ЭДТА - 50; KOH - 31; H₃BO₃ - 11; ZnSO₄·7H₂O - 8.82; MnCl₂·4H₂O - 1.44; Na₂MoO₄·2H₂O - 2.42; CuSO₄·5H₂O - 1.57; Co(NO₃)₂·6H₂O - 0.49; FeSO₄·7H₂O - 4.98; CaCl₂ - 18.9; H₂SO₄ конц. - 1

Для этого 40 мл «зеленой» культуры и 410 мл обедненной по Р и N среды вносили в стеклянные конические колбы объемом 1 л (в 3-х кратной повторности). При этом $n_{\text{нач}}$ на «красной» стадии во всех колбах была сходной и составляла около $2.5 \times 10^6 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$, т.е. снизилась по отношению к концу «зеленой» стадии примерно в 11 раз. Внешнюю освещенность увеличили вдвое (до $280 \mu\text{E} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), что в совокупности со снижением 5 численности клеток обеспечило резкий (примерно 22-кратный) положительный градиент их облученности. Культуру перевели на круглосуточное освещение с продувкой только воздухом со скоростью $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ и поддерживали в накопительном режиме при 10 указанных условиях в течение 8 суток. Использованный прием индукции биосинтеза ККар позволил устраниТЬ характерный для прототипа отход клеток (их число не сократилось, а выросло в 1.56 раза) (Фиг. 2) и увеличить продуктивность культуры по Кар и липидам. При условии использования для проведения «красной» стадии всей 15 «зеленой» биомассы выход суммарных Кар из лита исходной культуры с начальной плотностью $1.1 \times 10^6 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$ (или 0.17 г/л СВ) за 19 суток составил $52.3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, средняя Р_{кар} - $2.75 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ (что в 1.6 раза выше, по сравнению с прототипом), содержание суммарных Кар в биомассе 0.9-1.0% СВ, доля ККар группы Аст в суммарных Кар - 68%, доля всех форм Аст - 26% (табл. 1, Фиг. 3).

Содержание липидов в разбавленной культуре за 8 сут «красной» стадии выросло 20 почти в 12 раз (с 45.9 до $534 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). Средняя Р_{лип} культуры составила $61.73 \pm 4.08 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, что в 7.7-10 раз превысило Р_{лип} у других видов *Coelastrella*, выращивавшихся 25 одностадийным методом [Iyer et al., 2015; Luo et al., 2016]. При расчете на всю «зеленую» культуру, полученную на I стадии, средняя за 19 сут Р_{лип} составила $138.71 \pm 25.34 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ при содержании липидов в конечной биомассе $58.07 \pm 1.35\%$ СВ. По этому признаку 30 С. *rubescens* превосходил близкородственные виды примерно в 2 раза [Abe et al. 2007; Iyer et al., 2015; Luo et al., 2016]. В результате стресса в составе жирных кислот произошли существенные изменения: доля триненасыщенных ЖК (C16:3 $^{\Delta 4,7,10}$ и C18:3 $^{\Delta 9,12,15}$) 35 снизилась примерно в 3 раза при одновременном почти 5-кратном увеличении доли мононенасыщенной олеиновой кислоты (C18:1 $^{\Delta 9}$) (табл. 2). Это, в свою очередь, определило приобретение липидами *C. rubescens* технических характеристик, соответствующих требованиям европейского стандарта на биодизель EN14214 (табл. 3).

Источники информации

1. Минюк Г.С., Челебиева Э.С., Чубчикова И.Н., Данцик Н.В., Дробецкая И.В., Сахонь Е.Г., Чивкунова О.Б., Чеканов К.А., Лобакова Е.С., Сидоров Р.А., Соловченко А.Е. Влияние pH и CO₂ на рост и метаболизм микроводоросли *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens* // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 601-610.
2. Чубчикова И.Н. Влияние состава среды на содержание вторичных каротиноидов у микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* (Chlorophyceae) // Морск. экол. журн. 2012. Т. XI, №4. С. 95-101.
3. Чубчикова И.Н., Минюк Г.С., Дробецкая И.В. Вторичный каротиногенез у зеленой микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. в условиях природной освещенности и температуры // Экология моря. 2010. Вып. 81. С. 77-81.
4. Чубчикова И.Н., Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Данцик Н.В. Оптимизация состава

питательной среды для выращивания микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. (Chlorophyceae) // Ученые записки Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2013. Том 26 (65). №4. С. 196-205.

5. *Abe K., Hattori H., Hirano M.* Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata* // Food Chem. 2007. Vol. 100. pp. 656-661.

6. *Ahmed F., Fanning K., Schuhmann H., Netzel M., Schenk P.M.* Microalgae: a valuable source of natural carotenoids with potential health benefits // Ed. Yamaguchi M. Carotenoids: Food Sources, Production and Health Benefits. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, 2013. 10 P. 143-164.

7. *Bentley G.* The health effects of dietary unsaturated fatty acids // Nutr.Bull. 2007. Vol. 32 (1). P. 82-84.

8. *Bold H.C.* The cultivation of algae // Bot. Rev. - 1942. - 8. - P. 69 - 138.

9. *Han D.X., Li Y.T., Hu Q.* Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and 15 biotechnological implications. Algae, 2013 Vol. 28 (2), P. 131-147.

10. *Hong J.W., Kim O.H., Kim H., Jo S.W., Cho H.W., Yoon H.S.* Mass Cultivation from a Korean Raceway Pond System of Indigenous Microalgae as Potential Biofuel Feedstock // Oil Gas. Res. 2016. Vol. 2: 108. Doi:10.4172/ogr.1000108.

11. *Hu C.-W., Chuang L.T., Yu P.C., Chen C.-N.* Pigment production by thermotolerant 20 microalga *Coelastrella* sp. F50 // Food Chem. 2013. Vol. 138. P. 2071-2078.

12. *Islam M.A., Magnusson M., Brown R.J., Ayoko G.A., Nabi Md. N., Heimann K.* Microalgal species selection for biodiesel production based on fuel properties derived from fatty acid profiles // Energies. 2013. Vol. 6. P. 5676-5702.

13. *Iyer G., Nagle V., Gupte Y.V., Desai S., Iyer M., Moramkar N., Sawant V.* Characterization 25 of High Carotenoid Producing *Coelastrilla oocystiformis* and its Anti-Cancer Potential // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2015. Vol. 4 (10). P. 527-536.

14. *Kaufnerova V., Eliaš M.* The demise of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (Chlorophyta) // Nova Hedwigia. 2013. V. 97. P. 415-428.

15. *Lemoine Y., Schoefs B.* Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a 30 multifunctional response to stress // Photosynth. Res. 2010. Vol. 106. P. 155-177.

16. *Lunn J., Theobald H.E.* The health effects of dietary unsaturated fatty acids // Nutr. Bull. 2006. Vol. 31(3). P. 178-224.

17. *Luo L., He H., Yang C., Wen S., Zeng G., Wu M., Zhou Z., Lou W.* Nutrient removal and 35 lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater // Biores. technol., 2016. Vol. 216. P. 135-141.

18. *Maoka T., Yasui H., Ohmori A., Tokuda H., Suzuki N., Osawa A., Shindo K., Ishibashi T.* Anti-oxidative, anti-tumor-promoting, and anticarcinogenic activities of adonirubin and adonixanthin // J. Oleo Sci. 2013, Vol. 62. P. 181-186.

19. *Rasmussen B.M., Vessby B., Uusitupa M., Berglund L., Pedersen E., Riccardi G., Rivellesse A.A., Tapsell L., Hermansen K.* For KANWU Study Group. Effects of dietary saturated, monounsaturated, and n-3 fatty acids on blood pressure in healthy subjects // Am. j. clin. nutr. 40 2006. Vol. 83(2). P. 221-226.

20. *Surai P.F.* The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry 45 eggs and on embryonic development of the chick. Part 2. // World's Poultry Sci. J. 2012. Vol. 68 P. 717-726.

21. *Yuan J.-P., Peng J., Yin K., Wang J.-H.* Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae // Mol. Nutr. Food Res. 2011. V. 55. P. 150-165.

Способ культивирования микроводоросли *Coelastrella rubescens*
для получения каротиноидов и липидов

5

Таблица 1. Состав суммарных каротиноидов *C. rubescens* в конце «зеленой» и «красной» стадий культивирования (% от суммы)

	Каротиноид	«Зеленая» стадия	«Красная» стадия
10	Неоксантин	18.12 ± 3.46	0.71 ± 0.06
15	Виолаксантин	5.51 ± 0.75	1.24 ± 0.25
20	Антераксантин	2.00 ± 1.53	2.54 ± 0.33
25	Лютейн + зеаксантин	51.91 ± 2.32	11.48 ± 0.78
30	Кантаксантин	—	12.73 ± 0.56
35	Моноэфиры астаксантина	—	18.26 ± 1.03
40	Диэфиры астаксантина	—	7.95 ± 0.85
45	Моноэфиры адониксантина	—	17.98 ± 0.83
	Эхиненон + моноэфиры	—	10.84 ± 0.05
	адониксантина		
	β-каротин + α- каротин	10.62 ± 2.31	13.67 ± 1.29
	Неидентифицированные	10.91 ± 2.11	2.59 ± 0.60
	каротиноиды		
	Фотосинтетические	100 %	32.24 ± 2.39
	каротиноиды		
	Кетокаротиноиды	—	67.76 ± 2.39

Способ культивирования микроводоросли *Coelastrella rubescens*
для получения каротиноидов и липидов

5

Таблица 2. Жирнокислотный состав суммарных липидов *C. rubescens* в конце «зеленой» и «красной» стадий культивирования

	Жирные кислоты	Конец «зеленой» стадии	Конец «красной» стадии
10	C16:0	20.5	14.4
15	C16:1 ^{Δ7}	1.0	2.1
20	C16:1 ^{Δ9}	2.2	0.2
25	C16:2 ^{Δ7,10}	5.5	8.8
30	C16:3 ^{Δ4,7,10}	8.5	3.4
35	C16:4 ^{Δ4,7,10,13}	1.0	—
40	C18:0	0.8	3.2
	C18:1 ^{Δ9}	6.8	32.7
	C18:1 ^{Δ11}	1.4	0.8
	C18:2 ^{Δ9,12}	20.8	21.5
	C18:3 ^{Δ9,12,15}	30.4	10.2
	Насыщенные	22.0	19.9
	Мононенасыщенные	11.6	36.4
	Полиненасыщенные	66.2	43.9
	Диненасыщенные	26.3	30.3
	Триненасыщенные	38.9	13.6
	Индекс ненасыщенности	1.851	1.379

45

Способ культивирования микроводоросли *Coelastrella rubescens*
для получения каротиноидов и липидов

5

Таблица 3. Характеристики биодизеля из липидов *C. rubescens*, рассчитанные по профилю метиловых эфиров ЖК методом [Islam, 2013]

	Показатель	Липиды из «зеленой» биомассы	Липиды из «красной» биомассы	Европейский стандарт EN14214
10	Число омыления, мг KOH/г масла (SN)*	197.71±0.10	194.80±0.27	187-191
15	Йодное число, г I ₂ / 100г масла (IN)*	164.30±1.63	81.10±1.49	максимум 120
20	Цетановое число (CN)*	36.94±0.38	56.07±0.37	минимум 51
25	Стойкость к окислению, 100°C, ч	4.90±0.02	13.15±0.2	минимум 6
30	Индекс длинноцепочечных насыщенных ЖК (LCSF)	2.75±0.13	5.05±0.09	зависит от климатической зоны
	Предельная температура фильтруемости (CFPP), °C	-7.8±0.40	-0.75±0.07	≤5/≤ -20
	Массовая доля метилового эфира C18:3, %	30.4	10.2	≤12

(57) Формула изобретения

1. Способ культивирования микроводоросли *Coelastrella rubescens* для получения каротиноидов и липидов, включающий культивирование методом двухстадийной накопительной культуры на питательной среде с соблюдением на I («зеленой») стадии фотопериода 15 ч свет/9 ч темнота, перевод полученной культуры на II («красную») стадию культивирования путем разведения полученной биомассы редуцированной по азоту и фосфору питательной средой ВВМ с одновременным переходом на круглосуточный режим освещения с интенсивностью ФАР 280 $\mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, отличающийся тем, что на I («зеленой») стадии *C. rubescens* культивируют в течение 11 суток на питательной среде МВВМ при $n_{\text{ нач}}=1.1-1.3 \text{ кл}\cdot\text{мл}^{-1}$ и постоянном pH 7, поддерживаемым контролируемой подачей газообразного CO₂ в культуру, соблюдая условия культивирования: I - 140 $\mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, T - 25-26°C, скорость продувки воздухом - 1 $\text{л}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$; а на II («красной») стадии при разведении биомассы в 11 раз до $n_{\text{ нач}}\approx2.5\times10^6 \text{ кл}\cdot\text{мл}^{-1}$ водоросли культивируют в течение 8 суток.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в состав питательной среды МБВМ (г/л дистиллированной воды) входят: NaNO_3 - 1,34; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,075; NaCl - 0,03; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,04; KH_2PO_4 - 0,1; $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ - 0,05; KOH - 0,03; H_3BO_3 - 0,011; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0094; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,0014; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,0024; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0016; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,0005; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,005; CaCl_2 - 0,019; H_2SO_4 конц - 1 мкл.

10

15

20

25

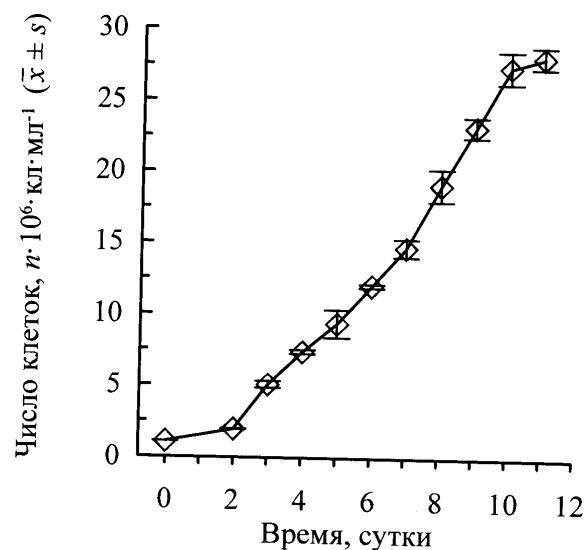
30

35

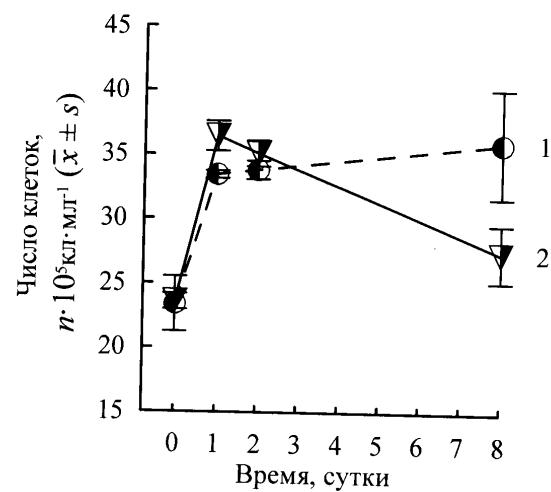
40

45

Способ культивирования микроводоросли *Coelastrella rubescens*
для получения каротиноидов и липидов



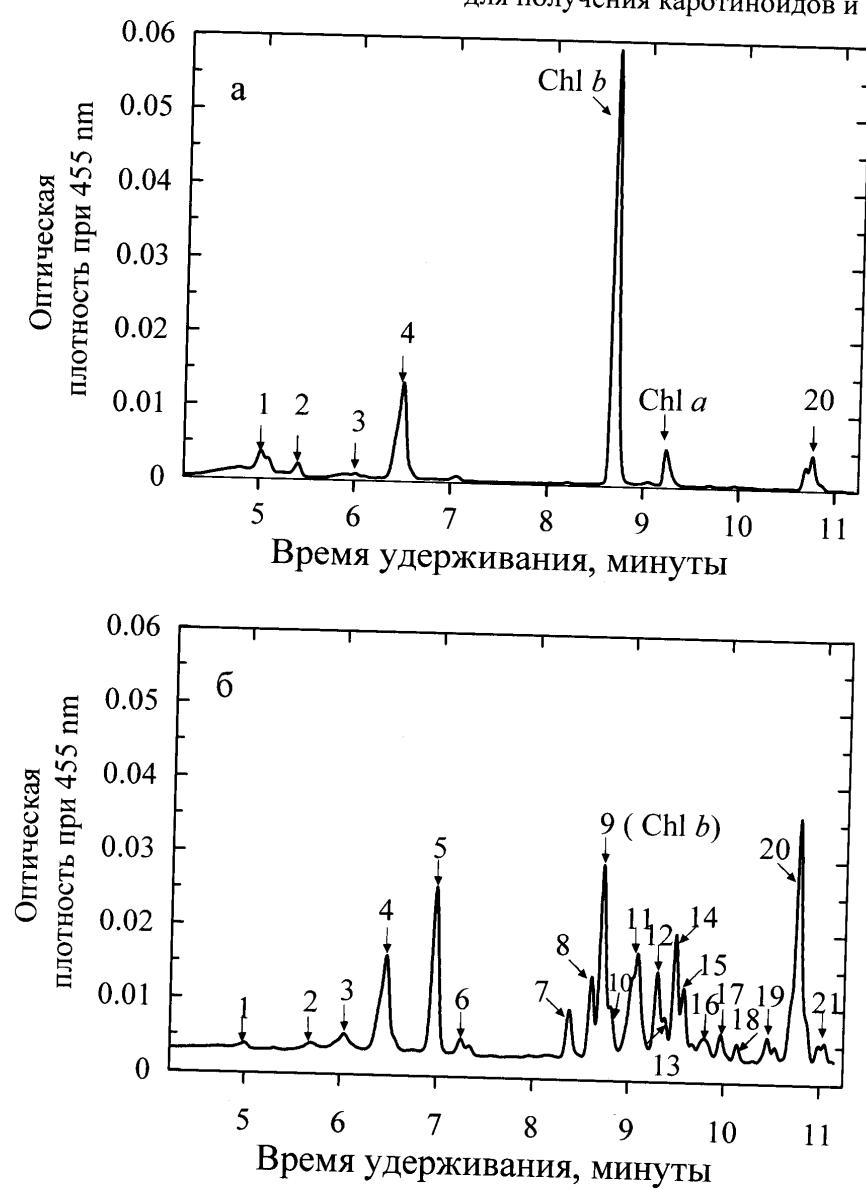
Фиг 1.



Фиг. 2.

Способ культивирования микроводоросли *Coelastrella rubescens*

для получения каротиноидов и липидов



Фиг. 3.