



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/12 (2013.01); A01H 13/00 (2013.01)

(21) (22) Заявка: 2018104148, 02.02.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.02.2018

Дата регистрации:
23.04.2019

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 02.02.2018

(45) Опубликовано: 23.04.2019 Бюл. № 12

Адрес для переписки:
442731, Пензенская обл., Лунинский р-н, р.п.
Лунино, ул. Саратовская, 9, кв. 1, Богданов
Н.И.

(72) Автор(ы):
Богданов Николай Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Богданов Николай Иванович (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: BY 6970 C1, 30.03.2005. RU 2176667
C1, 10.12.2001. RU 2558300 C2, 27.07.2015. SU
1373728 A1, 13.02.1988. БОГДАНОВ Н.И.,
Суспензия хлореллы в рационе
сельскохозяйственных животных, 2007,
Волгоград, с. 7-15.

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЛАНКТОННОЙ ХЛОРЕЛЛЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности способу культивирования планктонной хлореллы, используемой в качестве корма для сельскохозяйственных животных. Разработан способ культивирования в течение суток в режиме двух световых и одной темновой фазы, при этом температура суспензии выдерживается в пределах от 28 до 30°C. Используется питательная среда, состоящая из минеральных и органических

компонентов. Культивирование проводят в три этапа, которые отличаются по количеству используемых органических компонентов питательной среды. Изобретение позволяет получать продукт, различающийся по содержанию биомассы для дифференцированного использования в качестве корма для сельскохозяйственных животных. 1 табл., 4 пр.

RU 2 685 955 C 1

RU 2 685 955 C 1



FEDERAL SERVICE

FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 1/12 (2013.01); *A01H 13/00* (2013.01)(21) (22) Application: **2018104148, 02.02.2018**(24) Effective date for property rights:
02.02.2018Registration date:
23.04.2019

Priority:

(22) Date of filing: **02.02.2018**(45) Date of publication: **23.04.2019** Bull. № 12

Mail address:

**442731, Penzenskaya obl., Luninskij r-n, r.p.
Lunino, ul. Saratovskaya, 9, kv. 1, Bogdanov N.I.**

(72) Inventor(s):

Bogdanov Nikolaj Ivanovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Bogdanov Nikolaj Ivanovich (RU)(54) **METHOD OF CULTIVATION OF PLANKTON CHLORELLA**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, particularly a method of cultivating plankton chlorella used as fodder for farm animals. Method is developed for culturing during a day in the mode of two light and one dark phase, wherein temperature of the suspension is maintained within 28 to 30 °C. A nutrient medium consisting of mineral and organic components is used.

Cultivation is carried out in three stages, which differ in amount of used organic components of nutrient medium.

EFFECT: invention enables to obtain a product differing in content of biomass for differentiated use as fodder for farm animals.

1 cl, 1 tbl, 4 ex

Область применения

Изобретение относится к биотехнологии, способу культивирования микроводорослей, преимущественно планктонной хлореллы, используемой в качестве корма для сельскохозяйственных животных.

Уровень техники

Известен способ культивирования микроводорослей с использованием целлюлозосодержащего вещества: соломы, камыша, рогоза, линтерной пыли и аэробных целлюлозоразрушающих бактерий *Vibrio vulgaris* с плотностью 1-3 млн/мл (а.с. SU 716541). Недостатки способа: длительный срок культивирования, который составляет шесть суток, и низкий выход биомассы - 0,5 г/л.

Известен способ культивирования микроводорослей на основе штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111, предусматривающий разлив питательной среды в емкости, инокуляцию суспензии штаммом, освещением культуральной емкости в процессе роста микроводорослей и поддержание необходимой температуры суспензии (патент RU 2176667). Недостатки способа: сравнительно длительный период культивирования, который составляет четверо суток, и продолжительное ежесуточное освещение, равное 20-22 часам.

Известен способ культивирования хлореллы на питательной среде, содержащей минеральные соли и жидкие отходы, образующиеся при варке и бланшировании картофеля на картофелеперерабатывающих предприятиях. Такой способ позволяет получить суспензию хлореллы с численностью 193,75 млн клеток/мл и сухой биомассой 4,52 г/л (а.с. SU 1373728). Недостаток способа заключается в трудоемкости приготовления питательной среды, что связано с трехкратной дробной стерилизацией в автоклаве.

Наиболее близким аналогом предлагаемого изобретения (прототип) является способ культивирования хлореллы на питательной среде, содержащей марганцовокислый калий, хлористый кобальт и зерно-картофельную барду, которая образуется при производстве спирта. Готовую питательную среду стерилизуют в течение 30 минут. В период светового выращивания водорослей культуру перемешивают воздухом (патент ВУ 6970). Недостаток способа: необходимость стерилизации питательной среды и барботирования культуры воздухом в светлый период выращивания.

Раскрытие изобретения

Цель данного изобретения состоит в разработке способа культивирования планктонной хлореллы с возможностью получения продукции, различающейся по содержанию биомассы для дифференцированного использования в качестве корма различным возрастным группам и категориям животных.

Техническим результатом настоящего изобретения является продукция, различающаяся по биомассе, получаемая за суточный период культивирования в режиме двух световых и одной темновой фазы фотосинтеза с использованием питательной среды из минеральных и органических компонентов.

Описание изобретения

Готовят питательную среду (1) на один литр водопроводной воды при следующем соотношении компонентов:

- минеральных

1. Аммиачная селитра 0,4 г;
2. Аммофос, 15% раствор 0,2 мл;
3. Железо хлорид, 1% раствор 0,15 мл;
4. Кобальт азотнокислый, 0,01% раствор 0,5 мл;

5. Медь сернокислая, 0,01% раствор 0,5 мл;

6. Магний сернокислый 0,3 г;

7. Калий сернокислый, 12% раствор 0,5 мл;

- органических

5 1. Фильтрат настоя голозерного овса (рН 3,5-5,0),
этап культивирования: I - 35,0 мл; II - 50,0 мл; III - 60,0 мл;

2. Фугат зерновой послеспиртовой барды (рН 4,2-4,5),
этап культивирования: I - 50,0 мл; II - 60,0 мл; III - 85,0 мл.

Фильтрат настоя голозерного овса. Зерно голозерного овса в соотношении 1:2

10 заливают минеральной питательной средой. Например, на 1 кг голозерного овса берут два литра минеральной питательной среды. Настаивают в течение одних суток при температуре 28-30°C. По истечении срока жидкую часть отцеживают через сетчатый фильтр и измеряют рН, который должен быть от 3,5 до 5,0. К голозерному овсу после сцеживания доливают минеральную питательную среду в количестве, равном слитой
15 жидкой части. Срок использования голозерного овса для приготовления настоя составляет 1-2 месяца, причем за весь указанный срок рН не должен быть выше 5,0. По истечении срока использованный голозерный овес удаляют и заменяют на новый.

Фугат зерновой послеспиртовой барды. Фугат является отходом спиртового производства. Послеспиртовая барда представлена твердой и жидкой фазами. Жидкая
20 фаза - фугат - прозрачный окрашенный в светло-коричневый цвет фильтрат. Он состоит из водного раствора минеральных и органических веществ (г/л): минеральные соли 1,24-1,52, сырой протеин 8,6-8,8, жиры 0,4-0,6. Химический состав минеральных солей (мг/л): общий азот 283, фосфаты 80, сульфаты 366, хлориды 454, железо общее 68. Органические вещества представлены пептидами, аминокислотами, не утилизируемыми
25 сахарами и органическими кислотами. Фугат имеет рН в пределах 4,2-4,5. Срок хранения фугата до трех лет при температуре от 2 до 7°C.

Приготовленную таким образом питательную среду и исходный посевной материал культуры заливают в стеклянный сосуд в соотношении по 50% каждого и измеряют рН, при необходимости доводят до 7,0. Далее включают освещение лампами ДРИ-250
30 или ДНАТ-250, при этом температуру суспензии выдерживают в пределах 28-30°C. В процессе культивирования используются световой и темновой периоды фотосинтеза, которые состоят из двух световых и одной темновой фазы, при этом каждый световой период составляет 10 часов, а между ними темновая фаза равняется 4 часам. Таким образом, на культивирование затрачивается 24 часа. Последующие этапы
35 культивирования проводятся в таком же режиме освещения.

По предлагаемому способу предусмотрено три этапа культивирования (таблица 1), которые отличаются внесением в питательную среду органических компонентов: на этапе I добавляют 35 мл/л фильтрата голозерного овса (рН 3,5-5,0) и 50 мл/л фугата зернового послеспиртовой барды (рН 4,2-4,7) соответственно, на этапе II - 50 и 60 мл/л
40 и на этапе III - 60 и 85 мл/л соответственно.

Для каждого этапа исходным материалом является суспензия хлореллы, полученная в предыдущем этапе культивирования. После выхода на конечную продукцию любого из этапов для его продолжения используется полученная суспензия. Различающаяся по содержанию биомассы продукция предназначена для дифференцированного
45 использования в качестве корма различным возрастным группам и категориям животных (грамм сухой биомассы в 1 литре суспензии хлореллы):

- птица - 1,5;

- свиньи - 2,0;

- крупный рогатый скот - 2,3.

Культивирование планктонной хлореллы приспособлено к освещению лампами или использованию солнечного света. При использовании солнечного света культивирование ведется так же в две световых и одну темновую фазу. Каждая световая фаза равна по
5 длительности периоду дневного солнечного освещения. Темновая фаза длится с периода наступления темноты до рассвета. Таким образом, при использовании солнечного освещения на культивирование тратится 2 световых дня и 1 ночь. При этом необходимо следить за температурой суспензии, не допуская превышения 30°C.

Предлагаемый способ не требует подачи углекислого газа и барботирования
10 культуры воздухом, а также исключает постоянное перемешивание суспензии.

Органический комплекс питательной среды, состоящий из фугата и фильтрата настоя голозерного овса, является основой для образования бактериально-альгологического микробиоценоза, что в значительной мере ускоряет биологические процессы в высокопродуктивной экосистеме аквакультуры [Богданов Н.И., Эгамов М.С., 1993
15 (стр. 26)].

Пример 1

Проводят I этап культивирования микроводорослей (таблица 1) с использованием установки для непрерывного выращивания планктонных водорослей (патент RU 2571939). В качестве маточной культуры используют штамм *Chlorella vulgaris* ИФР №
20 С-111 (патент RU 1751981) с исходной плотностью суспензии 1,0 г/л сухой биомассы. Используется питательная среда (1), в состав которой входят минеральные и органические компоненты. Соотношение питательной среды и маточной культуры 1:1. Замеряют рН суспензии и при необходимости доводят до 7,0. Включают освещение, при этом температуру суспензии выдерживают в пределах 28-30°C. Первый световой
25 период составляет 10 часов. Для исполнения темнового периода освещение выключают на 4 часа. Второй световой период, так же, как и первый, составляет 10 часов. Срок культивирования равен 24 часам. Готовую культуру сливают в приемную емкость. Выход сухой биомассы составляет 1,5 г/л. Клетки в культуре на I этапе образуют по 2-4 автоспоры. Полученная продукция может использоваться в качестве корма для
30 сельскохозяйственных животных, преимущественно птицы.

Пример 2

Проводят II этап культивирования микроводорослей (таблица 1). Исходным материалом для засева является продукция, полученная на I этапе. Культивирование осуществляется по примеру 1. Клетки в культуре на II этапе образуют по 4-8 автоспоры.
35 Выход сухой биомассы составляет 2 г/л. Полученная продукция может использоваться в качестве корма для сельскохозяйственных животных, преимущественно свиней.

Культивирование осуществляется по примеру 1. Клетки в культуре на III этапе образуют по 8-16 автоспор. Выход сухой биомассы составляет 2,3 г/л. Полученная продукция может использоваться в качестве корма для сельскохозяйственных животных,
40 преимущественно крупного рогатого скота.

Пример 4

Культивирование хлореллы с использованием солнечного освещения выполняется в соответствии с таблицей 1 для каждого этапа в двух вариантах. Первый вариант при использовании солнечного освещения состоит из двух дней и одной ночи. По второму
45 варианту днем используется солнечный свет в течение 10 часов, далее 4 часа темновая фаза, и для второй световой фазы используются лампы. Второй вариант позволяет сократить выращивание хлореллы на 12 часов по сравнению с первым.

По предлагаемому способу планктонная хлорелла растет в условиях монокультуры,

устойчива и невосприимчива к фагам, агглютинация клеток отсутствует, автолиз не наблюдается.

Таким образом, предложенный способ культивирования планктонной хлореллы позволяет получить продукцию, различающуюся по содержанию биомассы для дифференцированного использования в качестве корма различным возрастным группам и категориям животных. Питательная среда, включающая в состав минеральные и органические компоненты, за суточный срок с использованием двух световых и одного темнового периода, дает возможность сократить срок выращивания хлореллы в 4-6 раз.

Источники информации

1. Авторское свидетельство СССР 716541 от 31 июля 1978 г., кл. C12N 1/12. Способ выращивания микроводорослей. Богданов Н.И., Елсуков И.Е. 25.02.80. Бюл. №7.

2. Патент РФ 2176667 от 21 апреля 2000 г., кл. C12N 1/12. Культивирование микроводорослей на основе штамма «*Chlorella vulgaris* ИФР № С-111». Богданов Н.И., Куницын М.В. 1012.2001. Бюл. №34.

3. Авторское свидетельство СССР 1373728 от 26 июня 1986 г., кл. C12N 1/12. Способ культивирования хлореллы. Грищенко Т.П. и др. 15.02.88. Бюл. №6.

4. Патент РБ 6970 от 29 декабря 2001 г., кл. C12N 1/12. Способ культивирования хлореллы. Сенникова В.Д. и др. 30.03.2005 (прототип).

5. Патент РФ 2571939 от 15 апреля 2015 г., кл. C12M 1/00. Установка для непрерывного выращивания планктонных водорослей. Богданов Н.И. 27.12.2015. Бюл. №36.

6. Патент РФ 1751981 от 14 декабря 1987 г. кл. 6 C12N 1/12. Штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris* - продуцент биомассы. Богданов Н.И. 10.02.1997. Бюл. №4.

7. Богданов Н.И., Эгамов М.С. Микробиологические процессы и рыбоводные результаты интенсивно эксплуатируемых прудов Таджикистана. Деп. ВИНТИ №197-В93, 1993. - С. 80.

Таблица 1 — Показатели на различных этапах культивирования планктонной хлореллы

Этап культиви-рования	Исходная сухая биомасса, г/л	Фильтрат настоя голозерного овса, мл/л	Фугат зерновой, мл/л	Спор, в клетке хлореллы	Конечная сухая биомасса, г/л
I	1,0	35	50	2–4	1,5
II	1,5	50	60	4–8	2,0
III	2,0	60	85	8–16	2,3

(57) Формула изобретения

Способ культивирования планктонной хлореллы, включающий культивирование ее на питательной среде, состоящей из минеральных и органических компонентов, отличающийся тем, что культивирование ведут в три этапа и одновременно в режиме чередования двух световых и одной темновой фазы фотосинтеза в течение 10...4...10 часов соответственно на каждом этапе при освещении лампами ДРИ-250 или солнечным светом, температуре культуры 28-30°C, на питательной среде, состоящей из минеральных и органических компонентов, которую вместе с исходным посевным материалом культуры берут в отношении 1:1, при этом для каждого последующего этапа исходным

материалом является суспензия, полученная на предыдущем этапе культивирования, а сами этапы различаются между собой внесением в питательную среду органических компонентов при следующем их содержании на один литр водопроводной воды:

- минеральных

- 5 1. Аммиачная селитра 0,4 г;
2. Аммофос, 15% раствор 0,2 мл;
3. Железо хлорид, 1% раствор 0,15 мл;
4. Кобальт азотнокислый, 0,01% раствор 0,5 мл;
5. Медь сернокислая, 0,01% раствор 0,5 мл;
- 10 6. Магний сернокислый 0,3 г;
7. Калий сернокислый, 12% раствор 0,5 мл;

- органических

1. Фильтрат настоя голозерного овса (рН 3,5-5,0),
этап культивирования: I - 35,0 мл; II - 50,0 мл; III - 60,0 мл;
- 15 2. Фугат зерновой послеспиртовой барды (рН 4,2-4,5), этап культивирования:
I - 50,0 мл; II - 60,0 мл; III - 85,0 мл.

20

25

30

35

40

45