



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*C12N 1/20* (2020.01); *C12R 1/89* (2020.01)

(21)(22) Заявка: 2019125293, 08.08.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 08.08.2019

Дата регистрации:  
 21.07.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 08.08.2019

(45) Опубликовано: 21.07.2020 Бюл. № 21

Адрес для переписки:  
 450000, г. Уфа, ул. Октябрьской революции, 3а,  
 Башкирский государственный педагогический  
 университет им. М. Акмуллы, Гайсина Лира  
 Альбертовна

(72) Автор(ы):

Аллагуватова Резеда Зинуровна (RU),  
 Гайсина Лира Альбертовна (RU),  
 Суханова Наталья Викторовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 образовательное учреждение высшего  
 образования "Башкирский государственный  
 педагогический университет им. М. Акмуллы  
 ФГБОУ ВО "БГПУ им. М. Акмуллы" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: ГАЙСИНА Л.А.,  
 ФАЗЛУТДИНОВА А.И., КАБИРОВ Р.Р.,  
 Современные методы выделения и  
 культивирования водорослей. Учебное  
 пособие, Уфа, 2008, с. 128-139. ГАЙСИНА Л.А.,  
 ФАЗЛУТДИНОВА А.И., КАБИРОВ Р.Р.,  
 Современные методы выделения и  
 культивирования водорослей. Учебное  
 пособие, Уфа, 2008, с. 21-30. RU 2556126 C1,  
 10.07.2015. SU 893191 A1, 30.12.1981.

(54) ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОДОРОСЛИ CHLORELLA VULGARIS  
 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЧВЕННОЙ ВЫТЯЖКИ И ВИТАМИНОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и  
 может использоваться для культивирования  
 водоросли *Chlorella vulgaris* в промышленных  
 масштабах. Питательная среда включает  
 компоненты основной питательной среды Болда,

почвенную вытяжку, витамины  $B_1$  и  $B_{12}$  в  
 заданном соотношении. Изобретение позволяет  
 увеличить концентрацию суспензии, оптическую  
 плотность и темпы роста *Chlorella vulgaris*. 4 табл.

RU 2727257 C1

RU 2727257 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC  
*C12N 1/20* (2020.01); *C12R 1/89* (2020.01)

(21)(22) Application: 2019125293, 08.08.2019

(24) Effective date for property rights:  
08.08.2019

Registration date:  
21.07.2020

Priority:

(22) Date of filing: 08.08.2019

(45) Date of publication: 21.07.2020 Bull. № 21

Mail address:  
450000, g. Ufa, ul. Oktyabrskoj revolyutsii, 3a,  
Bashkirsij gosudarstvennyj pedagogicheskij  
universitet im. M. Akmully, Gajsina Lira  
Albertovna

(72) Inventor(s):

Allaguvatova Rezeda Zinurovna (RU),  
Gajsina Lira Albertovna (RU),  
Sukhanova Natalya Viktorovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Bashkirsij gosudarstvennyj  
pedagogicheskij universitet im. M. Akmully  
FGBOU VO "BGPU im. M. Akmully" (RU)

(54) NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION OF ALGAE CHLORELLA VULGARIS USING SOIL EXTRACT AND VITAMINS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and can be used for cultivation of *Chlorella vulgaris* algae on an industrial scale. Nutrient medium includes components of the Bald main nutrient medium, soil

extract, vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>12</sub> in the specified ratio.

EFFECT: invention increases concentration of the suspension, optical density and growth rate of *Chlorella vulgaris*.

1 cl, 4 tbl

RU 2727257 C1

Изобретение относится к биотехнологии и может использоваться для промышленного получения водоросли *Chlorella vulgaris*. Питательная среда включает компоненты основной питательной среды Болда, почвенную вытяжку, витамины В<sub>1</sub> и В<sub>12</sub> в заданном соотношении. Изобретение позволяет увеличить концентрацию суспензии, оптическую 5 плотность и темпы роста *Chlorella vulgaris*.

Для промышленного производства микроскопических водорослей, в том числе и *Chlorella vulgaris*, требуется создание благоприятных условий для их роста. Для выращивания водорослей необходимо поддержание оптимального уровня освещения 10 и температуры, концентрации углекислого газа, а также перемешивание. Для достижения максимального прироста водоросли необходимо подобрать оптимальную питательную среду, которая удовлетворяет физиологические потребности водоросли. Питательная среда по своему составу должна максимально воспроизводить условия, в которых вид обитает в природе. Питательные среды, используемые для культивирования *Chlorella vulgaris*, содержат макро- и микроэлементы, которые обеспечивают нормальную 15 жизнедеятельность клеток.

Для выращивания хлореллы используется среда Тамия (Tamiya, 1957). Одной из особенностей выращивания водоросли в данной среде является нехватка азота и повышенная концентрация калия, что ведет к подщелачиванию среды. Чтобы избежать подобного явления рекомендуется применить мочевину как источник азота. Так было 20 выяснено, что для среды Тамия, содержащей нитратный азот, характерно присутствие повышенных концентраций серы и магния.

С целью устранения недостатков среды Тамия была разработана среда №3, для которой были характерны тот же прирост биомассы, что и у среды Тамия с нитратным азотом и ниже на 1% в отличие от среды Тамия с мочевиной (Мещерякова, 2016). Однако 25 среда №3 дает меньший прирост биомассы хлореллы, чем среда Тамия.

Также известна питательная среда для выращивания хлореллы на основе среды Тамия с добавлением аммофоса, калимагнезия и хлорного железа (SU 506962).

Для выращивания хлореллы используется также среда Бенеке (Wijanarko, 2011). Установлено, что среда Бенеке, содержащая нитрат калия, является оптимальной для 30 накопления липидов до 0,42 г/г биомассы. В случаях применения мочевины как источника азота, рост клеток снижался на 30%, однако при этом происходило увеличение содержание белка в клетках водоросли. Было установлено, что использование для среды сточных вод с аммиаком увеличивает скорость роста хлореллы на 55-60%, а внутриклеточные липиды увеличиваются на 8,5%.

Группа ученых с П. Хелд изучала возможности культивирования хлореллы на питательных средах BG-11, ТАР и ТР. Прирост числа клеток в среде ТР был ниже, чем в среде ТАР в 1,7 раз, а прирост биомассы в среде BG-11 был ниже, чем в среде ТАР в 16 раз (Дворецкий и др., 2015).

К недостаткам питательных сред Тамия с модификациями, Бенеке, BG-11, ТАР и ТР 40 относится относительно низкий темп прироста биомассы.

Следует отметить, что все перечисленные выше питательные среды характеризуются использованием ограниченного числа микроэлементов. Это негативно сказывается на росте и жизнеспособности клеток *Chlorella vulgaris*. Микроэлементы особенно важны для культивирования хлореллы в течение длительного времени, так как при их нехватке 45 со временем будет происходить угнетение их жизнеспособности и гибель.

Известна также среда Люка для выращивания водорослей с использованием ионита «Ионосорб™» и куриного помета (RU 2556126). Недостатком этой среды является необходимость использования ионита, который достаточно сложно прибрести. Куриный

помет относится к отходам III класса опасности, его гашение требует специальных навыков и тщательного соблюдения техники безопасности.

Основная среда Болда (Bold's Basal Media - BBM) - это среда, которая широко используется для выращивания водорослей (Bischoff, Bold, 1963). От других сред она отличается использованием большого числа микроэлементов, что позволяет поддерживать жизнеспособность водорослей в течение длительного времени (таблица 1). Однако в ряде случаев даже при использовании основной среды Болда наблюдается замедление скорости роста водоросли. Причиной этих процессов является нехватка витаминов, а также органических веществ, присутствующих в естественных условиях обитания.

Задача, на решение которой направлено заявляемое изобретение, является разработка питательной среды для культивирования водоросли *Chlorella vulgaris* с целью повышения темпов роста и плотности суспензии за небольшой промежуток времени.

Для решения задачи предлагается питательная среда для культивирования водоросли *Chlorella vulgaris*, которая отличается введением новых компонентов (почвенной вытяжки и витаминов  $B_1$  и  $B_{12}$ ) в определенных соотношениях.

Для получения суспензии используется аутентичный штамм *Chlorella vulgaris* Beijerinck BCAC 76. Готовится питательная среда Болда согласно стандартному рецепту (Bischoff, Bold, 1963; Гайсина и др., 2008). Почвенную вытяжку получают путем добавления 10 мг просеянной воздушно-сухой почвы к 40 мл дистиллированной воды с последующим взбалтыванием. Раствор оставляют на сутки, затем фильтруют через бумажный складчатый фильтр (Кабиров, Сугачкова, 2005) и стерилизуют автоклавированием. В 1 л среды добавляется 40 мл почвенной вытяжки и по 0,125 мкг витаминов  $B_1$  и  $B_{12}$ . В питательную среду вносят маточный раствор *Chlorella vulgaris*, которую затем культивируют при комнатной температуре в сочетании искусственного и естественного освещения при световой и темновой фазах 12:12 ч. Эксперименты проводятся в 500 мл колбах с рабочим объемом 230 мл. Для исключения оседания и агрегации клеток водорослей используется перемешивающее устройство ПЭ-6300.

Для контроля количества и концентрации клеток образцы суспензии отбираются каждые 24 часа. Предварительная оценка прироста клеток в суспензии осуществляется методом прямого подсчета клеток в камере Горяева. Так же определяется общая концентрация клеток (Биотест-системы..., 2014). Оптическая плотность измеряется с помощью концентрационного фотоколориметра КФК-3-01.

Чтобы показать, насколько эффективен тот или иной состав питательной среды, определяется темп роста водоросли. Темп роста зависит от плотности суспензии, отобранной с интервалом, например, один раз в сутки, в зависимости от скорости роста водоросли (Barsanti, Gualtieri, 2006).

Темп роста ( $\mu$ ) рассчитывается с использованием формулы:

$$40 \quad m = \frac{\ln(N_2/N_1)}{t_2 - t_1},$$

где  $N_2$  и  $N_1$  - это число клеток во время  $t_1$  и  $t_2$ .

Когда  $N_2$  это удвоенная  $N_1$ , например, если численность клеток увеличилась вдвое.

45 Скорость роста можно выразить формулой:

$$m = \frac{\ln(2)}{T_g},$$

где  $T_g$  - это время генерации.

С учетом того, что  $\ln(2)=0,6931$ , время генерации может быть подсчитано по формуле:

$$T_g = 0.6931 \mu^{-1}.$$

<sup>5</sup> Для статистической оценки результатов использовали критерий S Вальда-Вольфовица (Кузнецов, 2006). Оценка различия выборок по данному критерию осуществляется при помощи программы Statistica trial, пробная версия которой имеется в интернете в свободном доступе (<http://statsoft.ru/products/trial/>).

<sup>10</sup> Пример конкретной реализации способа. Эксперимент был направлен на сравнение эффективности культивирования на среде Болда с добавлением витаминов  $B_1$  и  $B_{12}$  (первый вариант), среде Болда с добавлением почвенной вытяжки (второй вариант), среде Болда с добавлением витаминов  $B_1$  и  $B_{12}$  и почвенной вытяжки (третий вариант).

<sup>15</sup> На 12-е сутки культивирования концентрация клеток водоросли на среде Болда с витаминами и почвенной вытяжкой составила 9,19 млн клеток/мл, на среде Болда с добавлением витаминов - 8,15 млн клеток/мл и на среде Болда с почвенной вытяжкой - 7,05 млн клеток/мл (таблица 2). Сочетание питательной среды с витаминами и почвенной вытяжкой приводит к значительному увеличению концентрации клеток водоросли, следовательно, данный вариант среды наиболее эффективен при получении <sup>20</sup> супензии.

<sup>25</sup> Так же была определена оптическая плотность супензии при длине волны 670 нм (таблица 3), которая достигала максимума 0,362 на 12-е сутки культивирования при сочетании питательной среды Болда с витаминами и почвенной вытяжкой.

<sup>30</sup> Наибольший темп роста *Chlorella vulgaris*, равный 0,152, наблюдался при культивировании на среде Болда с почвенной вытяжкой и витаминами (таблица 4). При культивировании на среде Болда с витаминами темп роста был равен 0,132, при выращивании на среде Болда с почвенной вытяжкой - 0,134 (таблица 4).

<sup>35</sup> Статистический анализ результатов экспериментов по влиянию среды с почвенной вытяжкой и витаминами на оптическую плотность супензии по критерию Вальда-Вольфовица показал их достоверность ( $S=0,156714$ ).

Таким образом, разработанная питательная среда Болда с добавлением почвенной вытяжки, витаминов тиамина, цианкобаламина позволяет повысить концентрацию супензии, оптическую плотность и темпы роста хлореллы за небольшой промежуток времени, что актуально при промышленных масштабах производства водоросли.

<sup>40</sup> Источники информации

Авторское свидетельство СССР 506962 от 25 ноября 1976 г., кл. А01Н 13/00. Питательная среда для выращивания хлореллы. Альбицкая О.Н., Райко А.Н., Филатова Т.М. 28.02.77. Бюл. №43.

<sup>45</sup> Биотест-системы для задач экологического контроля: Методические рекомендации по практическому использованию стандартизованных тест-культур / Терехова В.А., Воронина Л.П., Гершкович Д.В., Ипатова В.И., Исакова Е.Ф., Котелевцев С.В., Попутникова Т.О., Рахлеева А.А., Самойлова Т.А., Филенко О.Ф. М.: Доброе слово, 2014. 48 с.

Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: учебное пособие. Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. 152 с.

<sup>50</sup> Дворецкий Д.С., Дворецкий С.И., Темнов М.С. Пешкова Е.В., Акулинин Е.И. Технология получения липидов из микроводорослей. Тамбов: Издательство ФГБОУ ВПО «ТГГУ», 2015, С. 14.

Кабиров Р.Р., Сугачкова Е.В. Оценка качества окружающей среды: Учебно-методическое пособие. Уфа: Вагант, 2005. 128 с.

Кузнецов В.М. Основы научных исследований в животноводстве. Киров: Зональный НИИСХ Северо-Востока, 2006. 568 с.

5 Мещерякова Ю.В. Разработка технологического процесса получения биодобавок из липидных компонентов микроводоросли хлорелла для улучшения свойств дизельного топлива: дис. .... канд. техн. наук. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт использования техники и нефтепродуктов в сельском хозяйстве», Тамбов, 2016.

10 Патент РФ 2556126 от 9 января 2014 г., кл. C12N 1/12. Питательная среда Люка для культивирования микроводорослей. Михайлюк А.В., Щемелинина Т.Н., Анчугова Е.М. 10.07.2015. Бюл. №19.

Триал-версии STATISTIC A. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://statsoft.ru/products/trial/>. Дата обращения 25.05.2018

15 Barsanti L., Gualtieri P. *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. New York: CRC Taylor & Francis. 2006.

Bischoff H.W., Bold H.C. *Phycological studies IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species*. University of Texas, Austin, 1963, 6318. P. 1-95.

Tamiya H. Mass culture of algae // *Annual Review of Plant Physiology*. 1957. N8. C. 309-334.

20 Wijanarko A. Effect of the Presence of Substituted Urea and Also Ammonia as Nitrogen Source in Cultivated Medium on Chlorella Lipid Content, Progress in Biomass and Bioenergy Production. 2011. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.intechopen.com>. DOI: 10.5772/19358. Дата обращения 23.09.2018.

25

30

35

40

45

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЧВЕННОЙ ВЫТЯЖКИ И ВИТАМИНОВ

5

Таблица 1 – Состав среды Болда (Гайсина и др., 2008)

Компонент	Маточный раствор (г/л дистиллированной воды)	Используемое количество (мл)	Концентрация в конечной среде (моль)
Макроэлементы			
NaNO <sub>3</sub>	25	10	$2,94 \times 10^{-3}$
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,5	10	$1,70 \times 10^{-4}$
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7,5	10	$3,04 \times 10^{-4}$
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5	10	$4,31 \times 10^{-4}$
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5	10	$1,29 \times 10^{-4}$
NaCl	2,5	10	$4,28 \times 10^{-4}$
Щелочной раствор ЭДТА		1	
ЭДТА	50		$1,71 \times 10^{-4}$
KOH	31		$5,53 \times 10^{-4}$
Кислый раствор железа			
FeSO <sub>4</sub>	4,98		$1,79 \times 10^{-5}$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		1	
Раствор Бора		1	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42		$1,85 \times 10^{-4}$
Раствор микроэлементов			
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,82		$3,07 \times 10^{-5}$
MnCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	1,44		$7,28 \times 10^{-6}$
MoO <sub>3</sub>	0,71		$4,93 \times 10^{-6}$
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,57		$6,29 \times 10^{-6}$
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,49		$1,68 \times 10^{-6}$

30

Таблица 2 – Количество клеток *Chlorella vulgaris* (концентрация суспензии) в счетной камере Горяева,  $10^6$  клеток/мл

Дата	Среда Болда + витамины	Среда Болда + почвенная вытяжка	Среда Болда + витамины + почвенная вытяжка
17.04.18	1,78	2,48	2,99
19.04.18	1,15	2,52	2,77
21.04.18	2,45	2,93	3,43
23.04.18	3,65	3,16	3,23
25.04.18	5,01	6,55	7,85
27.04.18	8,32	7,88	8,58
29.04.18	8,15	7,05	9,19

Таблица 3 – Оптическая плотность суспензии *Chlorella vulgaris* (при 670 нм)

5 Дата	Среда Болда + витамины	Среда Болда + почвенная вытяжка	Среда Болда + витамины + почвенная вытяжка
17.04.18	0,065	0,113	0,145
19.04.18	0,011	0,052	0,059
21.04.18	0,065	0,045	0,038
23.04.18	0,144	0,036	0,073
25.04.18	0,273	0,045	0,070
27.04.18	0,275	0,277	0,348
29.04.18	0,277	0,284	0,362

Таблица 4 – Темпы роста *Chlorella vulgaris* в условиях культуры

20 Суспензия в условиях культивирования	Среда Болда + витамины	Среда Болда + почвенная вытяжка	Среда Болда + почвенная вытяжка + витамины
25 Темп роста $\mu$	0,132	0,134	0,152

## (57) Формула изобретения

Питательная среда для культивирования водоросли *Chlorella vulgaris* с использованием основной питательной среды Болда, отличающаяся одновременным добавлением 40 мл/л почвенной вытяжки, 0,125 мкг/л витамина  $B_1$  и 0,125 мкг/л витамина  $B_{12}$ .

30

35

40

45