



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 Наталия 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 CO<sub>2</sub> на рост и метаболизм  
микроводоросли *Coelastrella* (*Scotiellopsis*)  
*rubescens*, 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 BBM культуру подвергают комплексному стресс-воздействию - разведению полученной биомассы питательной средой BBM, 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 MBBM при  $n_{нач}=1.1-1.3$  кл·мл<sup>-1</sup> и pH 7, соблюдая условия культивирования: I-140 мЕ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>, T - 25-26°C,

скорость продувки воздухом - 1 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup>. 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.

RU 2 6 6 1 0 8 6 C 1

RU 2 6 6 1 0 8 6 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

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

(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 byudzhethnogo  
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),  
Chelebieva Elina Sergeevna (RU),  
Sidorov Roman Aleksandrovich (RU),  
Solovchenko Aleksej Evgenevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(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<sup>-1</sup> and pH 7, observing the conditions of cultivation: I-140 mcE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, T – 25–26 °C, air blowing speed – 1 l·min<sup>-1</sup>·l<sup>-1</sup>. 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

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

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

**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].

В отличие от планктонной микроводоросли *Haematococcus pluvialis*, у которой ККар на 90-95% представлены эфирами Act, у аэрофильных видов рода *Coelastrella* (*C. striolata* var. *multistricata*, *C. oocystifomis*, *C. sp. F50* и др.) в составе ККар заметную роль играют интермедиаты биосинтеза Act: 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 парафармацевтиков, кормов для аквакультуры и птицеводства, функциональных продуктов питания и косметики [Han et al., 2013; Ahmed et al., 2013].

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 C18:2ω6 (линолевая) и C18:3ω (α-линоленовая), играющие 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 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].

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 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 (BBM) [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 каротиноидов (Кар). Среди 9 вариантов соотношения N и P в среде наилучшие результаты получены на модифицированной среде BBM (далее среда MBBM) следующего состава (г/л):  $\text{NaNO}_3$  - 1,34;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,075;  $\text{NaCl}$  - 0,03;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  - 0,04;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,1;  $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$  - 0,05;  $\text{KOH}$  - 0,03;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 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;  $\text{Co(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,0005;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,005;  $\text{CaCl}_2$  - 0,019;  $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{конц.}}$  - 1 мкл. Остальные условия

культивирования были следующими: начальная численность клеток ( $n_{\text{нач.}}$ ) -  $1,4\text{-}1,6 \cdot 10^6$  кл.мл<sup>-1</sup>; Интенсивность ФАР (далее I - количество микромолей ( $\mu\text{E}$ ) квантов фотосинтетически активной радиации (ФАР) в диапазоне 400-700 нм, падающей на поверхность площадью 1 м<sup>2</sup> 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%  $\text{CO}_2$ ) -  $0,5 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ; температура среды (Т) - 25-28°C; длительность культивирования (t) - 9 сут. Максимальная удельная скорость роста культуры ( $\mu_{\text{макс}}$ ) составляла  $1,4 \text{ сут}^{-1}$ , средняя удельная скорость ( $\mu_{\text{ср.}}$ ) -  $0,54 \text{ сут}^{-1}$ , 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.

Известен способ получения биомассы *Coelastrella rubescens* состоящей из вегетативных клеток, основанный на методе накопительной культуры и стабилизации pH питательной среды MBBM в диапазоне 5,0-9,5 ед., путем контролируемой подачи в среду газообразного  $\text{CO}_2$  [Минюк и др., 2015]. Остальные параметры культивирования были

следующие: ( $n_{\text{нач.}}$ ) -  $1,1 \cdot 10^6$  кл.мл<sup>-1</sup>; I -  $136 \mu\text{E} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ; ФП - 15 ч свет: 9 час темнота: скорость продувки культур воздух -  $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ; Т - 25-26°C; t - 11 сут. Наилучшие результаты получены при поддержании pH среды на уровне 6-8 ед. В этих условиях  $\mu_{\text{ср}}$  варьировала в пределах  $0,28\text{-}0,31 \text{ сут}^{-1}$ , средняя продуктивность культур по Кар ( $P_{\text{кар}}$ )

составляла  $1,6\text{-}2,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$  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  $337\text{-}520 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  при их массовой доле в сухом веществе 23-43% и средней продуктивности по липидам ( $P_{\text{лип}}$ )  $37\text{-}43 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ . В составе жирных кислот (ЖК) суммарных липидов преобладали незаменимые ди- и триненасыщенные ЖК - C18:2 $\omega$ 6 (20,8-22,9 масс%), C18:3 $\omega$ 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 BBM 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  $0,3 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ , Т -  $22-24^\circ\text{C}$ .  $\mu_{\text{макс}}$  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 BBM для создания дефицита элементов питания в среде и увеличения облученности клеток, перевод культур 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 ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) и хлорида натрия ( $\text{NaCl}$ ) 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 BBM, 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 BBM [Bold, 1942]. При таких условиях  $\text{P}_{\text{кар}}$  составила  $1,7-1,8 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ , а содержание суммарных Кар в биомассе 0.9-1.1% СВ. В составе Кар идентифицированы (% от суммы): лютеин (5.6-6.0%),  $\beta$ -кар, свободные Аст и Адк (7.0-7.5%), Кан (9.2-12.04%), моноэфиры Адк (11.1-11.6%), моноэфиры 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 BBM 3N на I «зеленой» стадии; частичные потери биомассы (9%) на «красной» стадии в результате отмирания вегетативных клеток при действии  $\text{CH}_3\text{COONa}$  и  $\text{NaCl}$ ; сравнительно низкая  $\text{P}_{\text{кар}}$  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 (линолевой и альфа-линоленовой) и биодизеля, что существенно снизит затраты на производство каждого из продуктов.

Поставленная задача достигается тем, что в Способе культивирования 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 MBVM, редуцированной по азоту и фосфору, 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 MBVM при  $n_{\text{нач}}=1.1-1.3 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$  и постоянном pH 7, поддерживаемом контролируемой подачей газообразного  $\text{CO}_2$  в культуру, соблюдая условия культивирования: I -  $140 \mu\text{E} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , T -  $25-26^\circ\text{C}$ , 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 MBVM (г/л дистиллированной воды) входят:  $\text{NaNO}_3$  - 134;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,075;  $\text{NaCl}$  - 0,03;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  - 0,004;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,1;  $\text{Na}_2$ -ЭДТА - 0,05; KOH - 0,03;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 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;  $\text{CaCl}_2$  - 0,019;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  конц - 1 мкл.

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 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 MBVM в режиме pH-стата, создаваемого контролируемой подачей в среду газообразного  $\text{CO}_2$  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 потери «зеленой» биомассы при переводе культуры на «красную» стадию культивирования; 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 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 -  $\alpha$  - и  $\beta$ -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 рН-стата (рН 7) в условиях, благоприятных для роста и накопления в культуре первичных Кар и незаменимых ЖК (линолевой и  $\alpha$ -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  $\beta$ -каротина) и незаменимых ЖК C18:2 $\omega$  и C18:3 $\omega$  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 (посевого 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  $I=40 \mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  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 ( $I=30 \mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ),  $T=20-22^{\circ}\text{C}$  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  $100 \mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ,  $T 20-22^{\circ}\text{C}$ .

Последнюю процедуру повторили дважды. Биомассу, собранную после 2-цикла культивирования при  $I=100 \mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  развели в свежей среде МВВМ и использовали в качестве инокулята для засева экспериментальных колб. Численность клеток в инокуляте составляла  $1.44\cdot 10^8 \text{ кл}\cdot\text{мл}^{-1}$ , в размерной структуре культуры преобладали молодые



мелкие клетки с объемом, равным 30-80 мкм<sup>3</sup> (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  $1.0 \cdot 10^6$  кл.·мл<sup>-1</sup> при общем объеме культуры 0.45 л (3.8 мл инокулята + 447 мл среды MBBM). В состав питательной среды входили (г/л дистиллированной воды): NaNO<sub>3</sub> - 1.34; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0.075; NaCl - 0.03; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O - 0.004; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.1; Na<sub>2</sub>-ЭДТА - 0.05; KOH - 0.03; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 0.011; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0.0094; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O - 0.0014; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O - 0.0024; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O - 0.0016; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O - 0.0005; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0.005; CaCl<sub>2</sub> - 0.019; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>конц - 1 мкл. pH среды поддерживали на уровне 7 ед. путем дробной подачи в культуру газообразного CO<sub>2</sub> (по ГОСТ 8050-85), контролируемой цифровым pH-контроллером (Aqua Medic pH 2001C, Германия) и электромагнитным клапаном (CamoZZi A7E, Италия). Интенсивность ФАР I составляла 140 мЕ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>, ФП - 15 ч свет/9 ч темнота, Т - 25-26°C. Культуры непрерывно продували воздухом со скоростью 0.5 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> при помощи воздушного насоса (Resun ASCO-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:  $\mu_{\text{макс}}$  -  $(1.1 \pm 0.02)$  сут<sup>-1</sup> (что было выше, чем в прототипе в 4.4 раза),  $\mu_{\text{ср}}$  -  $(0.35 \pm 0.001)$  сут<sup>-1</sup> (что было выше, чем в прототипе в 2.3 раза). Средняя продуктивность культуры по клеткам ( $P_{\text{нсп}}$ ) равнялась  $(25.2 \pm 0.28) \times 10^5$  кл.·мл<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>, продуктивность по сухому веществу ( $P_{\text{СВср}}$ ) -  $112.68 \pm 2.74$  мг·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>.

Содержание суммарных Кар в биомассе, собранной на 11-е сутки, достигало  $2.1 \pm 0.17\%$  СВ при  $P_{\text{кар}}$  равной  $2.2 \pm 0.08$  мг·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>. В составе Кар доминировали лютеин/зеаксантин (51.9% от суммы), неоксантин (18.1%) и  $\alpha$ - и  $\beta$ -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  $520.38 \pm 16.43$  мг·л<sup>-1</sup> и  $39.68 \pm 5.43\%$  СВ, средняя  $P_{\text{лип}}$  -  $47 \pm 3.2$  мг·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>. В составе жирных кислот преобладали полиненасыщенные кислоты (66.2% от суммы), причем на долю двух высокоценных ЖК C18:2<sup>Δ9,12</sup> и C18:3<sup>Δ9,12,15</sup> (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  $\beta$ -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 BBM следующего состава (г/л дистиллированной воды): NaNO<sub>3</sub> - 24.1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 75; NaCl - 25; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O - 7.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 17.5; Na<sub>2</sub>-ЭДТА - 50; KOH - 31; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 11; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 8.82; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O - 1.44; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O - 2.42; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O - 1.57; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O - 0.49; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 4.98; CaCl<sub>2</sub> - 18.9; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> конц. -

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  $n_{нач}$  на «красной» стадии во всех колбах была сходной и составляла около  $2.5 \times 10^6$  кл·мл<sup>-1</sup>, т.е. снизилась по отношению к концу «зеленой» стадии примерно в 11 раз. Внешнюю освещенность увеличили вдвое (до 280 мкЕ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>), что в совокупности со снижением численности клеток обеспечило резкий (примерно 22-кратный) положительный градиент их облученности. Культуру перевели на круглосуточное освещение с продувкой только воздухом со скоростью 1 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> и поддерживали в накопительном режиме при 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 «зеленой» биомассы выход суммарных Кар из литра исходной культуры с начальной плотностью  $1.1 \times 10^6$  кл·мл<sup>-1</sup> (или 0.17 г/л СВ) за 19 суток составил 52.3 мг·л<sup>-1</sup>, средняя  $R_{кар}$ , - 2.75 мг·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup> (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 почти в 12 раз (с 45.9 до 534 мг·л<sup>-1</sup>). Средняя  $R_{лип}$  культуры составила  $61.73 \pm 4.08$  мг·л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup>, что в 7.7-10 раз превысило  $R_{лип}$  у других видов *Coelastrella*, выращивавшихся одностадийным методом [Iyer et al., 2015; Luo et al., 2016]. При расчете на всю «зеленую» культуру, полученную на I стадии, средняя за 19 сут  $R_{лип}$  составила  $138.71 \pm 25.34$  мг·л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup> при содержании липидов в конечной биомассе  $58.07 \pm 1.35\%$  СВ. По этому признаку *C. 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 ( $C_{16:3}^{\Delta 4,7,10}$  и  $C_{18:3}^{\Delta 9,12,15}$ ) снизилась примерно в 3 раза при одновременном почти 5-кратном увеличении доли мононенасыщенной олеиновой кислоты ( $C_{18:1}^{\Delta 9}$ ) (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., Данцюк 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 CO<sub>2</sub> 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., Данцюк 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 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.
- 10 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. 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.
- 15 9. Han D.X., Li Y.T., Hu Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and 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.
- 20 11. Hu C.-W., Chuang L.T., Yu P.C., Chen C.-N. Pigment production by thermotolerant 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.
- 25 13. Iyer G., Nagle V., Gupte Y.V., Desai S., Iyer M., Moramkar N., Sawant V. Characterization of High Carotenoid Producing *Coelastrella 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.
- 30 15. Lemoine Y., Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a 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.
- 35 17. Luo L., He H., Yang C., Wen S., Zeng G., Wu M., Zhou Z., Lou W. Nutrient removal and 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.
- 40 19. Rasmussen B.M., Vessby B., Uusitupa M., Berglund L., Pedersen E., Riccardi G., Rivellese 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. 2006. Vol. 83(2). P. 221-226.
20. Surai P.F. The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry eggs and on embryonic development of the chick. Part 2. // World's Poultry Sci. J. 2012. Vol. 68 P. 717-726.
- 45 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

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

Каротиноид	«Зеленая» стадия	«Красная» стадия
Неоксантин	$18.12 \pm 3.46$	$0.71 \pm 0.06$
Виолаксантин	$5.51 \pm 0.75$	$1.24 \pm 0.25$
Антераксантин	$2.00 \pm 1.53$	$2.54 \pm 0.33$
Лютеин + зеаксантин	$51.91 \pm 2.32$	$11.48 \pm 0.78$
Кантаксантин	—	$12.73 \pm 0.56$
Моноэфиры астаксантина	—	$18.26 \pm 1.03$
Диэфиры астаксантина	—	$7.95 \pm 0.85$
Моноэфиры адониксантина	—	$17.98 \pm 0.83$
Эхиненон + моноэфиры адониксантина	—	$10.84 \pm 0.05$
$\beta$ -каротин + $\alpha$ -каротин	$10.62 \pm 2.31$	$13.67 \pm 1.29$
Неидентифицированные каротиноиды	$10.91 \pm 2.11$	$2.59 \pm 0.60$
Фотосинтетические каротиноиды	100 %	$32.24 \pm 2.39$
Кетокаротиноиды	—	$67.76 \pm 2.39$

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

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

Жирные кислоты	Конец «зеленой» стадии	Конец «красной» стадии
C16:0	20.5	14.4
C16:1 <sup>Δ7</sup>	1.0	2.1
C16:1 <sup>Δ9</sup>	2.2	0.2
C16:2 <sup>Δ7,10</sup>	5.5	8.8
C16:3 <sup>Δ4,7,10</sup>	8.5	3.4
C16:4 <sup>Δ4,7,10,13</sup>	1.0	—
C18:0	0.8	3.2
C18:1 <sup>Δ9</sup>	6.8	32.7
C18:1 <sup>Δ11</sup>	1.4	0.8
C18:2 <sup>Δ9,12</sup>	20.8	21.5
C18:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	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

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

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
Число омыления, мг КОН/г масла (SN)*	197.71±0.10	194.80±0.27	187-191
Йодное число, г I <sub>2</sub> / 100г масла (IN)*	164.30±1.63	81.10±1.49	максимум 120
Цетановое число (CN)*	36.94±0.38	56.07±0.37	минимум 51
Стойкость к окислению, 100°C, ч	4.90±0.02	13.15±0.2	минимум 6
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 MBVM при  $n_{\text{нач}} = 1.1-1.3 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$  и постоянном pH 7, поддерживаемым контролируемой подачей газообразного CO<sub>2</sub> 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 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup>; а 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.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в состав питательной среды МВВМ (г/л дистиллированной воды) входят:  $\text{NaNO}_3$  - 1,34;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,075;  $\text{NaCl}$  - 0,03;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  - 0,004;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,1;  $\text{Na}_2$ -ЭДТА - 0,05;  $\text{KOH}$  - 0,03;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 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;  $\text{CaCl}_2$  - 0,019;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  конц - 1 мкл.

10

15

20

25

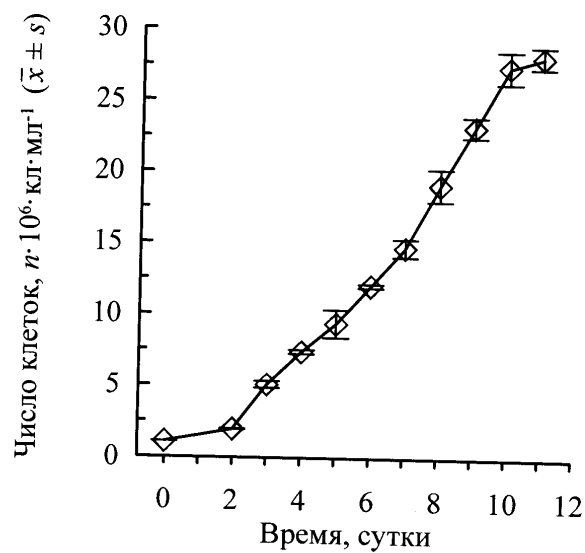
30

35

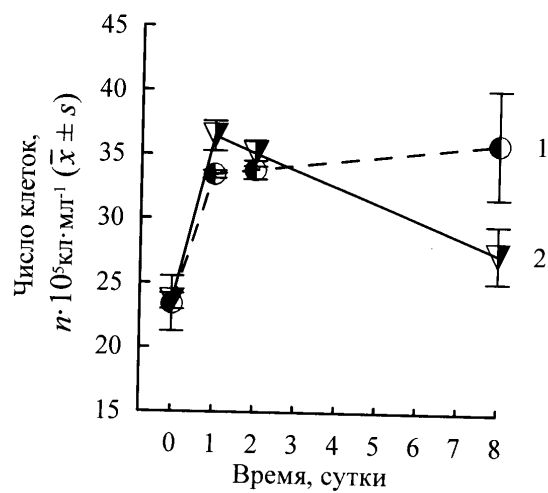
40

45

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



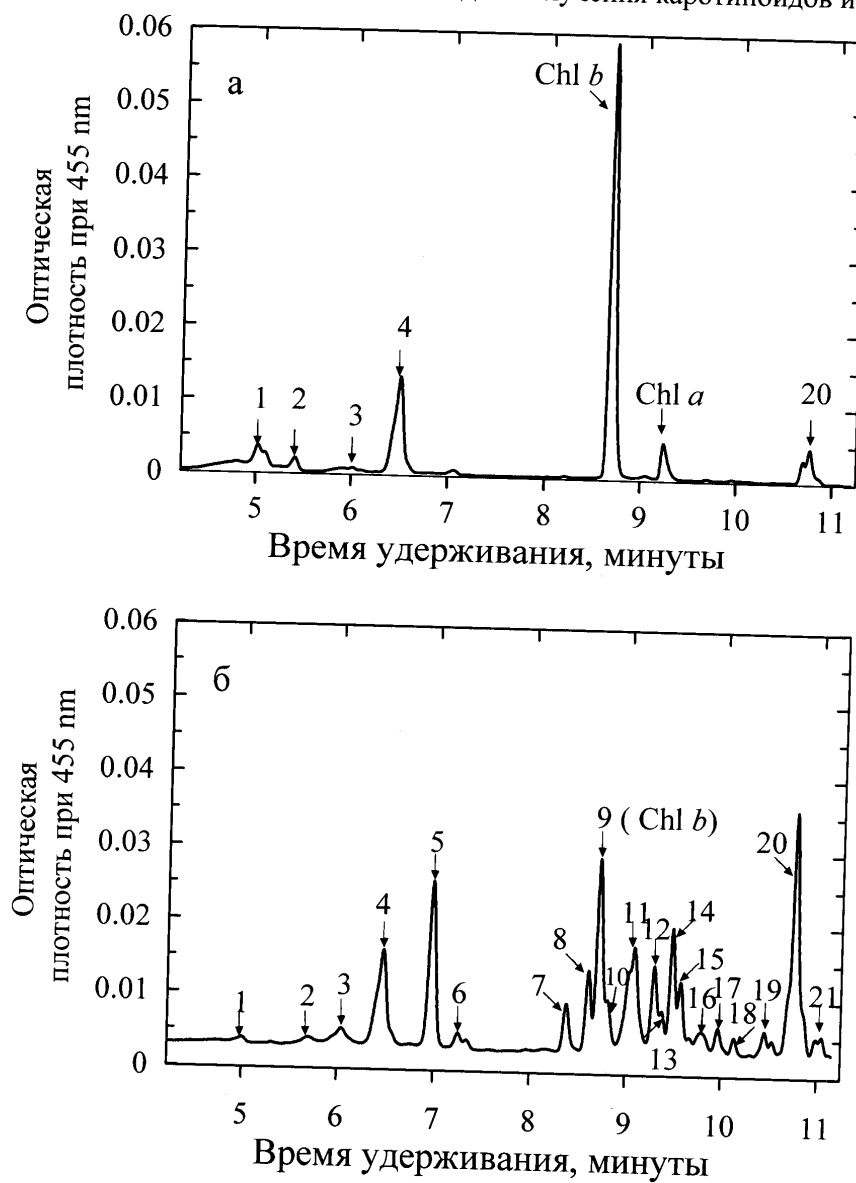
Фиг 1.



Фиг. 2.



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



Фиг. 3.